

María Giovana Anaya Padrón

Carreteras en el centro de México como barreras para el flujo
génico en coyotes (*Canis latrans*)

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Carreteras en el centro de México como barreras para
el flujo génico en coyotes (*Canis latrans*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado
de Maestra en Ciencias Biológicas

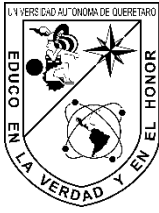
Presenta

María Giovana Anaya Padrón

Dirigido por:

Dr. Carlos Alberto López González

Querétaro, Qro. a agosto, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Carreteras en el centro de México como barreras para el flujo génico
en coyotes (*Canis latrans*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

María Giovana Anaya Padrón

Dirigido por:

Dr. Carlos Alberto López González

Dr. Carlos Alberto López González

Presidente

Dr. Robert Wallace Jones

Secretario

Dr. Israel Gustavo Carrillo Ángeles

Vocal

Dr. Isaí Betancourt Resendes

Suplente

Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto 2022

México

DEDICATORIA

A mis padres, a Rafa y a Erika's band, con muchísimo amor y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante la maestría. Además, agradezco el financiamiento al proyecto, ya que esta investigación es parte de un proyecto más grande, “Conectividad funcional de un carnívoro en un paisaje fragmentado en el Centro de México”.

Al Dr. Carlos López, quién me ha dado muchas oportunidades tanto académicas como laborales. He aprendido muchísimo trabajando con él, y al fin trabajé con el modelo de estudio que siempre quise (los cánidos). También me ha tenido mucha paciencia, y me ha dado mucho apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, pues ellos me aligeraron el trabajo de laboratorio. Además de su trabajo en campo para la colecta de muestras los años anteriores. Ambos trabajos son cansados y laboriosos, por lo que sin ellos esta tesis no se hubiera logrado.

Al Dr. Isaí Betancourt, Dr. Israel Carrillo, Dr. Robert Jones y a la Dra. Mónica Queijeiro, quienes me aconsejaron en cada tutorial, ayudando a aclarar dudas que se me presentaban. También agradezco el tiempo que dedicaron a las lecturas de mi escrito, sus correcciones y comentarios al mismo.

A mis padres, con mucho amor y cariño, porque a pesar de estudiar una carrera que no deja dinero para ser rica y poderosa, siempre me han dado todo su apoyo y amor.

A Rafa, porque él fue quien aguantó todos mis lloriqueos y quejas durante toda mi maestría y más allá. Además, a pesar de no quererse levantar temprano me llevó algunas veces al laboratorio, a C.U., etc... Me ha apoyado muchísimo desde el día uno en que lo conocí.

A Fernanda Revueltas, Vale y Clari, el mejor círculo de confianza. Ellas me escucharon, me soportaron y me aconsejaron en varios aspectos de mi vida, incluyendo el académico. Gracias por su amistad sincera, saludos cordiales.

A mis mascotas, que sin ellos me hubiera vuelto loca encerrada 24/7 en esta pandemia. Ellos me animaban a levantarme de mi depresión para darles de comer, llevarlos a su paseo y jugar con ellos, a cambio me llenaban de muchos pelitos, lamidas y mucho amor. Las noches en que tenía que desvelarme, ellos me hacían compañía.

A mi laptop, que, aunque muchas veces me dio sustos porque parecía que iba a dejar de funcionar, nunca dejó de funcionar. Soportó programas que usé para hacer mis análisis, que intenté usar y no lo logré, que bajé y nunca usé. Además de toda la información en artículos, libros, imágenes, etc.

Finalmente, me agradezco a mí, porque nunca me rendí a pesar de mis problemas emocionales y mi mala suerte. Fueron dos años muy difíciles emocionalmente, creo que llegué a tocar fondo o casi..., pero volví a levantarme y salir adelante. A pesar de mi ansiedad, no voy a detenerme, todo lo contrario.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	6
2.1 Conectividad funcional, flujo génico y estructura poblacional en un paisaje fragmentado	6
2.2 Impacto de las carreteras en la fauna silvestre	8
2.3 Historia de vida y biología del coyote	11
2.4 Estudios de genética en paisajes fragmentados por la urbanización con el coyote como objeto de estudio.	15
2.5 Fragmentación por urbanización y carreteras en el centro de México	16
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVO GENERAL	18
V. OBJETIVOS PARTICULARES	18
VI. METODOLOGÍA	19
6.1 Área de estudio y obtención de las muestras	19
6.2 Métodos de secuenciación y análisis	21
6.3 Análisis de los datos	24

6.3.1 Determinación de genotipos y cálculos de frecuencias alélicas	24
6.3.2 Alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y equilibrio Hardy-Weingberg	24
6.3.3 Diversidad genética	26
6.3.4 Diferenciación y estructura genética	26
VII. RESULTADOS	31
7.1 Alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y equilibrio Hardy-Weinberg	31
7.2 Diversidad genética	32
7.3 Diferenciación y estructura genética	33
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIONES	48
X. LITERATURA CITADA	49
ANEXO 1	67
ANEXO 2	68
ANEXO 3	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proporción de loci microsatélites y subpoblaciones fuera de Equilibrio Hardy-Weinberg.	33
Cuadro 2. Índices estándar para medir la diversidad genética.	34
Cuadro 3. Resumen de estadísticos-G.	36
Cuadro 4. Análisis de Varianza molecular (AMOVA)	37
Cuadro 5. Comparación de la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), G_{st} (este estudio) / F_{st} (otros estudios) y N en diferentes estudios sobre genética de poblaciones de coyotes en distintos ambientes.	42
ANEXO 2. Listado de los loci microsatélites utilizados en el estudio.	68
ANEXO 3. Listado de los pares de loci microsatélites en el análisis de desequilibrio de ligamiento (LD).	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la ubicación del área de estudio en el centro de México (Querétaro y Guanajuato).	20
Figura 2. Asignación genética de individuos a dos subpoblaciones (K1 y K2) dentro de la población de coyotes.	35
Figura 3. Gráfico de Evanno que muestra la $\Delta K = \text{media}(L''(K))/\text{sd}(L(K))$, y la $\text{mediaLnP}(D)$ que mejor describe la estructura genética para la población de coyote.	36
Figura 4. Ubicación espacial de los individuos por subpoblación K1 y K2.	38
Figura 5. Análisis de componentes principales (PCA)	39
Figura 6. Gráfico de la prueba de Mantel.	40
ANEXO 1. Mapa donde se observa la ubicación de las 282 muestras confirmadas de coyote según los grupos hipotéticos.	67

RESUMEN

En un paisaje fragmentado por la infraestructura urbana se presentan barreras, como las carreteras, que disminuyen la conectividad funcional de las poblaciones de fauna silvestre en un paisaje. Si la conectividad es baja, se reduce el flujo génico, disminuye la diversidad genética y se favorece la estructura genética en la población. El coyote (*Canis latrans*) es un carnívoro de gran capacidad de movimiento y está presente en diversos tipos de ambientes. Sin embargo, se ha observado que su movimiento puede ser limitado por la presencia de carreteras. El centro de México ha sufrido fragmentación acelerada en el paisaje debido a los asentamientos rurales y urbanos, acompañados de una alta densidad de carreteras. Se hipotetiza que, en esta región, las carreteras principales (Mex-057, Mex-047D y la Mex-045) disminuyen la conectividad funcional en la población de coyote, al actuar como barreras para el flujo génico, por lo tanto, la población presentará estructura genética. Mediante el uso de 13 microsatélites loci, con muestras de excrementos obtenidas durante el periodo de 2016 al 2020, de 13 sitios del estado de Guanajuato y 33 sitios del estado de Querétaro, se evaluó la conectividad funcional a través de la inferencia del flujo génico de la población de coyote. Además, se estimó la diversidad genética de la población de coyote y se identificó la existencia de estructura genética en la población por medio de análisis de asignación. Se registró una población de 66 individuos que presenta baja diversidad genética ($H_o = 0.633 \pm 0.053$). Se observan dos subpoblaciones bien diferenciadas ($G_{st} = 0.06$), compuestas por individuos aparentemente transeúntes ($n = 12$), que posiblemente, provienen de una población más al sur, y la población local, conformada por individuos residentes ($n = 54$), distribuidos en toda el área de estudio. Los resultados sugieren que las carreteras del área de estudio no están actuando como barreras para el movimiento o el efecto de barrera aún no es detectable en la población.

Palabras clave: conectividad funcional, estructura genética, fragmentación, microsatélites

ABSTRACT

In a landscape fragmented by urban infrastructure and barriers, such as roads, the functional connectivity of the landscape can be reduced for wildlife populations. If connectivity is low, a decrease in gene flow may occur, reducing genetic diversity and favoring the genetic structure within the population. The coyote (*Canis latrans*) is a generalist carnivore with a great capacity for movement and is usually present in various types of environments. However, it has been observed that in urban environments their movement can be limited by roads. Central Mexico has suffered from increasing fragmentation of the landscape due to rural and urban settlements, accompanied by a high density of roads. We hypothesized that, in this region, the main highways (Mex-057, Mex-047D, and Mex-045) will decrease functional connectivity in the coyote population by acting as barriers to gene flow, and the population has a genetic structure. Using 13 microsatellite loci obtained from scat samples collected from 2016 to 2020 from 13 sites in the state of Guanajuato and 33 sites in the state of Querétaro, functional connectivity was evaluated through gene flow inference. Also, the genetic diversity of the coyote population was estimated and the identification of genetic structure in the population of coyotes through assignment analyses. From a population of 66 coyote individuals (19 females and 47 males) the genetic diversity was found to be low ($H_o = 0.633 \pm 0.053$). Two well-differentiated subpopulations are observed ($G_{st} = 0.06$), made up of probable transient individuals ($n = 12$), which possibly come from a population further south, and the local population, which are resident individuals ($n = 54$), found throughout the study area. The results suggest that roads of the study area are not barriers for movement, or the barrier effect is not detectable in the population yet.

Keywords: functional connectivity, genetic structure, fragmentation, microsatellites

I. INTRODUCCIÓN

Un gran porcentaje de los hábitats naturales a nivel mundial presentan cierto grado de fragmentación y alteración (Aguilar *et al.*, 2019). En un paisaje fragmentado los parches del hábitat natural suelen estar separados por una matriz en la que el ecosistema se encuentra alterado, la cual funciona como una barrera que puede evitar el movimiento de los individuos de diversas especies entre un parche y otro (Hanski, 1998). Como resultado, a partir de una población grande y conectada se originan poblaciones locales pequeñas y aisladas en parches separados (Adducci II *et al.*, 2020). La facilidad con que los individuos se mueven entre las poblaciones pequeñas que se encuentran en los diferentes parches indica el grado de conectividad funcional, que es la respuesta conductual de la especie a la manera en que está estructurado el paisaje, según las características del relieve, hidrología, tipo de vegetación y fragmentación, entre otros (Lookingbill y Minor, 2017), y es una de las claves para la conservación de las poblaciones a largo plazo (Hanski y Ovaskainen, 2019).

La conectividad funcional se verá afectada por las características del paisaje (conectividad estructural) (Lookingbill y Minor, 2017), sobre todo por el grado de fragmentación y la presencia de barreras en el paisaje, en conjunto con la capacidad de movimiento de la especie (Hanski, 1998; Hanski y Ovaskainen, 2019). Si la conectividad es baja, se puede presentar poco flujo génico que reduce la diversidad genética y favorece la deriva génica, esto propicia la estructura genética en la población (Heppenheimer *et al.*, 2018). Estas condiciones disminuyen la viabilidad de las poblaciones debido al aumento de la tasa de endogamia y a la consecuente disminución de la capacidad adaptativa (Frankham, 2005). El estudio de la genética del paisaje de las poblaciones puede ayudar a mejorar los programas de conservación, y así, promover un mejor manejo de las especies en sus hábitats naturales (Frankham *et al.*, 2017).

En un paisaje fragmentado con alta incidencia de urbanización, las carreteras son uno de los principales problemas para la conservación de las poblaciones de fauna silvestre (Grilo *et al.*, 2008). Uno de estos problemas, es que actúan como barreras para la fauna silvestre, al contribuir a la disminución de la conectividad funcional del paisaje, y aumentar el riesgo de mortalidad para los individuos (Rytwinski y Fahrig, 2015). Debido a que, son pocos los individuos que pueden cruzar estas barreras, el flujo génico suele ser bajo en las poblaciones que se encuentran cercanas a las carreteras (Riley *et al.*, 2006; Grilo *et al.*, 2008). Las especies más afectadas son las de talla grande, con amplio movimiento y ámbito hogareño extenso, como los carnívoros (Rytwinski y Fahrig, 2015). Es importante tomar en cuenta la estructura del paisaje, en conjunto con la historia de vida, comportamiento y la biología de la especie bajo estudio para evaluar la vulnerabilidad o permanencia de la población (Carr y Fahrig, 2001).

El coyote (*Canis latrans*) es una especie de carnívoro ampliamente distribuida en diversos tipos de hábitats (Bekoff y Gese, 2003), y es considerada una especie generalista y oportunista, con gran capacidad de movimiento (Gantz y Knowlton, 2005), lo cual promueve la panmixia en sus poblaciones (Berkman *et al.*, 2019). Sin embargo, tales condiciones pueden ser excepcionales actualmente, debido a que la mayor parte del hábitat de los coyotes está fragmentado y rodeado por desarrollo urbano (Rashleigh *et al.*, 2008, DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). Se ha observado que los individuos de coyote que se encuentran en las cercanías de zonas urbanas suelen presentar rangos de ámbito hogareño pequeños (Gehrt, 2007; Breck *et al.*, 2019). Además, las poblaciones pueden presentar bajo flujo génico y estructura genética, por la influencia de barreras en el paisaje como las carreteras (Riley *et al.*, 2006; Rashleigh *et al.*, 2008; Berkman *et al.*, 2019; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020).

El centro de México está altamente fragmentado por la urbanización (Challenger, 2014) y la red vial de la región se encuentra en constante expansión (INEGI, 2021). Las carreteras federales Mex-057, Mex-047D y la Mex-045, se

consideran las carreteras principales de esta red vial (SCT, 2020), y dividen el paisaje en cuatro regiones principales: Noreste, Noroeste, Centro y Suroeste. De este modo, puede esperarse que estas carreteras representen barreras e impidan el movimiento de la fauna silvestre de amplio movimiento en la región, como es el caso de los coyotes. En este estudio, con base en la regionalización propuesta, se plantea la hipótesis de la existencia de cuatro subpoblaciones en la población de coyotes que habitan en el centro y sur del estado de Querétaro y Guanajuato, México.

II. ANTECEDENTES

2.1 Conectividad funcional, flujo génico y estructura poblacional en un paisaje fragmentado

La estructura de un paisaje, conocida como conectividad estructural (Lookingbill y Minor, 2017), puede influir en la variación genética dentro de una y entre varias poblaciones. La genética del paisaje nos permite estudiar esta influencia del paisaje en los procesos microevolutivos de una población, como el flujo génico, deriva génica y selección natural (Manel *et al.*, 2003). La fragmentación del paisaje es un proceso que modifica las características y estructura del paisaje (Ewers y Didham, 2006), y como resultado se generan parches de vegetación remanente separados por una matriz de vegetación y/o suelo modificados y alterados (Haddad *et al.*, 2015; Fahrig *et al.*, 2019). En tales condiciones, las poblaciones originales pueden subdividirse y en cada parche que conforma el paisaje fragmentado se puede presentar una subpoblación, que puede interactuar con otras subpoblaciones vecinas gracias a cierto grado de desplazamiento de los individuos entre los parches (Hanski, 1998; Hanski y Ovaskainen, 2019).

La interacción y el movimiento de los organismos acorde a la estructura del hábitat es conocida como conectividad funcional (Lookingbill y Minor, 2017), y es importante para mantener la viabilidad y persistencia de las poblaciones (Beninde *et al.*, 2016). La conectividad funcional es una medida de conectividad específica de la especie (Lookingbill y Minor, 2017), que depende de la capacidad de desplazamiento de esta, de su comportamiento, y de la estructura del paisaje, principalmente de la continuidad del hábitat o el tipo de matriz que rodea a los parches de hábitat, de la distancia entre los parches y del tamaño de cada parche (Hanski, 1998; Hanski y Ovaskainen, 2019).

Cuando el paisaje está fragmentado, se han planteado dos mecanismos mediante los cuales se mantiene la conectividad funcional (Fahrig, 2017). El

primero es el mantenimiento de la dispersión cuando se presentan numerosos parches separados por distancias cortas, sin importar el tamaño de los parches (Bowman *et al.*, 2002; Fahrig, 2017; Hanski y Ovaskainen, 2019). En el segundo se sugiere que, al existir una mayor densidad de bordes debido a una mayor cantidad de parches, se facilita el movimiento de especies que tienen preferencia por el desplazamiento a través de los bordes (Fahrig, 2017). A diferencia de lo planteado en los dos procesos anteriores, diversos estudios han demostrado que la fragmentación suele resultar en una matriz que se vuelve una barrera que afecta la conectividad funcional (Hanski, 1998; Riley *et al.*, 2006; Hanski y Ovaskainen, 2019). Esto puede llevar a la pérdida de la densidad poblacional, a la disminución de la diversidad genética en las poblaciones y la reducción del flujo génico (Aducci II *et al.*, 2020).

Con el tiempo, si el flujo génico no se recupera entre las poblaciones, disminuye la variación genética y promueve la diferenciación genética entre las poblaciones. Adicionalmente, puede ocurrir endogamia y disminución de la adecuación reproductiva, que conlleva la capacidad de adaptación a los cambios ambientales y la resistencia a enfermedades nuevas (Heppenheimer *et al.*, 2018). Estos factores pueden aumentar en la población el riesgo a la extinción local (Frankham, 2005).

La ecología de la especie es otra variable que tiene influencia en la diferenciación y variación genética de las poblaciones. Las características de la especie como el tamaño, la capacidad de movimiento, la habilidad de adaptarse y de usar diferentes tipos de ambientes y recursos influyen en la recuperación de las poblaciones en paisajes fragmentados (Gardmark *et al.*, 2003; Janecka *et al.*, 2016). Por ejemplo, la fragmentación del hábitat puede funcionar como una barrera mayor en el paisaje para especies especialistas, en comparación con las especies generalistas, las cuales son más tolerantes a los cambios del hábitat (Janecka *et al.*, 2016). Crooks (2002) observó que los carnívoros presentan diferentes grados de sensibilidad a la fragmentación y al aislamiento, y que esta

sensibilidad es dependiente del tamaño corporal de las especies y de su capacidad de movimiento. Crooks (2002) observó también que las especies más sensibles tienden a desaparecer cuando los parches de vegetación natural se hacen más pequeños y se aíslan. Sin embargo, el efecto negativo del aislamiento entre los parches afecta a la mayoría de las especies, incluyendo a las especies menos sensibles como las generalistas (Crooks, 2002; Aducci II *et al.*, 2020).

2.2 Impacto de las carreteras en la fauna silvestre

El aumento de la densidad de carreteras es un factor importante en la pérdida de la biodiversidad (Cervantes-Huerta *et al.*, 2017). A nivel global se han llevado a cabo estudios que confirman los efectos negativos de las carreteras sobre la fauna silvestre (Carr y Fahrig, 2001; Havlick, 2004; Riley *et al.*, 2006; Rytwinski y Fahrig, 2015; Bennet, 2017; Cervantes-Huerta *et al.*, 2017; Delgado-Trejo *et al.*, 2018; Schwartz *et al.*, 2020). En los ecosistemas, las carreteras generan múltiples problemas que están englobados en lo que se conoce como “zona de efecto de carretera” (van der Ree *et al.*, 2015). Este concepto se utiliza para cuantificar los impactos ecológicos negativos causados por las carreteras y el tránsito (Forman y Deblinger, 2000; van der Ree *et al.*, 2015). El impacto es mayor en las cercanías de las carreteras, pero su efecto se puede observar en paisajes adyacentes, a una distancia de la carretera que varía según tipo de hábitat que fue fragmentado, y puede alcanzar una frecuencia de cientos de metros (van der Ree *et al.*, 2015). La zona de efecto de carretera incluye la pérdida, fragmentación y perturbación de los hábitats naturales, atropellamiento de fauna silvestre; así como la contaminación por gases, luz artificial y ruido (Arroyave *et al.*, 2006). Estos problemas cambian la distribución, densidad y la dinámica ecológica de las poblaciones de las especies nativas (Arroyave *et al.*, 2006; Cervantes-Huerta *et al.*, 2017). Como consecuencia, se reduce drásticamente la abundancia de organismos grandes, como los vertebrados (Rytwinski y Fahrig, 2015). Las especies sensibles o con distribución restringida son especialmente afectadas, pues corren mayor riesgo de extinciones locales, pero también las especies más tolerantes a los cambios

ambientales sufren las consecuencias (Havlick, 2004; Cervantes-Huerta *et al.*, 2017).

La densidad de carreteras está correlacionada con la densidad poblacional urbana (Wydeven *et al.*, 2001), y es usada como una medición del porcentaje de urbanización de un sitio (DeCandia *et al.*, 2019). La urbanización afecta la viabilidad de las poblaciones de la fauna silvestre (Grilo *et al.*, 2008), ya que la mortalidad aumenta para mamíferos que frecuentan los alrededores de las zonas urbanas, como zorrillos, roedores y tlacuaches (Delgado-Trejo *et al.*, 2018). A nivel global, los carnívoros son el orden de mamíferos más afectado negativamente por las carreteras, pues se ha observado que el tamaño poblacional disminuye drásticamente en zonas con presencia de carreteras (Rytwinski y Fahrig, 2015).

Al fragmentarse el hábitat se producen dos principales efectos negativos: el efecto borde y el efecto barrera (Arroyave, *et al.*, 2006). El primero ocurre desde el borde de la carretera hasta los 100 o 400 m hacia el hábitat natural, según la especie (Arroyave, *et al.*, 2006). En esta área las condiciones bióticas y abióticas de la matriz y los parches cambian. Hay un aumento en la radiación solar y la temperatura, hay mayor susceptibilidad al viento y disminuye la humedad, que en conjunto puede modificar la estructura de la vegetación (Arroyave *et al.*, 2006; Cervantes-Huerta *et al.*, 2017). Estos cambios pueden ser favorables para especies invasoras o exóticas, que competirán por los recursos, y desplazarán a las especies nativas de la zona (Delgado-Trejo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Pfeifer *et al.* (2017) evaluó a nivel global la sensibilidad de los distintos grupos de vertebrados en los bordes de paisajes fragmentados. Observó que el 46% de las especies eran afectadas positivamente y el 39% negativamente por los bordes de los parches de hábitat. Las especies afectadas negativamente se encontraban dentro de los parches de hábitat natural, y generalmente eran especies con un grado de protección especial. Las especies afectadas positivamente eran principalmente especies generalistas y/o invasoras (Pfeifer *et al.*, 2017).

Por otro lado, el efecto barrera ocurre cuando el movimiento de los animales entre los parches del hábitat es limitado o simplemente no ocurre, y como resultado una población grande se divide en subpoblaciones (Rytwinski y Fahrig, 2015). Después de varias generaciones, debido al aislamiento parcial, se pueden observar efectos de deriva génica entre las subpoblaciones, y como principal consecuencia la disminución de la diversidad genética dentro de una población (Honnay, 2008). En el efecto barrera, factores como las carreteras rompen la continuidad del hábitat, e impiden el movimiento de muchas especies de vertebrados, entre ellos mamíferos de talla mediana y grande (Riley *et al.*, 2006; Grilo *et al.*, 2008; Thomassen *et al.*, 2018). Las especies más afectadas son las de amplio movimiento (Carr y Fahrig, 2001; Rytwinski y Fahrig, 2015), con gran ámbito hogareño (Rytwinski y Fahrig, 2015) y con patrones estacionales de conducta (ej. migraciones, cortejo y reproducción, entre otras), ya que recorren varios kilómetros en búsqueda de alimento o de individuos para el apareamiento (Cupul, 2002).

Una carretera es menos permeable cuando presenta bardas, y se vuelve más permeable para los individuos si presenta menor grado de perturbación humana y mayor cobertura de vegetación en los alrededores (Grilo *et al.*, 2008; Delgado-Trejo *et al.*, 2018). Si una carretera es más permeable, es más fácil que sea cruzada por los animales, sin embargo, aumenta el riesgo de sufrir atropellamiento (Cervantes-Huerta *et al.* 2017; Delgado-Trejo *et al.*, 2018). Debido a esto, aunque puede ocurrir flujo génico, este será bajo debido a que son pocos los individuos que logren cruzar (Riley *et al.*, 2006).

Los atropellamientos son bastante comunes a nivel global, y para gran número de especies animales es uno de los factores más importantes de mortalidad (Havlick, 2004; Cervantes-Huerta *et al.*, 2017). El atropellamiento está entre las principales causas de muerte de origen antropogénico para los vertebrados en el mundo (Hill *et al.*, 2019). El índice de atropellamiento está relacionado con la amplitud y anchura de la carretera, el flujo vehicular, la

velocidad promedio de los vehículos, y la presencia de bardas. Estos factores hacen que este tipo de matriz sea un ambiente hostil para los individuos, y aumenta su mortalidad al intentar cruzar de un sitio a otro (Gantz y Knowlton, 2005; Wydeven *et al.*, 2001).

Se estima que, al año, en Estados Unidos, ocurre un aproximado de 365 millones de atropellamientos a vertebrados (Huijser *et al.*, 2008). En México no existen cifras a nivel nacional sobre atropellamientos de fauna silvestre (Cervantes-Huerta *et al.*, 2017), pero se tienen reportes sobre carreteras específicas. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Cervantes-Huerta *et al.*, (2017), donde estimaron 221 individuos atropellados/kilómetro a lo largo de un año en el tramo Banderilla – Amozoc de la carretera Xalapa – Puebla. En otros ejemplos, Delgado-Trejo *et al.*, (2018) estimaron 11,461 animales atropellados al año en una carretera en la costa de Michoacán, y Schaffer (2019) ha reportado más de 2, 000 muertes de animales por atropellamiento al año, en la Carretera Federal número 2 en el estado de Sonora.

2.3 Historia de vida y biología del coyote

El coyote (*Canis latrans*) (Say, 1823), es una especie perteneciente a la familia Canidae, del orden Carnivora. Se reconocen aproximadamente 20 subespecies (Méndez-Carvajal y Moreno, 2014). Esta especie no se encuentra dentro de algún estatus de protección especial a nivel nacional o internacional, y sus poblaciones se consideran en aumento (CITES, 2014; SEMARNAT, 2010; Kays, 2018). El coyote es una de las especies de cánidos más exitosa y con mayor distribución, que va desde Alaska hasta Panamá (Bekoff y Gese, 2003; Cove *et al.*, 2012; Méndez-Carvajal y Moreno, 2014).

Es una especie generalista con comportamiento oportunista, tanto para el uso de hábitat como para su alimentación omnívora (Bekoff y Gese, 2003). Este comportamiento permite que su alimentación dependa de la disponibilidad de alimentos por temporadas, por lo que existe una variación anual en el consumo de

recursos (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2001). Esta variación también depende del tipo de ambiente y la región donde habita. En general, dentro de sus hábitos alimenticios está el consumo de pequeños vertebrados (principalmente pequeños mamíferos) y algunas especies de ungulados, como el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), seguido de herbáceas, frutos de temporada e insectos (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2001; Cruz-Espinoza *et al.*, 2008; Gehrt *et al.*, 2011; Lukasik y Alexander, 2011). En menor grado, los individuos que viven dentro y cerca de zonas urbanas pueden llegar a consumir comida antropogénica y animales domésticos, como gatos (*Felis catus*) y perros (*C. lupus familiaris*) (Gehrt *et al.*, 2011; Lukasik y Alexander, 2011).

El tamaño y peso del coyote varían según la región geográfica y las subespecies, al ser de mayor tamaño las poblaciones en el Norte. Además, presentan dimorfismo sexual, ya que los machos son más grandes que las hembras. En promedio, la longitud corporal es de 1-1.5 m para adultos. El peso para un macho adulto varía entre 10 y 15 kg, y para las hembras adultas de 8 a 12 kg (Bekoff y Gese, 2003). Los machos adultos presentan mayor desarrollo de la cresta sagital, en comparación de las hembras. La fórmula dental para la especie es I:3/3, C:1/1, P:4/4 y M:2/3 (Bekoff y Gese, 2003).

El pelaje también varía geográficamente. En zonas altas y hacia el norte, el pelaje es más denso y largo, con variaciones en el color entre grisáceo y rojizo. Para zonas desérticas, el pelo es corto y con colores gris-amarillentos (Bekoff y Gese, 2003). Aunque no es común, se tienen registros de individuos melanísticos (Mahan, 1978), y se reportó el caso de un individuo blanco en el desierto Chihuahuense (López-González, 2011).

Al igual que otras especies del género *Canis*, los coyotes son diploides $2n = 38$ cromosomas. Es común la hibridación con las especies de lobo gris (*C. lupus*), lobo rojo (*C. rufus*) y perro doméstico (*C. lupus familiaris*) (Cove *et al.*, 2012), y resultar la progenie híbrida fértil (Bekoff y Gese, 2003).

El ancestro común más reciente del lobo y del coyote, es el coyote de Johnston (*C. leupophagus*). Esta especie se distribuía ampliamente por gran parte de Norteamérica durante el Plioceno tardío (10.3 a 1.8 millones de años) (Bekoff y Gese, 2003). Los registros fósiles indican que, durante el Pleistoceno y el Holoceno temprano ca. 30.000 a 3,500 años antes del presente, con distribución en Mesoamérica. La distribución original del coyote estaba limitada a las praderas del sur de Canadá, de la región central de Estados Unidos y del centro de México (Parker, 1995; Hody y Kays, 2018). A partir de 1900, la especie se ha expandido rápidamente hacia el norte y este de Estados Unidos, Canadá y Alaska (Hody y Kays, 2018). En la época de la colonia (siglo XVI), su distribución abarcaba hasta el centro de México (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004). Su más reciente expansión es en Panamá, con los primeros registros en 1980 (Méndez *et al.*, 1981), y este país fue reconocido como parte de su distribución natural en 1995 (Iglesias, 2002).

Los coyotes ocupan una gran variedad de hábitats, con preferencia de uso de ambientes abiertos, semiabiertos y bordes de bosques (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004). Es por esto que la expansión del coyote se ha visto beneficiada por los cambios de uso de suelo y la deforestación que han sufrido algunas áreas naturales (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004; Heppenheimer *et al.*, 2018; Berkman *et al.*, 2019). La expansión hacia Centroamérica pudo deberse a la deforestación en México (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004), que abrió el paso hace más de 400 años hacia Costa Rica y Panamá (Monge-Nájera y Morera Brenes, 1986). Se considera que la ausencia de depredadores de mayor tamaño, por ejemplo el puma (*Puma concolor*), debido a la deforestación, también ha beneficiado su expansión y establecimiento, pues no ocurren confrontamientos y disminuye la competencia por alimento (Wang *et al.*, 2015). Como sucedió en México, es posible que el ritmo constante de la deforestación en países Sudamericanos pueda propiciar en un futuro la expansión del coyote aún más hacia al sur (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004).

Se ha observado que los individuos de la especie son capaces de utilizar matrices agrícolas como corredores biológicos, posiblemente por ser ambientes

abiertos (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004). Además, los diferentes tipos de cultivos pueden proporcionar alimento, lo que propicia la ocupación de este tipo de ambientes (Cove *et al.*, 2012). Hidalgo-Mihart *et al.* (2001), llevaron a cabo un estudio de hábitos alimenticios en una selva baja caducifolia en el oeste de México, donde se observó que los coyotes distribuidos en zonas deforestadas por actividades agrícolas consumían principalmente alimentos relacionados con actividades humanas, como frutas cultivadas (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2001). Sin embargo, las áreas deforestadas para ganado pueden tener poca influencia en la expansión del coyote, debido a que en este tipo de matrices no hay gran cantidad de alimento (Cove *et al.*, 2012). La gran capacidad adaptativa de los coyotes a este tipo de ambientes perturbados y fragmentados les ha permitido distribuirse ampliamente en zonas urbanas, suburbanas y rurales (Grinder y Krausman, 2001; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020).

El ámbito hogareño varía según la región geográfica y por temporadas. Además, es influenciado por el tipo de hábitat, disponibilidad de alimento y requerimientos energéticos, asimismo varía entre sexos, edad y organización social (Bekoff y Gese, 2003). Es una especie de amplio movimiento, con un rango de ámbito hogareño entre 16.7 a 68.4 km² (Gantz y Knowlton, 2005), y para machos transeúntes se ha reportado hasta 202 km² de dispersión (Poessel *et al.*, 2016). A pesar de esto, se ha observado que individuos de coyote que se encuentran en las cercanías de zonas urbanas suelen presentar rangos de ámbito hogareño pequeños (Gehrt, 2007; Breck *et al.*, 2019), con una estimación media de 10.8 km² (Atkinson y Shakleton, 1991) y 12.6 km² (Grinder y Krausman, 2001), y puede disminuir a medida que la urbanización aumenta (Grinder y Krausman, 2001). En ocasiones, cuando los individuos son residentes, los territorios son heredados a través de generaciones, ya que suelen permanecer en el mismo territorio. Las manadas suelen defender sus territorios, en comparación con los individuos solitarios (Bekoff y Gese, 2003).

2.4 Estudios de genética en paisajes fragmentados por la urbanización con el coyote como objeto de estudio.

Estudios recientes han descrito que en áreas pequeñas y urbanizadas se puede presentar una estructura genética en poblaciones de coyote, al ser las carreteras las principales barreras que limitan el movimiento poblacional (Riley *et al.*, 2006; Rashleigh *et al.*, 2008; Damm *et al.*, 2015; Berkman *et al.*, 2019; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). En un estudio llevado a cabo por Riley *et al.*, (2006), se monitorearon individuos de coyote mediante radio collares, y observaron que las carreteras eran el límite de los territorios, y que, aunque estas barreras eran cruzadas ocasionalmente por algunos individuos el flujo génico era reducido (Riley *et al.*, 2006).

Mediante el uso de haplotipos, Rashleigh *et al.* (2008) obtuvieron los valores del índice de fijación (F_{st}) por pares que indicaron que la estructura genética aumentaba proporcionalmente con la distancia en áreas altamente urbanizadas. Según el arreglo de los haplotipos, las poblaciones de coyote en Cleveland, Ohio, no presentaban panmixia, pues observaron una diferenciación regional en la estructura de la población en tres regiones (rango F_{st} = 0.07-0.17). Rashleigh *et al.* (2008) argumentaron que la estructura genética puede estar influenciada por las carreteras.

Berkman *et al.* (2019) llevaron a cabo un estudio donde observaron diferencias regionales asociadas a la distancia entre las poblaciones de coyote de los estados de Nueva York, Carolina del Sur y Wyoming. Pero al comparar solo la población de Nueva York a nivel de ecorregión no se observaron diferencias significativas en el F_{st} por pares (valor más alto de F_{st} = 0.010, p = 0.08). Sin embargo, al separar las ecorregiones no tomaron en cuenta las barreras del paisaje, y consideraron que el número de muestras fue bajo (Berkman *et al.*, 2019).

En comparación con el estudio anterior, DeCandia *et al.* (2019) evaluaron el grado de urbanización en Nueva York, donde observaron diferencias entre una población muy cercana a la ciudad de Nueva York (NYC) y dos poblaciones alejadas de NYC. Si bien no encontraron diferencias significativas en la heterocigosis observada (H_o), sí observaron una disminución en la media de alelos presentes en la población de NYC (NYC = 6.44, vs dos poblaciones = 10.33). Esto puede indicar que los coyotes de NYC tienen movimiento más restringido, tal vez por la alta fragmentación de hábitat. Adicionalmente encontraron que la población de NYC está ligeramente diferenciada de las otras dos poblaciones ($F_{st} = 0.035$, $p < 0.05$) (DeCandia *et al.*, 2019).

Adducci II *et al.* (2020) llevaron a cabo un análisis de la estructura de una población en el sur de California, donde compararon poblaciones de coyote cercanas a las zonas urbanas contra poblaciones en hábitats naturales. Obtuvieron cuatro poblaciones bien diferenciadas (rango $F_{st} = 0.042$ -0.076). Entre ellas observaron aislamiento por distancia mediante una correlación entre las distancias genéticas con las distancias geográficas ($r = 0.125$, $p = 0.05$). Las tres poblaciones con mayor grado de diferenciación genética fueron las más cercanas a las zonas urbanas, y estas poblaciones estaban separadas por dos carreteras principales ($F_{st} = 0.070$). También observaron una pérdida de 1.6 alelos por cada 10% de incremento en la urbanización, lo que indica la disminución de la riqueza alélica. Sin embargo, no se vio afectada directamente por la densidad de carreteras ($R^2 = 0.012$, $p = 0.226$) (Adducci II *et al.*, 2020).

2.5 Fragmentación por urbanización y carreteras en el centro de México

En el centro de México, desde la época de la colonia, se han fragmentado los paisajes naturales debido a la actividad agrícola y minera, y recientemente, también por el aumento de la población, la industria textil y la industria automotriz (Camps *et al.*, 2015). Esto ha creado un paisaje altamente fragmentado, con una disminución de hasta el 95% de la vegetación natural (Challenger, 2014). Las regiones centro y sur de los estados de Querétaro y Guanajuato, corresponde a

uno de los principales centros manufactureros de Norteamérica (Camps *et al.*, 2015). Es uno de los siete “Corredores prioritarios para la integración urbano-regional” (SEGOB, 1995) y se encuentra dentro del Programa de Desarrollo de la Región Centro-Occidente (FIDERCO, 2005). Estas industrias han resultado en la expansión de la metrópolis del estado de Querétaro con más del 67% de la población del estado y un crecimiento medio anual del 3.2% para el periodo 2010-2020 (CONAPO, SEDESOL, INEGI, 2015 (Censo 2020)). Debido a lo anterior, las carreteras de este corredor son muy importantes para el desarrollo regional urbano, ya que facilitan la comunicación y el traslado de las mercancías entre las zonas industriales, agroindustriales y multimodales (Camps *et al.*, 2015).

La expansión de la red federal de carreteras federales y estatales aumentó un 15.38% desde el año 2000 al 2018 (INEGI, 2021). Esta red vial ha resultado en una matriz compleja con un flujo de tráfico rápido y denso, arriba de los 77 km/h, el cual no varía significativamente a lo largo del día (De la Llata Gómez *et al.*, 2001; SCT, 2013). Las carreteras federales Mex-057 (Tráfico Diario Promedio Anual (TDPA), tramo Libramiento Nororiente de Querétaro (Cuota)= 8,736 vehículos), Mex-047D (TDPA, tramo Palmillas-Apaseo el Grande (Cuota = 6,399 vehículos) y la Mex-045 (TDPA, tramo Querétaro-Irapuato (Cuota = 21,303 vehículos), son consideradas carreteras troncales o principales, pues pertenecen a los ejes troncales México-Nuevo Laredo con Ramal a Piedras Negras y Querétaro-Ciudad Juárez (SCT, 2018). Querétaro mantiene comunicación vial con el resto del país mediante tres rutas principales: Sur (México -Querétaro), Norte (Querétaro-San Luis Potosí) y Occidente (Querétaro-Irapuato libre y cuota) (De la Llata Gómez *et al.*, 2001). Estas carreteras presentan gran extensión en kilómetros, alto flujo de tránsito (SCT, 2013; SCT, 2020), presencia de bardas laterales y/o centrales, y amplitud de cuatro carriles (3.50 m/carril) más los camellones laterales (1.00-1.50 m/carril). Debido a estas características, es probable que actúen como barreras del paisaje, y dividan el paisaje en cuatro regiones principales: región Noreste, Noroeste, Centro y Suroeste (ANEXO 1).

III. HIPÓTESIS

Las principales carreteras de la región centro de México, Mex-057, Mex-047D y la Mex-045, actúan como barreras en el paisaje que lo fragmentan en cuatro regiones principales: Noreste, Noroeste, Centro y Suroeste. Estas barreras limitan el movimiento de los individuos de coyote, por lo que disminuye la conectividad funcional en la región, y la población está subdividida. Si la conectividad funcional para el coyote es baja, tanto el flujo génico como la diversidad genética también lo son entre las subpoblaciones. Por lo tanto, se presentará estructura genética en la población.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Inferir el flujo génico, estimar la diversidad genética e identificar poblaciones subdivididas de coyote, para evaluar si la conectividad funcional es afectada por las carreteras principales de la región del centro de México, Mex-057, Mex-047D y la Mex-045.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar la diversidad genética de la población de coyote en el centro de México mediante el uso de loci microsatélites.
- Elucidar el grado de diferenciación y estructura genética de la población de coyote en las cuatro subregiones Noreste, Noroeste, Centro y Suroeste del centro de México mediante el uso de loci microsatélites.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio y obtención de las muestras

El estudio se llevó a cabo en la región centro de México, específicamente en el centro y sur del estado de Querétaro y el sureste del estado de Guanajuato (Figura 1). Esta región abarca la zona sureste del Altiplano Mexicano Sur y una parte del norte del Eje Volcánico Transversal, ambas son parte de las 15 provincias biogeográficas mexicanas (Escalante *et al.*, 2007) y están caracterizadas por la distribución de su biota (plantas, mamíferos, aves e insectos). Además, están limitadas por barreras geográficas, como son las cadenas montañosas de la Sierra Madre Oriental al este, y la cadena volcánica del Eje Volcánico transversal al sur. (CONABIO, 1997; Morrone *et al.*, 1999; Morrone y Márquez 2003; Escalante *et al.*, 2007). Debido a que el área de estudio se encuentra en una zona de contacto con las provincias ya mencionadas, en esta área se presentan una variedad de tipos de vegetación: matorral xerófilo, selva caducifolia, bosque de coníferas, bosque de encino y pastizal. Sin embargo, gran parte del área es utilizada con fines agrícolas, predominando los cultivos de riego (INEGI, 2017).

Dentro del área de estudio se encuentra la zona metropolitana del estado de Querétaro que abarca los municipios de Corregidora, El Marqués, Huimilpan y Querétaro (CONAPO, SEDESOL, INEGI, 2015). Además, es una región altamente industrializada, pues se distribuyen 13 parques industriales de importancia nacional e internacional en el estado de Querétaro y uno en el estado de Guanajuato (SIMPPI). Estas zonas urbanas e industriales están conectadas con las otras zonas de importancia económica y social del país por dos corredores troncales: México-Nuevo Laredo con Ramal a Piedras Negras y Querétaro-Ciudad Juárez, de los cuales surgen las redes carreteras federales y estatales (SCT, 2018).

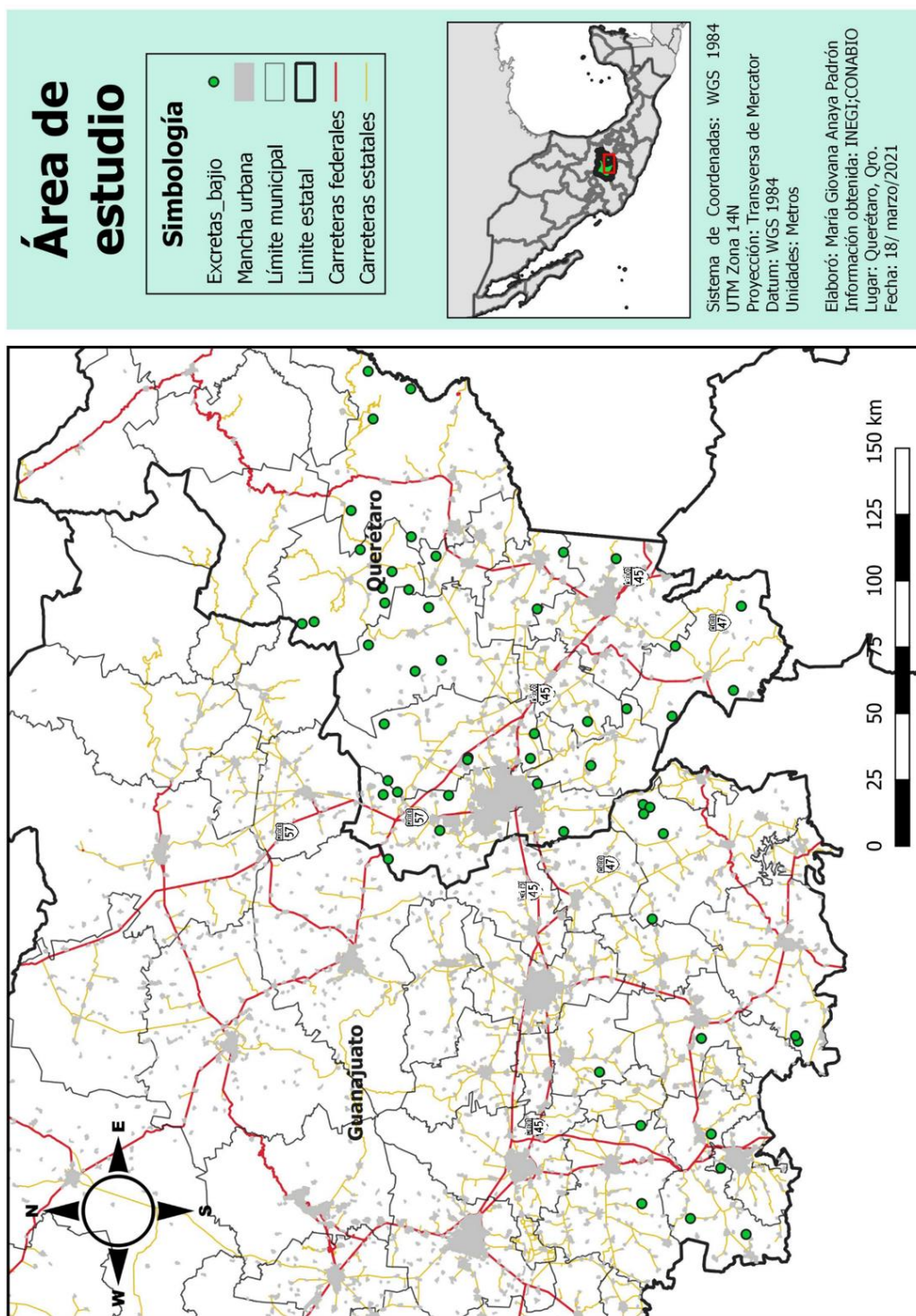


Figura 1. Mapa de la ubicación del área de estudio en el centro de México (Querétaro y Guanajuato). Los puntos verdes indican los sitios de muestreo, los polígonos grises muestran las manchas urbanas, las líneas amarillas la red de carreteras estatales, y las líneas rojas la red de carreteras federales.

Entre junio del 2016 y enero del 2020 se visitaron 13 sitios del estado de Guanajuato y 33 sitios del estado de Querétaro (Figura 1), en los cuales el equipo

de trabajo del laboratorio de zoología de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ ha llevado a cabo el monitoreo de fauna silvestre desde el año 2016. El ingreso a los sitios de muestreo ejidales y privados fue autorizado por las autoridades correspondientes. Durante las visitas a campo se colectaron más de 500 excrementos de coyote. Estos se buscaron a lo largo de caminos, ya que suelen depositarlos en estas zonas (Kohn y Wayne, 1997). Se registraron las coordenadas geográficas en UTM con un GPS Garmin (etrex 20) de los sitios donde se colectó cada muestra.

Los excrementos se identificaron visualmente con base en su tamaño, forma, color y contenido (Aranda Sánchez, 2012). Para evitar la contaminación de las muestras, se colectaron con guantes de látex esterilizados, y se depositaron en tubos Falcon de 50 ml. Posteriormente se congelaron a -40°C para mantenerlos viables hasta la extracción de ADN. La corroboración de la especie de procedencia se llevó a cabo mediante métodos moleculares descritos en la siguiente sección (Verma *et al.*, 2003).

6.2 Métodos de secuenciación y análisis

La colecta de excrementos de coyote es un método no invasivo, por lo que no es necesario el manejo de los individuos. Se obtiene el ADN de las células del epitelio intestinal que fueron arrastradas a lo largo del paso del excremento por el tracto digestivo (Waits y Paetkau, 2005). Extraer el ADN de los excrementos es tan viable como obtenerlo de tejido, con el fin de llevar a cabo la identificación de individuos (Ruell y Crooks, 2007). Además, permite obtener los patrones de dispersión de los coyotes (Wultsch *et al.*, 2016).

La extracción del ADN se llevó a cabo con el uso del kit Qiagen QIAmp Fast DNA Stool Mini-kit según las instrucciones del fabricante (Qiagen, la Jolla, C.A.). Los excrementos están contaminados con impurezas y compuestos orgánicos, además llevan almacenados más de un año, por lo que se modificó el protocolo en

la parte de lisis (Verma *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2010). En este caso se utilizó 1.6 ml del buffer InhibitEX® cuando el excremento fue recolectado fresco, y el tiempo de almacenamiento a partir de la recolección hasta la extracción de ADN no fue mayor a siete días, y se utilizó 1.8 ml del buffer InhibitEX® cuando el excremento se recolectó seco debido a la exposición ambiental o el tiempo de almacenamiento excedía más de siete días. Los desechos que resultaron de la extracción de ADN de los excrementos son de origen biológico-etiquetado según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (SEMARNAT, 2002). El material desechable, como puntas de pipeta, guantes y cubrebocas, fue debidamente descontaminado al sumergirlo en Hipoclorito de Sodio al 10% durante diez minutos y posteriormente fue desechado en bolsas rojas para residuos biológicos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002, SEMARNAT, 2002). Estos residuos fueron recolectados por la empresa TRIRSA S.A. de C.V. (Transporte y recolección de residuos peligrosos) autorizada por las autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, para el manejo de estos desechos.

Después de la extracción del ADN, se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el gen *citocromo b* del ADN mitocondrial para llevar a cabo la identificación de la especie (Adams *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2003). Los oligonucleótidos usados fueron específicos para la identificación de cánidos (coyote, perro y lobo) (Adams *et al.*, 2003; Mumma *et al.*, 2014). Para la amplificación se utilizó 9 ml de Green taq (PROMEGA Corp.), 0.2 ml BSA 7.5% (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA), 0.2 ml MgCl₂ (Qiagen, la Jolla, C.A.), 4.6 ml de H₂O, 0.5 ml de cada oligonucleótido y 5 ml de ADN. Las condiciones para el PCR fueron: desnaturalización inicial por 3 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización de los segmentos a 94 °C, 30 s para la alineación de los segmentos a 55 °C, 30 s para la elongación de los segmentos a 72 °C y 7 min la extensión final a 72 °C (Mumma *et al.*, 2014). La calidad de las extracciones se revisó mediante electroforesis en geles de 1% - 2% agarosa a 60 volts durante 1 h 30 min, y se visualizaron a través de la exposición de rayos UV. Posteriormente,

los productos purificados de PCR se enviaron a Macrogen, Inc. para la secuenciación de los fragmentos. Las secuencias se compararon en el programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI para confirmar la especie de procedencia con 98% o mayor porcentaje de identidad para *C. latrans* (GeneBank 4097779).

Se utilizaron loci microsatélites del ADN nuclear como marcadores moleculares ya que se ha probado su eficacia frente a otros marcadores en cuanto al análisis de diversidad y estructura genética (Monzón *et al.*, 2014). Si esta información genética se combina con la información geográfica mediante análisis de dependencia espacial se pueden observar las diferencias regionales de una población en áreas pequeñas de muestreo (Guillot *et al.*, 2005). Para cada muestra se genotiparon 13 loci microsatélites polimórficos, cada uno de los cuales pertenecen a diferentes cromosomas del genoma canino, y fueron diseñados para el perro doméstico (*C. familiaris*) pero se ha comprobado su eficacia en estudios de poblaciones de coyote (Francisco *et al.*, 1996; Heppenheimer *et al.*, 2018; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). Se usaron cuatro microsatélites dinucleótidos (AHT121, Cxx.119, Cxx.172 y C09.173) y nueve microsatélites tetranucleótidos (FH2001, FH2054, FH2088, FH2096, FH2226, FH2293, FH2535, FH2611 y FH3725). Cada microsatélite corresponde a un cromosoma distinto, excepto por los microsatélites FH2088 y FH2535, que corresponden al cromosoma 15 del genoma canino (ANEXO 2) (Francisco *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 1997; Breen *et al.*, 2001; Damm *et al.*, 2015; Heppenheimer *et al.*, 2018; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). Para la identificación del sexo se utilizaron dos loci determinantes de sexo para cánidos (DBX6 y DBY7) (Seddon, 2005). Cada loci se amplificó mediante PCR y se llevaron a cabo tres repeticiones. Las condiciones para cada microsatélite fueron: desnaturalización inicial por 10 min a 95 °C; 45 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54-58 °C para marcadores FH, 52 °C para el marcador AHT y 1 min a 60 °C para los marcadores CXX y los determinantes del sexo DBX6 y DBY7, y extensión final por 10 min a 72°C (Adducci II *et al.*, 2020).

Los fragmentos se observaron mediante electroforesis en geles de 1% - 2% agarosa a 60 volts durante 1 h 30 min. Se utilizaron diferentes tintes en cada loci microsatélite (ANEXO 2), y se visualizaron a través de la exposición de rayos UV. Al igual que los productos purificados de PCR el gen *citocromo b* del ADN mitocondrial, los fragmentos amplificados se enviaron a Macrogen, Inc. para su secuenciación.

6.3 Análisis de los datos

6.3.1 Determinación de genotipos y cálculos de frecuencias alélicas

De las muestras confirmadas pertenecientes a coyotes a partir de los genotipos obtenidos, se identificaron los individuos únicos con un análisis de identidad en el programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). Se calcularon las frecuencias alélicas con el programa GenAlex v 6.5 (Peakall y Smouse, 2006; Peakall y Smouse 2012).

6.3.2 Alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y equilibrio Hardy-Weingberg

Se obtuvo la frecuencia de alelos nulos en cada locus con el paquete Genepop (Rousset, 2020). La presencia de alelos nulos puede resultar en un falso déficit de heterocigotos, e inflar las medidas de diferenciación genética (Carlsson, 2008). Esto es debido a que los alelos nulos no amplifican en los ensayos de PCR, y en caso de que haya individuos heterocigotos para un alelo nulo, un alelo puede ser visible y el otro alelo no amplificar. Como resultado, el alelo visible puede llevar a la identificación de un locus como homocigótico cuando no lo es (Dakin y Avise, 2004). La presencia de alelos nulos puede deberse a errores durante la PCR por un pobre alineamiento con los oligonucleótidos o porque las muestras son de baja calidad (Dakin y Avise, 2004).

Se evaluó el desequilibrio de ligamiento (*LD*) para identificar la distribución independiente de los alelos en los loci de dónde se obtuvieron los microsatélites (Mohlke *et al.*, 2001) (999 permutaciones, $p = 0.005$) con el paquete Poppr (Kamvar y Tabima, 2021). El *LD* es la asociación no azarosa entre dos o más

alelos que se han mantenido por varias generaciones sin cambios dentro de una población (Kiselyova *et al.*, 2014; Single y Thomson, 2016). Esto ocurre cuando los alelos se encuentran físicamente cercanos en el cromosoma y no hay recombinación, y tampoco ocurre transmisión independiente pues hay herencia conjunta. A medida que estén más separados (< 50 cM), la probabilidad de recombinación aumenta (Single y Thomson, 2016). El *LD* también puede ocurrir por procesos de selección, mutación, deriva génica o endogamia (Kiselyova *et al.*, 2014; Single y Thomson, 2016). Además, se obtuvo el coeficiente de correlación (r) (999 permutaciones, $p = 0.005$) para cada par de loci con el paquete Poppr (Kamvar y Tabima, 2021), y para confirmar los resultados, se obtuvo la significancia ($p < 0.05$) para cada par con el paquete Genepop (Rousset, 2020) (parámetros Cadena de Markov (MCMC, por sus siglas en inglés): pasos de dememorización = 10,000, repeticiones = 1,000, no. de interacciones: 10,000). Este análisis es importante en el caso de que dos marcadores moleculares estén situados sobre el mismo cromosoma, como es el caso de los microsatélites FH2088 y FH2535 (ANEXO 2).

Se llevó a cabo el análisis de Equilibrio de Hardy-Weinberg (*EHW*) para determinar si la población está estable y presenta apareamiento azaroso. El *EHW* es el estado de la frecuencia genotípica de dos o más alelos de un locus después de una generación de una población de tamaño infinito donde ocurrió apareamiento al azar, y no ocurren mutaciones, migraciones, ni selección natural (Mayo, 2008; Waits y Storfer, 2016). La regla del *EHW* indica que, el equilibrio alélico y genotípico para un organismo diploide con dos alelos en un locus (ejemplo: alelos A y a), donde p representa la frecuencia de A y q la frecuencia de a, las proporciones en la frecuencia genotípica esperada debe ser $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (AA + 2Aa + aa). Estas condiciones no ocurren de manera estricta en las poblaciones naturales, y si la población no se encuentra en *EHW*, es posible que este influenciada por efectos de mutación, endogamia, deriva génica, migración y/o selección (Mayo, 2008; Wang y Shete, 2012).

Es probable que, si la población de coyote está compuesta por subpoblaciones aisladas, las proporciones de *EHW* no sean encontradas en la población total, aunque cada subpoblación sí puede encontrarse dentro de las proporciones, esto es conocido como el Efecto Wahlund. Este efecto es el aparente exceso de homocigotos o déficit de heterocigotos, y si dos o más subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas entonces la heterocigosidad total se ve reducida, aun si las mismas subpoblaciones tienen apareamiento azaroso (Mayo, 2008; Garnier-Géré y Chikhi, 2013). Para la población de toda la región, para las subpoblaciones y para cada loci microsatélite se evaluó el *EHW* con la prueba de χ^2 y el análisis de Monte Carlo con 100,000 permutaciones con el paquete PEGAS (Paradis, 2010) y Genepop (Rousset, 2020) para R. Se llevó a cabo una segunda prueba con la corrección de Bonferroni mediante comparaciones múltiples (100,000 permutaciones) para disminuir el riesgo de falsas diferencias significativas (Magurran, 2004), y se obtuvieron las proporciones de los loci y de las subpoblaciones que están fuera de *EHW*.

6.3.3 *Diversidad genética*

La obtención de los índices estándar para medir la diversidad genética se realizó con el programa GenAlex v 6.5 (Peakall y Smouse, 2006; Peakall y Smouse 2012). Se calcularon el número de alelos diferentes (N_a), el número efectivo de alelos (N_e), la heterocigosidad observada (H_o) con error estándar, la heterocigosidad esperada (H_e) con error estándar, y el índice de endogamia (F_{is}). Estos valores se obtuvieron para la población total y se compararon entre cada subpoblación y cada loci. Adicionalmente, se identificaron los alelos privados para cada subpoblación con el programa GenAlex v.6.5 (Peakall y Smouse, 2012) y la media de los alelos privados con el paquete PopGenReport (Gruber y Adamack, 2019).

6.3.4 *Diferenciación y estructura genética*

Se evaluó la estructura genética mediante un análisis espacio-independiente con el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa asigna, mediante algoritmos bayesianos, los genotipos multilocus a grupos genéticos, ya que calcula la probabilidad de que la población esté formada por uno o varios grupos de individuos con base en sus genotipos, y arroja el número posible de subpoblaciones (K) dentro de la población. Debido a la hipótesis inicial de cuatro subpoblaciones (ANEXO 1), se especificó $K = 1$ a 6 y 50 interacciones con el modelo de Admixture (utilizado cuando se supone ascendencia mixta entre los individuos) (MCMC: repeticiones 250,000, Burnin period = 500,000) (Pritchard *et al.*, 2000). Pritchard *et al.* (2000) menciona que el cálculo de K por el programa STRUCTURE debe ser interpretado con cuidado debido a que el método utilizado en el programa es una aproximación, y es difícil obtener estimaciones precisas. Debido a esto, para confirmar el número de subpoblaciones más probable arrojado por el análisis de STRUCTURE, se estimó la tasa mayor de cambio en los valores de probabilidad logarítmica (Δk) con el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005), e indicó que el número de subpoblaciones más probable es de 2. Así, el número de subpoblaciones $K = 2$ detectado inicialmente con el modelo especificado en STRUCTURE se mantuvo al aplicar el método de Evanno *et al.* (2005), por lo que estas dos subpoblaciones (K_1 y K_2) fueron utilizadas en los análisis posteriores para evaluar la diferenciación genética, ya que se descartó la presencia de las cuatro subpoblaciones planteadas en la hipótesis. Con el programa QGIS 3.10.12 (2021) se generó un mapa para ubicar espacialmente a los individuos según su subpoblación, e identificar el movimiento de estos dentro del área de estudio según la marca-recaptura de las muestras.

La diferenciación genética entre poblaciones ocurre en ausencia o bajo flujo génico y es la variación que se presenta entre las poblaciones de una especie que se encuentran separadas espacialmente (Honnay, 2008). La diferenciación genética entre poblaciones se estima acorde a los índices de fijación de Wright (1969) o estadísticos-F. Estos se basan en la varianza de las frecuencias alélicas,

que puede explicarse por la estructura de la población (Wright, 1969). *Fst* es el estadístico-F más común usado para medir la diferenciación genética a nivel de subpoblación (Waits y Storfer, 2016). Se evalúa en un rango que va desde 0.00 para poblaciones que presentan exactamente los mismos alelos, a 1.00 para las poblaciones que no tienen ningún alelo en común (Honnay, 2008). En promedio las frecuencias alélicas suelen permanecer constantes dentro de las poblaciones, y a lo largo del tiempo se puede observar divergencia entre ellas. Esto se puede evitar si ocurre flujo génico entre las poblaciones a través de la migración o dispersión (Honnay, 2008). Los otros estadísticos son estimadores de endogamia dentro de la población (*Fis*) y entre las poblaciones (*Fit*) que presentan valores de +1 para el exceso de homocigotos y -1 para el exceso de heterocigotos (Wright, 1951; Waits y Storfer, 2016).

El modelo original de Wright (1943, 1965) está basado en loci bialélicos. Posteriormente, Nei (1973) generó el índice de fijación *Gst*, que es multialélico en un solo locus y está basado en *Fst*. Se define como la diferencia entre la heterocigosidad esperada de toda la población (*Ht*) y la media esperada de cada subpoblación (*Hs*):

$$Gst = \frac{(Ht - Hs)}{Ht} = \frac{1 - Hs}{Ht}$$

Existe cierta confusión en el uso de *Fst* y *Gst* en la mayoría de los trabajos de genética de poblaciones, y es común que ambos índices se usen indistintamente (Kane, 2011; Meirmans y Hedrick, 2011) debido a que tienen comportamientos similares (Jost *et al.*, 2017). Estos índices de fijación están basados en la heterocigosidad, en el caso de los alelos multialélicos el valor máximo de diferenciación entre poblaciones no puede llegar a 1.00, ya que siempre existirá algún grado de heterocigosidad dentro de las poblaciones, y la *Ht* siempre será mayor o igual a la *Hs*. Para marcadores altamente variables, como los microsatélites, el rango de valores para *Gst* y *Fst* se vuelve menor, al llegar a un valor máximo de diferenciación posible 0.1 (Meirmans y Hedrick, 2011).

Hendrik (2005) identificó esta limitante y estandarizó el análogo $G'st$ para poblaciones con altos niveles de heterocigosidad. Esta estandarización permite que $G'st$ tenga un valor máximo de diferenciación de 1, y se define como el valor Gst obtenido entre el Gst máximo ($Gst\ max =$ función de la heterocigosidad esperada, Hs y $k =$ no. poblaciones) teórico:

$$Gst(max) = \frac{(k-1)(1-Hs)}{k-1+Hs}$$

$$G'st = \frac{Gst}{Gst(max)}$$

Meirmans y Hedrick (2011) hicieron una corrección a esta ecuación para obtener valor de diferenciación entre un número pequeño de poblaciones ($G''st$), ya que se pueden subestimar los valores de diferenciación cuando se presenta un número pequeño de poblaciones a comparar. Esta ecuación utiliza la estandarización de Nei (1987) a Gst ($G'st\ (nei)$), ya que esta toma en cuenta el número de poblaciones es pequeño a comparación de $G'st$ de Hendrik (2005):

$$G'st_{(nei)} = \frac{k(Ht-Hs)}{kHt-Hs}$$

Por lo tanto:

$$G''st = \frac{G'st_{(nei)}}{1-Hs}$$

Debido a que los loci microsatélites son altamente variables, y el número de subpoblaciones a comparar es bajo ($K = 2$), en este estudio se calculó la diferenciación genética mediante los estadísticos-G (Gst por pares, $G'st(Nei)$, $G'st(Hendrik)$ y $G''st$) con el programa GenAlex v.6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Se calcularon los índices de fijación Fst , Fis y Fit con el programa ARLEQUIN ver. 3.5.2.2 (parámetros MCMC = 100,000, pasos de memorización = 50,000, $p = 0.05$) (Excoffier y Lischer, 2010). Se calcularon los estadísticos-F entre las subpoblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y entre los individuos,

los cuales se pusieron a prueba mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (10,000 permutaciones) con el programa ARLEQUIN ver. 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para poder llevar a cabo este análisis, se tomaron los cuatro subgrupos de la hipótesis inicial del proyecto dentro de los dos grupos principales: K1 conformado por Noreste (n = 8), Centro (n = 1) y Sur (n = 3), y K2 conformado por Noreste (n = 30, Noroeste (n = 3) Centro (n = 9) y Sur (n = 12).

El flujo génico se puede medir de manera indirecta con la marca-recaptura de los individuos, pues se mide el movimiento de los individuos migratorios directamente, pero se falla en medir el apareamiento exitoso de estos migrantes (Waits y Storfer, 2016). Otros métodos indirectos para medir las tasas de migración y el flujo génico son métodos que calculan el tiempo de coalescencia de los alelos que comparten un ancestro en común (Kingman, 1982; Waits y Storfer, 2016). En cambio, las mediciones directas del flujo génico son pruebas de asignación que usan información genotípica de los individuos. Estos métodos identifican a los individuos que se han alejado de su sitio natal, y estima la dispersión entre las poblaciones y las áreas geográficas (Waits y Storfer, 2016).

Para complementar los análisis anteriores, primero se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) con el paquete adegenet (Jombart y Kamvar, 2020) para observar el ordenamiento de los datos en grupos. Luego, se utilizó el modelo de aislamiento por distancia (IBD, por sus siglas en inglés) mediante una prueba de Mantel con el programa Alleles in Space ver. 1 (Miller, 2005), para evaluar la asociación de las distancias genéticas ($F_{st}/1-F_{st}$) por pares de individuos (Rousset, 1997), con las distancias geográficas (distancia Euclidiana de punto a punto) de cada sitio de muestreo (Heppenheim *et al.*, 2018). Estos mostrarán el gradiente o la separación geográfica de los individuos de coyotes genéticamente similares. (Wultsch *et al.*, 2016; Heppenheim *et al.*, 2018; Berkman *et al.*, 2019).

VII. RESULTADOS

De un total de 537 muestras colectadas se confirmó un total de 282 pertenecientes a coyotes. Estas se encuentran distribuidas en 31 sitios de muestreo del estado de Querétaro y siete del estado de Guanajuato (Figura 1, ANEXO 1). De estas 282 muestras confirmadas se obtuvieron 70 individuos únicos con el análisis de identidad, de los cuales cuatro presentaron exceso de alelos que no amplificaron (>50% del total de loci sin información) por lo tanto se descartaron de los análisis. De los 66 individuos que se conservaron, se identificaron un total de 19 hembras y 47 machos. Los resultados de las pruebas de asignación arrojaron un total de dos subpoblaciones (detallado en el apartado 7.3), las cuales fueron utilizadas para los análisis posteriores.

7.1 Alelos nulos, desequilibrio de ligamiento y equilibrio Hardy-Weinberg

Los loci mostraron un rango de alelos por locus de 3 -19 con un promedio de 8.3 alelos. La frecuencia de alelos nulos en todos los loci fue baja (<0.25). El análisis de desequilibrio de ligamiento arrojó una asociación significativa para los marcadores ($p = 0.001$), lo que indica que hay loci en *LD*. En el análisis de desequilibrio de ligamiento por pares, de 78 pares de loci, 18 mostraron estar en desequilibrio. Sin embargo, la correlación más fuerte fue entre el locus Cxx.119 y FH2001 con una $r = 0.25$ (ANEXO 3). Estos loci no fueron descartados debido a que, en diversos estudios de mapeo genómico, los loci no se encuentran ligados físicamente (Mellersh *et al.*, 1997; vonHoldt *et al.*, 2010). Además, se han reportado valores significativos para loci en desequilibrio de ligamiento en algunas poblaciones de coyote debido a la estructura genética dentro de la población, endogamia y grupos de coyotes conformados por familiares a lo largo del paisaje (Sacks *et al.*, 2004, Hennessy *et al.*, 2012).

A nivel global varios loci se encontraron fuera del *EHW*, solo para los loci Cxx.172 y FH2293 el resultado no fue significativo (Cuadro 4). Las proporciones de los loci y las subpoblaciones que están fuera de *EHW* son altas (Cuadro 1),

esto indica que gran porcentaje de la población y de las subpoblaciones no se encuentran estables, posiblemente no ocurra apareamiento azaroso. La comparación de la proporción de loci fuera de *EHW* con la prueba χ^2 , análisis de Monte Carlo (*MC*) y corrección de Bonferroni para cada prueba (χ^2 *Bonf.* y *MC Bonf.*) muestran resultados similares para cada subpoblación lo que confirma que la población está fuera de *EHW*. Los loci Cxx.172 y FH2293 no están fuera del *EHW* para ninguna población, y para el grupo del K1 los loci FH2001 y C09.173 también está dentro de *EHW*. Con la corrección de Bonferroni, para ambas pruebas, la proporción que está fuera de *EHW* de la subpoblación K1 es más baja, posiblemente porque hay menor número de individuos muestreados (χ^2 *Bonf.* = 0.538, *MC Bonf.* = 0.307) en comparación a la proporción de la subpoblación K2 (χ^2 *Bonf.* = 0.769, *MC Bonf.* = 0.769) (Cuadro 1). Es común que el apareamiento no azaroso debido a la ubicación geográfica y el apareamiento asertivo en poblaciones resulten en desviaciones al *EHW* (Abramovs *et al.*, 2020).

7.2 Diversidad genética

Para toda la población, la media de la heterocigosis observada ($H_o = 0.633 \pm 0.053$), indica que hay baja diversidad genética. Estos valores de heterocigosis, aunque bajos, corresponden al rango de valores (H_o : 0.6 – 0.8) reportados para la especie *C. latrans* por varios autores (Williams *et al.*, 2003; Hennessy *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2015; Heppenheimer *et al.*, 2018; Hinton *et al.*, 2018; Berkman *et al.*, 2019; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). Por otro lado, el valor $F_{is} = 0.088$ indica que no hay niveles altos de endogamia. Se observa un número efectivo de alelos bajo ($N_e = 5$) (Cuadro 2).

La subpoblación K2 mostró mayor heterocigosis, y la presencia de alelos privados. La subpoblación K1 no mostró alelos privados. El locus C09.173 mostró tendencia a niveles altos de endogamia ($F_{is} = 0.527$), seguido por los loci Cxx.172, FH2054 y AHT121. En cambio, los loci FH2001 y Cxx.172 muestran un mayor nivel de heterocigosis. La heterocigosis más baja correspondiente a la subpoblación K1 que puede deberse a una N baja (Abramovs *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Proporción de loci microsatélites y subpoblaciones fuera de Equilibrio Hardy Weinberg. Se compara con la prueba χ^2 , análisis de Monte Carlo (MC) y la corrección de Bonferroni para la prueba de χ^2 (χ^2 Bonf.) y para el análisis de Monte Carlo (MC Bonf.).

Locus	χ^2	MC	χ^2 Bonf.	MC Bonf.
FH2001	0.5	0.5	0.5	0.5
FH2054	1	1	1	1
FH2088	1	1	1	1
FH2096	1	1	0.5	0.5
FH2611	1	1	1	0.5
AHT121	1	1	1	0.5
C09.173	1	0.5	0	0
CXX119	1	1	1	1
CXX172	0	0	0	0
FH2226	0.5	1	0.5	0.5
FH2293	0	0	0	0
FH2535	1	1	1	1
FH3725	1	1	1	0.5

Subpoblación				
K1	0.692	0.692	0.538	0.307
K2	0.846	0.846	0.769	0.769

7.3 Diferenciación y estructura genética

El análisis de STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) arrojó una $K = 2$ como el número de subpoblaciones más probable para la población de coyote. Los resultados de los análisis indican una estructura conformada por dos grupos bien diferenciados: K1 ($n = 12$) y K2 ($n = 54$) (Figura 2). Todos los individuos fueron asignados con >45% de coeficiente de Q en su grupo. Este resultado coincide con la ΔK que mejor se ajusta según el método de Evanno (Figura 3).

Cuadro 2. Índices estándar para medir la diversidad genética. Media para el número de alelos diferentes (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterocigosidad observada (H_o) con error estándar, heterocigosidad esperada con error estándar (H_e), índice de endogamia (F_{is}) para cada locus y población, y la significancia para equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) ($*** = p < 0.005$, n.s = no significativo), .

Locus	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}	EHW
FH2001		5	3	0.698±0.198	0.569±0.176	-0.227	***
FH2054		8	6	0.552±0.302	0.726±0.167	0.239	***
FH2088		8	5	0.697±0.197	0.790±0.074	0.117	***
FH2096		5	4	0.638±0.222	0.727±0.057	0.121	***
FH2611		6	4	0.686±0.103	0.761±0.053	0.098	***
AHT121		7	4	0.573±0.027	0.720±0.108	0.204	***
C09.173		3	2	0.237±0.055	0.501±0.005	0.527	***
Cxx.119		5	3	0.446±0.362	0.615±0.028	0.275	***
Cxx.172		3	1	0.357±0.098	0.290±0.062	-0.233	n.s
FH2226		9	6	0.724±0.004	0.816±0.051	0.113	***
FH2293		15	9	0.902±0.015	0.887±0.015	-0.017	n.s
FH2535		8	7	0.934±0.066	0.855±0.003	-0.092	***
FH3725		10	6	0.782±0.199	0.774±0.111	-0.011	***
Subpoblación							
K1	12	5	4	0.519±0.073	0.634±0.044	0.182	
K2	51	8	6	0.747±0.064	0.754±0.054	-0.178	
Media entre loci y poblaciones y SE		7	5	0.633±0.053	0.694±0.036	0.088	

Al ubicar espacialmente por subpoblación a los individuos (Figura 4), aparentemente los individuos de la subpoblación K1 se encuentran distribuidos en su mayoría en la zona Noreste del estado de Querétaro. Sin embargo, es posible que estos individuos sean transeúntes provenientes de regiones más al sur. Se identificó al individuo macho CI042 con desplazamiento desde la región sur (San

Miguel Dehetí, Amealco de Bonfil colectado en junio 2019) 63.31 km al noreste (San Miguel Tolimán, Tolimán colectado en septiembre 2019), y finalmente 13.23 km al noreste (San Pablo, Tolimán colectado en noviembre 2019) (distancia geográfica elipsoidal total 78.9 km en cinco meses). Además, se observan dos individuos de la subpoblación K1 en la región sur del área de estudio, que fueron muestreados hace cinco y cuatro años, macho CI012 (Chiteje de la Cruz, Amealco de Bonfil colectado en noviembre 2017) y hembra CI049 (Tetillas, Salvatierra) colectado diciembre 2016 y enero 2020 (Figura 4, A), aunque no es posible saber si estos se establecieron en esa zona o se desplazaron a otro sitio. Tres individuos muestran información genética de ambas subpoblaciones: el individuo macho CI014 (Derramadero, Tolimán colectado en septiembre 2019), con aproximadamente 45% a K1 y 55% a K2, el individuo macho CI003 (Buenavista, Tolimán colectado en noviembre 2019) con 34% a K1 y 65% a K2, y el individuo macho CI017 (El Cerrito, San Juan del Río colectado en marzo 2018), con 73% a K1 y 26% K2. Esto indica muy poco flujo génico entre ambas poblaciones.

La subpoblación K2 se encuentra distribuida en toda el área de estudio. Se identificó solo un macho transeúnte (CI010), que se desplazó desde la región sur (Chiteje de la Cruz, Amealco de Bonfil colectado en octubre del 2017), hacia 24.12 km hacia el norte (Huimilpan colectado en marzo 2018) y por último al 10.42 km al sur (El Rincón, Huimilpan colectado en julio 2019) (Figura 4, B).

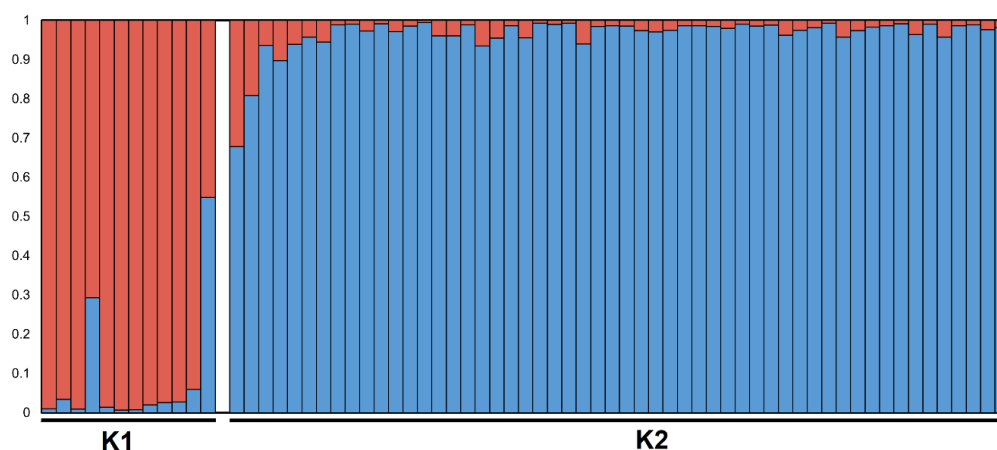


Figura 2. Asignación genética de individuos a dos subpoblaciones (K1 y K2) dentro de la población de coyotes. En el eje Y se observa el coeficiente de +Q

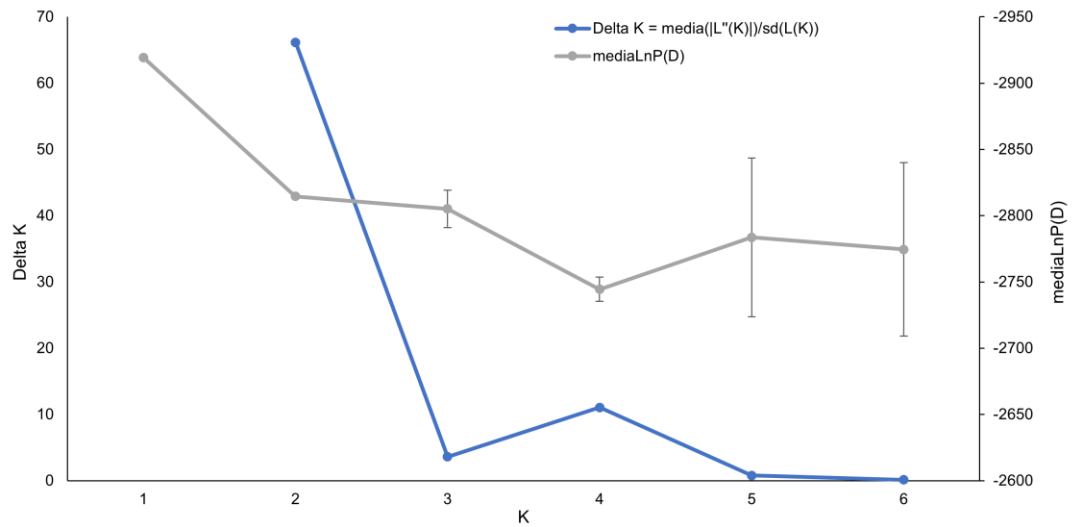


Figura 3. Gráfico de Evanno que muestra la $\Delta K = \text{media}(|L''(K)|)$, y la $\text{mediaLnP}(D)$ que mejor describe la estructura genética para la población de coyote. Se observa que $K = 2$ es el número de subpoblaciones más probable en que se divide la población.

Los análisis de G_{st} por pares, $G'_{st}(\text{Nei})$, $G'_{st}(\text{Hendrik})$ y G''_{st} entre la subpoblación K1 y K2 arrojaron que sí hay diferenciación entre ambas subpoblaciones (Cuadro 3). Los valores de diferenciación de cada análisis indican diferenciación moderada, suficiente para observar estructura dentro de la población.

Cuadro 3. Resumen de estadísticos-G

G_{st}	G'_{st} (Nei)	G'_{st} (Hendrik)	G''_{st}
0.060	0.112	0.359	0.319

El análisis de AMOVA mostró que 94% de la varianza genética se explica por la diferenciación entre los individuos de toda la población del área de estudio, y

8.95% por la diferenciación entre las subpoblaciones, aunque este porcentaje es bajo es significativo ($p = 0.00$), por lo que confirma estructura genética (Cuadro 4). Estos porcentajes pueden deberse a que, al ubicar espacialmente en un mapa a los individuos por subpoblación, la distribución de los individuos de ambos grupos no está restringida a una región en particular (Figura 4).

Cuadro 4. Análisis de Varianza Molécula (AMOVA). Se muestra el porcentaje de variación a distintos niveles: entre poblaciones, entre individuos dentro de las subpoblaciones y entre los individuos. Además, se observan los índices de fijación FIS, FST y FIT.

Fuente de variación	DF	Sum. Sq.	Varianza	
			entre componentes	% de variación
Entre subpoblaciones	1	10.08	0.20	8.95
Entre individuos dentro de las subpoblaciones	64	129.04	-0.07	-3.27
Entre los individuos	66	143	2.16	94.33
Total	131	282.12	2.29	
Índices de fijación				
		Valor p		
FIS	-0.03	0.94		
FST	0.08	0.00		
FIT	0.05	0.61		

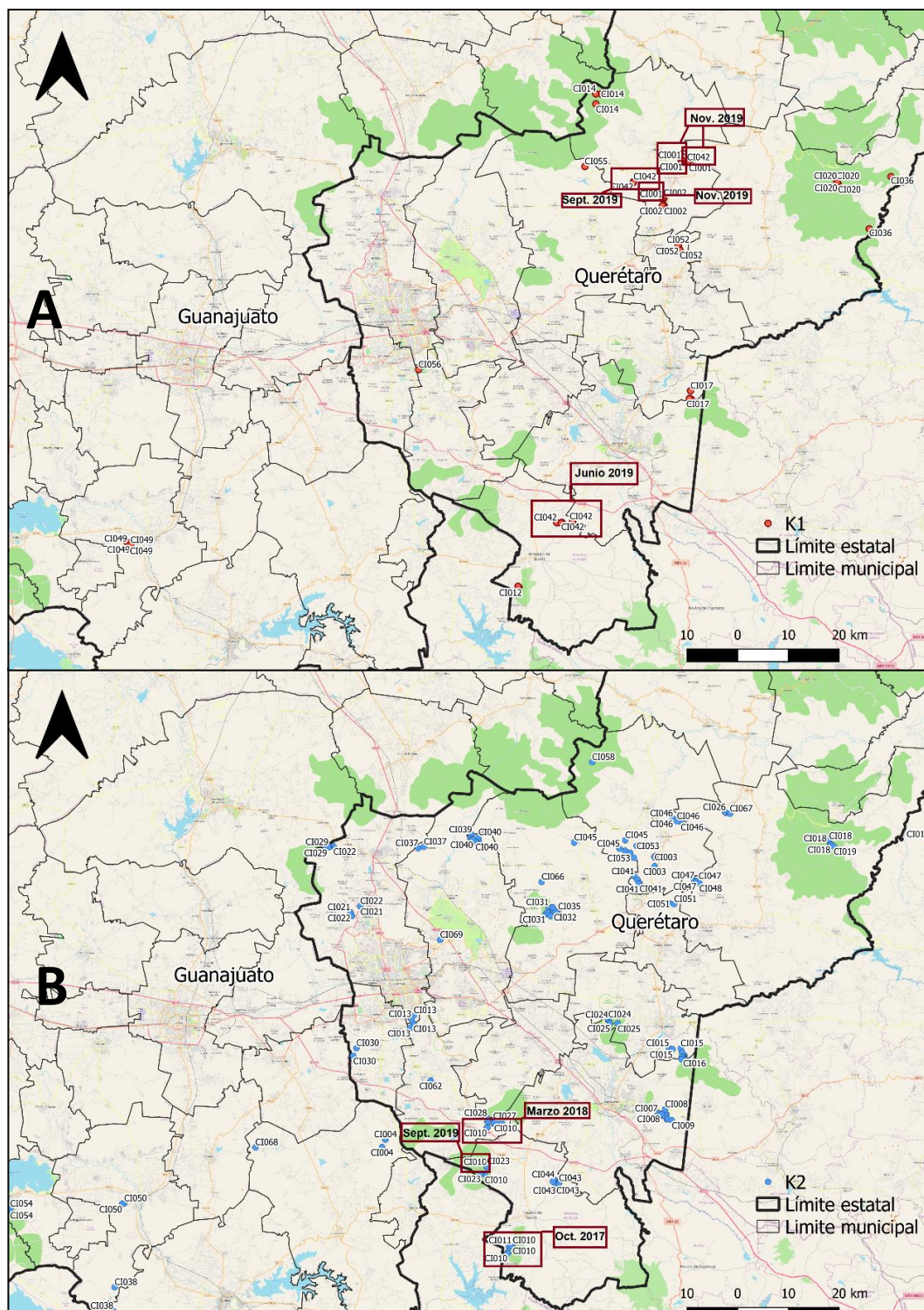


Figura 4. Ubicación espacial de los individuos por subpoblación K1 (rojo) (A) y K2 (azul) (B). Se observa la marca -recaptura de las muestras para los individuos de cada subpoblación (etiquetas de ID) a lo largo del área de estudio. En recuadros rojos la fecha de captura de los individuos de los cuales se detectó movimiento.

El PCA mostró diferenciación genotípica entre las dos subpoblaciones (Figura 5), esto confirma la estructura genética observada en los análisis anteriores. Los alelos que se diferenciaban más entre los individuos fueron los FH2001 alelo 145, FH2054 alelo108, AHT121 alelo 117 y FH3725 alelo 176. Sin embargo, la prueba de Mantel no mostró aislamiento por distancia ($R^2 = -0.001$, $p = 0.48$) como una variable que influya en la diferenciación de las subpoblaciones. Se puede observar a lo largo de la distancia geográfica una distribución lineal sobre distancias genéticas similares (Figura 6).

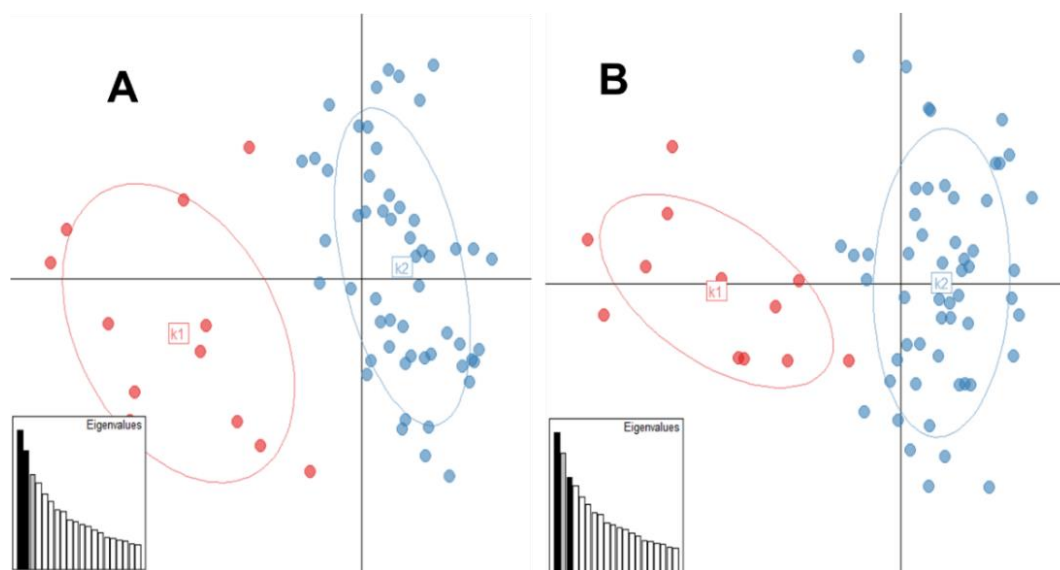


Figura 5. Análisis de componentes principales (PCA). Muestra la diferenciación de la población de coyotes con los 13 microsatélites loci en dos grupos. A) Variación del 18% explicada por ejes 1 y 2. B) Variación del 16.3% explicada por los ejes 1 y 3.

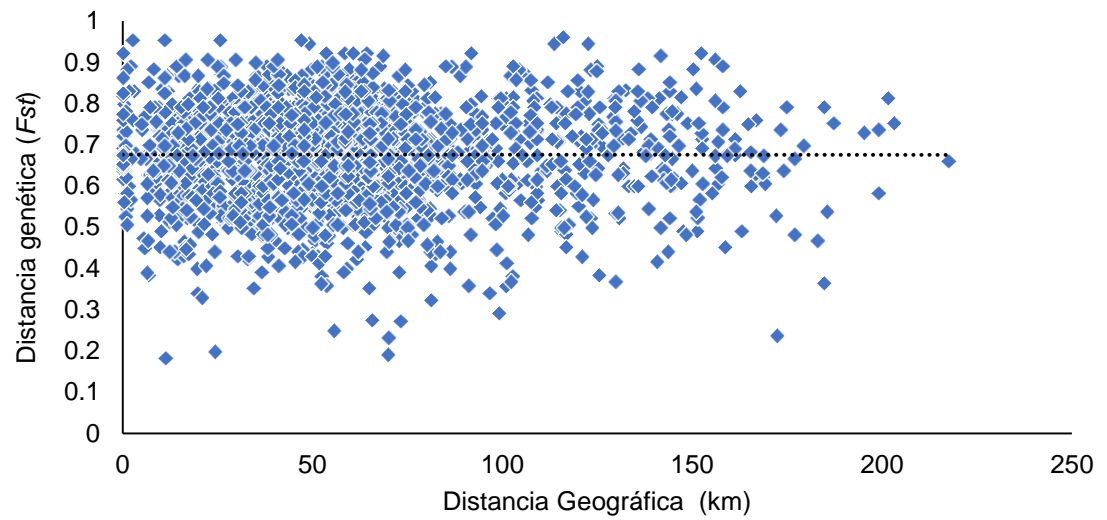


Figura 6. Gráfico de la prueba de Mantel. Los rombos azules representan los individuos comparados por pares, y la correlación que presentan entre la distancia genética (F_{st}) y la distancia geográfica (km),

VIII. DISCUSIÓN

Dentro de la zona de estudio se observó una población subdividida en dos subpoblaciones bien diferenciadas, debido a la presencia de algunos individuos aparentemente transeúntes. Estos resultados rechazan nuestra hipótesis de que la estructura genética está influenciada por las principales carreteras de la región centro de México (Mex-057, Mex-047D y la Mex-045) e indican que no actúan como barreras en el paisaje, y la conectividad funcional de la población de coyote no ha disminuido, o el efecto de las carreteras aún no es detectable.

Se observó una baja diversidad genética para toda la población según el rango observado para la especie, aunque la subpoblación K2 presenta mayor heterocigosidad (Cuadro 5). Los estudios que han observado una reducción en la diversidad genética de coyotes ha sido en poblaciones asociadas a ambientes urbanos, tanto para nuevas poblaciones como para poblaciones ya establecidas (Hennessy *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2015; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). El paisaje del área de estudio es altamente heterogéneo, pues presenta parches de ambientes conservados, rodeado de establecimientos rurales y agrícolas, que también rodean la metrópolis urbana. Pero la asociación entre los grupos genéticos y el tipo de ambiente (urbanización, rural o natural) no fue observada como en otros estudios donde se ha registrado que las poblaciones que viven en ambientes naturales son distintas genéticamente a las que viven en ambientes urbanos, donde se observa la disminución de la diversidad genética (Wandeler *et al.*, 2003; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020). Para identificar si realmente hay reducción de la diversidad genética dentro de la zona de estudio, y si está asociada a la urbanización, se podrían llevar a cabo análisis que comparen los individuos residentes de las zonas naturales y rurales con los individuos establecidos cerca de las zonas urbanas.

Cuadro 5. Comparación de la heterocigosidad observada (*Ho*), heterocigosidad esperada (*He*), *Gst* (este estudio) / *Fst* (otros estudios) y *N* en diferentes estudios sobre genética de poblaciones de coyotes en distintos ambientes.

He	Ho	Fst/Gst	N	Ciudad/Estado	Ambiente	Referencia
0.69	0.63	0.060	66	Querétaro, Mex	Rural/Urbano	Este estudio
0.76	0.74	0.042 – 0.051	31	Los Ángeles, CA	Natural	Adducci II <i>et al.</i> , 2020
0.77	0.74	0.035	84	Nueva York	Natural	DeCandia <i>et al.</i> , 2019
0.76 – 0.77	0.72 – 0.78	-		Nte. California	Rural	Williams <i>et al.</i> , 2003
0.78	0.74	0.030 - 0.040	17	Auburn, AL	Rural	Damm <i>et al.</i> , 2015
0.70 - 0.73	0.65 - 0.73	0.042 – 0.051	57	Los Ángeles, CA	Urbano	Adducci II <i>et al.</i> , 2020
0.71	0.78	0.035	21	Nueva York	Urbano	DeCandia <i>et al.</i> , 2019
0.69	0.69	-	225	Chicago, IL	Urbano	Hennessy <i>et al.</i> , 2012
0.71	0.84	0.030 - 0.040	4	Auburn, AL	Urbano	Damm <i>et al.</i> , 2015
0.74 – 0.77	0.68 - 0.70	0.030 – 0.037	68	Los Ángeles, CA	Urbano	Riley <i>et al.</i> , 2006

Las pruebas de asignación, como las utilizadas en este estudio (STRUCTURE y PCA), tienen de 65 a 100% de precisión para asignar individuos en su población natal, estos porcentajes son más acertados cuando las poblaciones están genéticamente diferenciadas. De este modo, las pruebas de asignación son capaces de estimar la presencia individuos dispersores o transeúntes similares a los estimados por el método de marca-recaptura. (Berry *et al.*, 2004). Por lo que, podemos confiar en que los dos grupos detectados corresponden a grupos de coyotes bien definidos. En uno de los grupos se concentra el mayor número de individuos de una misma subpoblación, mientras que en el otro solo hay pocos individuos que muestran un desplazamiento a través del área de estudio, lo que sugiere que son individuos transeúntes. De este modo, los individuos del grupo más pequeño pueden identificarse como individuos transeúntes que provienen de una población al sur de la zona de estudio (subpoblación K1), y el grupo más grande como la población local (subpoblación K2) conformada por individuos residentes. Es común que en un paisaje, la población de coyotes este conformada aproximadamente por 70% de individuos residentes y 30% de transeúntes (Chamberlain *et al.*, 2000; Hinton *et al.*, 2015), y los resultados de este estudio concuerdan con estos porcentajes.

Se plantea que los individuos de la subpoblación K1 (nueve machos y tres hembras) pueden ser transeúntes, debido a que estos suelen separarse de la manada y viajar mayores distancias en busca de nuevos territorios como se ha observado en otros casos (Bekoff y Gese, 2003), esto puede variar entre sexos ya que depende del tipo de ambiente y de la temporada biológica (Andelt y Gipson, 1979). Puede ocurrir que en algunos casos la urbanización pueda facilitar la dispersión de los individuos (Miles *et al.*, 2018), en el caso de los coyotes, se ha reportado que las carreteras pueden ayudar a la dispersión de los individuos transeúntes, pues estos tienen preferencia por áreas cercanas a ellas (Hinton *et al.*, 2015; Chamberlain *et al.*, 2021), ya que las carreteras pueden reducir el costo energético al desplazarse y facilitar el forrajeo (Hinton *et al.*, 2015). Los transeúntes tienen comportamiento nómada, pues suelen hacer uso de espacios pequeños por periodos cortos antes de establecerse (Hinton *et al.*, 2015). Este comportamiento fue observado con el individuo CI042, que en seis meses fue identificado en cuatro sitios distintos con dirección hacia el norte. Es posible que los coyotes del grupo K1 pertenezcan a una población ubicada más al sur que está colonizando recientemente el área de estudio, por lo que no ha pasado suficiente tiempo para ver un desplazamiento del grupo K2 o una interacción reproductiva entre ambos grupos. Se ha observado que, si bien los transeúntes contribuyen muy poco a la reproducción (Chamberlain *et al.*, 2021), eventualmente pueden cambiar su estatus de transeúnte a residente cuando se establecen en un territorio libre, o reemplazan a un individuo residente después de su muerte, y establecerse con la pareja de este (Hinton *et al.*, 2015; Sasmal *et al.*, 2019). De esta manera los individuos transeúntes contribuyen en la dinámica de una metapoblación e influenciar en la estructura poblacional (Hinton *et al.*, 2015).

En los sitios de muestreo, la población local muestra grupos de coyotes residentes. Según lo reportado para la ecología de la especie, es común que estos grupos estén conformados por los parentales, que defienden y mantienen su territorio sin desplazarse más allá de su ámbito hogareño, con las crías o los

juveniles (Gese, 2001; Hinton *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio no se puede estar seguro de la actividad individual y patrones de actividad de los coyotes, ya que estos no fueron monitoreados. Es común encontrar a los coyotes en parejas reproductivas, que son monógamas y suelen durar varios años juntos, o en grupos pequeños conformados por individuos emparentados (Hennessy *et al.*, 2012). Si dos individuos exhiben 30% de empalme de territorio compartido, se considera que pueden ser pareja o miembros de un grupo (Patterson y Messier, 2001; Hennessy *et al.*, 2012). Los rangos de ámbito hogareño de los residentes no se traslapan, pero el rango de ámbito hogareño de los transeúntes sí se traslapa con el de los residentes (Kamler y Gipson, 2000; Gehrt *et al.*, 2011), esto puede observarse con los individuos identificados como transeúntes de la subpoblación K2, que fueron identificados en sitios donde posiblemente ya se encontraban establecidos residentes de la subpoblación K1.

En el caso de la población de coyotes dentro de la zona de estudio, las evidencias indican que la conectividad funcional no ha disminuido al grado de fragmentar la población local. La estructura genética se genera por la influencia de varios factores actuales e históricos (Habel *et al.*, 2014). Por lo que hay varias razones posibles para el aparente mantenimiento de la conectividad funcional en la zona de estudio, entre las cuales, además de influir el comportamiento de la especie, influye el número de generaciones que han transcurrido apartir de la construcción de las carreteras y la permeabilidad actual de las carreteras. Realizar los análisis de genética de poblaciones mencionados en este trabajo en la misma población, pero en distintos periodos de tiempo, podría mostrar una diferenciación genética no observada actualmente.

Sobre la influencia del comportamiento de la especie en la conectividad funcional, se ha observado que los individuos de coyote que viven cercanos a zonas con cierto grado de urbanización son más audaces y exploradores (Gehrt *et al.*, 2011). Este puede ser un comportamiento aprendido y de selección que surgió de manera gradual hace varias generaciones (Breck *et al.*, 2019). Para minimizar

el riesgo, los patrones de actividad pueden ser influenciados por el tipo de perturbación local que han experimentado los individuos de coyote dentro de una región (Kitchen *et al.*, 2000). Esto a la larga afecta a la población, pues las crías que han nacido en zonas urbanas, suburbanas y rurales deben adaptarse mediante el aprendizaje de habilidades obtenidas de sus padres (Breck *et al.*, 2019), que han habituado su comportamiento para moverse entre la población humana, cruzar carreteras, evitar autos y obtener recursos en este tipo de ambientes perturbados (Gehrt, *et al.*, 2011; Schell *et al.*, 2018). Debido a su comportamiento principalmente crepuscular y nocturno en zonas con presencia humana, se ha observado que los coyotes prefieren moverse através de las carreteras cuando no hay tanto tráfico. Su éxito se basa en que los individuos evitan, espacial y temporalmente, las actividades humanas (Tigas *et al.*, 2002). Si está adaptación local a ambientes alterados y fragmentados no ocurriera, el flujo génico estaría limitado aún más en presencia de las carreteras como barreras (Adducci II *et al.*, 2020).

Junto con el comportamiento de la especie, es probable que las carreteras no muestren aún una repercusión notable, incluso mediante análisis genéticos, en la conectividad funcional dentro del área de estudio, ya que la gran mayoría de las carreteras llevan relativamente poco tiempo de ser construidas, a excepción del tramo carretero México-Querétaro de la carretera federal Mex-057, construida en 1958 (CAPUFE, 2021). Esta carretera atraviesa zonas agrícolas que se encuentran en los alrededores de la zona metropolitana. En algunos de esos tramos carreteros, las orillas de las carreteras presentan vegetación, las bardas que separan los carriles son bajas y permiten el paso de los individuos, y presentan camellones centrales amplios (aprox. 12 m de ancho) con presencia de árboles aislados (ej. tramo carretero Mex-45D). Estas características hacen que ciertas zonas de la carretera sean permeables, al permitir que los individuos puedan cruzarla (Grilo *et al.*, 2008; Delgado-Trejo *et al.*, 2018).

En la zona de estudio no se observan pasos de fauna silvestre que permitan el cruce seguro en puntos estrategicos, solo existen señalamientos de cruce de fauna en algunos sitios. Los canales de drenaje pueden ayudar a cruzar las carreteras a individuos de diferentes especies, sin embargo se ha observado que a pesar de que haya presencia de canales, los coyotes prefieren cruzar las carreteras que presentan vegetación en las orillas cuando el tráfico es bajo (Tigas *et al.*, 2002; Grilo *et al.*, 2008). En este caso, para identificar cual es la zona de cruce es necesario monitorear los movimientos de los coyotes mediante telemetría (Tigas *et al.*, 2002). Aunque los coyotes tienen preferencia del uso de carreteras para moverse, es muy probable que la mortalidad por atropellamiento sea alta (Tigas *et al.*, 2002; Grilo *et al.*, 2008). Para la zona de estudio no existe información sobre la tasa de atropellamientos del coyote, pero sí para felinos, aunque para estos los registros también son escasos (González-Gallina e Hidalgo-Mihart, 2018). En el periodo de 2016 al 2020 se tiene un total de 364 registros de accidentes automovilísticos debido a colisión con fauna (171 para el estado de Guanajuato, 193 para Querétaro) (INEGI, 2022). Sin embargo, estos solo son reportes enfocados en accidentes de tránsito donde resultaron afectadas personas o vehículos, y no se menciona la especie, por lo que no refleja una estadística de mortalidad por atropellamiento para la fauna silvestre, ya que muchos de estos no han sido registrados.

Es recomendable el monitoreo de individuos de coyote mediante telemetría, ya que nos puede brindar un mayor panorama del comportamiento de estos dentro del área de estudio, para así entender mejor la conectividad funcional de la especie dentro de este tipo de paisajes conformados por diversos ambientes con distinto grado de perturbación. Además, se podrían identificar los corredores y caminos que mantienen la conectividad del paisaje, y que son utilizados por los individuos para desplazarse dentro del área (Tigas *et al.*, 2008). También, es necesario llevar a cabo estudios similares de conectividad funcional con otras especies presentes en el área de estudio, con el fin de identificar en mayor grado

los efectos de la urbanización y fragmentación de los ambientes (Adducci II *et al.*, 2020).

IX. CONCLUSIONES

Nuestros datos indican que la conectividad funcional de la población de coyote en la región del centro de México se ha mantenido, por lo que no hay evidencia de que ha disminuido el flujo génico al grado de fragmentarse en poblaciones más pequeñas y diferenciadas genéticamente. La estructura genética observada sugiere que la población está conformada por individuos residentes establecidos, que se encuentran en toda el área de estudio y por algunos individuos presumiblemente transeúntes, que posiblemente provengan de una población que reside en la zona sur fuera de la región de estudio. De acuerdo con esta hipótesis, los resultados sugieren que las carreteras federales del área de estudio aún no están actuando como barreras para el movimiento de los individuos o el efecto de barrera aún no es detectable en la población. Esto puede deberse a la reciente construcción de las carreteras, y la permeabilidad que se presenta en ciertos tramos carreteros. Además, los coyotes tienen una capacidad de adaptación alta para sobrevivir y desplazarse en ambientes con diferentes grados de perturbación, que puede, incluso, permitir a los individuos utilizar las carreteras para desplazarse más fácilmente. A pesar de que la población de coyotes local no está fragmentada dentro del área de estudio presenta tendencia a diversidad genética baja, probablemente asociado a la urbanización, como ha sido observado en diversos estudios.

X. LITERATURA CITADA

- Abramovs K., A. Brass y M. Tassabehji. 2020. Hardy-Weinberg Equilibrium in the Large Scale Genomic Sequencing Era. *Frontiers in Genetics*, 11(210): 1-11
- Adams J. R., B. T. Kelly y L. P. Waits. 2003. Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology*, 12(1): 2175-2186
- Adducci II A., J. Jasperse, S. Riley, J. Brown, R. Honeycutt y J. Monzón. 2020. Urban coyotes are genetically distinct from coyotes in natural habitats. *Journal of Urban Ecology*, 1-11
- Aguilar R., E. J. Cristóbal-Pérez, F. J. Balvino-Olvera, M. de Jesús Aguilar-Aguilar, N. Aguirre-Acosta, L. Ashworth, J. A. Lobo, S. Martén-Rodríguez, E. J. Fuchs, G. Sánchez-Montoya, G. Bernardello y M. Quesada. 2019. Habitat fragmentation reduces plant progeny quality: a global synthesis. *Ecology Letters*, 22(7):1163-1173
- Andelt W. F. y P. S. Gipson. 1979. Home Range, Activity and Daily Movements of Coyotes. *The Journal of Wildlife Management*, 43(4): 944-951
- Aranda Sánchez J. M. 2012. *Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México. Primera edición*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D.F., Pág. 105
- Arroyave M de, P., C. Gómez, M. E. Gutiérrez, D. P. Múnera, P. A. Zapata, I. C. Vergara, L. M. Andrade y K. C. Ramos. 2006. Impactos de las carreteras sobre la fauna silvestre y sus principales medidas de manejo. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquía*, 5(1): 45-57
- Atkinson K. y D. Shackleton. 1991. Coyote, *Canis latrans*, ecology in a rural-urban environment. *Canadian Field-Naturalist*, 105(1):49-54
- Bekoff M., y E. M. Gese. 2003. Coyote (*Canis latrans*). Pp: 467-481. En: Feldhamer G. A., B. C. Thompson y J. A. Chapman (editores). 2003. *Wild*

- Mammals of North America: Biology, Management and Conservation*. 2da. Edición, Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Beninde J., S. Feldmeier, M. Werner, D. Peroverde, U. Schulte, A. Hochkirch y M. Veith. 2016. Cityscape genetics: structural vs. functional connectivity of an urban lizard population. *Molecular Ecology*, 25(1):4984-5000
- Bennet V. J. 2017. Effects of Road Density and Pattern in the Conservation of Species and Biodiversity. *Current Landscape Ecology Reports*, 2(1): 1-11
- Berkman, L. K., J. L. Frair, P. E. Marquardt, D. M. Donner, J. C. Kilgo y C. M. Whipps. 2019. Spatial Genetic Analysis of Coyotes in New York State. *Wildlife Society Bulletin*, 1:1-10
- Berry O., M. D. Tocher y S. D. Sarre. 2004. Can assignment test measure dispersal? *Molecular Ecology*, 13(1): 551 - 561
- Bowman J., N. Cappuccino, y L. Fahrig. 2002. Patch size and population density: The effect of immigration behavior. *Ecology and Society*, 6(1):9
- Breck S., S. Poessel, P. Mahoney y J. Young. 2019. The intrepid urban coyote: a comparison of bold and exploratory behavior in coyotes from urban and rural environments. *Scientific Reports*, 9(1):2104
- Breen M., S. Jouquand, C. Renier, C. S. Mellersh, C. Hitte, N. G. Holmes, A. Chéron, N. Suter, F. Vignaux, A. E. Bristow, C. Priat, E. McCann, C. André, S. Boundy, P. Gitsman, R. Thomas, W. L. Bridge, H. F. Spriggs, E. J. Ryder, A. Curson, J. Sampson, E. A. Ostrander, M. M. Binns y F. Galibert. 2001. Chromosome-Specific Single Locus FISH Probes Allow Anchorage of an 1800-Marker Integrated Radiation-Hybrid/Linkage Map of the Domestic Dog Genome to All Chromosomes. *Genome Research*, 11(1): 1784-1795
- CAPUFE (Caminos y Puentes Federales). 2021. Viajando por la historia. Plaza de Cobro Palmillas. Disponible en: <https://www.gob.mx/capufe/es/articulos/viajando-por-la-historia-plaza-de-cobro-palmillas?idiom=es> (Consultado el 18 de febrero del 2022)
- Camps P., M. Prado y J. Carlos. 2015. Mexican Diamond: The Bajío under the Eyes of the ID Band the Banco de México. *Trayectorias*, 17(41): 29-51

- Carlsson J. 2008. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, 99(6): 616-623
- Carr L. W. y L. Fahrig. 2001. Effects of road traffic on two amphibian species of differing vagility. *Conservation Biology*, 15(4): 1071-1078
- Cervantes-Huerta R., F. Escobar, J. H. García-Chávez y A- González-Romero. 2017. Vertebrate Roadkills in Three Road Types in the Central Mountainous Region of Veracruz, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*, 33(3): 472-481
- Challenger A. 2014. Paisajes naturales y humanos de México. En: R. Valdez y J. A. Ortega (editores). 2014. *Ecología y manejo de fauna silvestre en México*. Editorial del Colegio de Posgraduados, Texcoco, Edo. De México. Pp: 21-52
- Chamberlain M. J., C. D. Lovell y B. D. Leopold. 2000. Spatial-use patterns, movements and interactions among adult coyotes in central Mississippi. *Canadian Journal of Zoology*, 78(1): 2087 - 2095
- Chamberlain M. J., B. S. Cohen, P. H. Wightman. 2021. Fine-scale movements and behaviors of coyotes (*Canis latrans*) during their reproductive period. *Ecology and Evolution*, 11(1): 9575 - 9588
- Chaves L., I. Días y C. Pomilla. 2010. Extraction of genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAmp DNA Stool Mini Kit. Disponible en: <https://research.amnh.org/genomics/Resources/Extractiongenomic-DNA> (Consultado el 12 de octubre del 2020)
- CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 2014. Apéndices. Disponible en: <http://www.cites.org/esp/disc/species.php> (Consultado el 8 de octubre del 2020)
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1997. Provincias Biogeográficas de México. Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en:

- http://conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/rbiog4mgw.xml?_xsl=/db/metadatos/_xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no (Consultado el 18 de marzo del 2021)
- CONAPO (Consejo Nacional de Población), SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social), INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2015. Delimitación de las zonas metropolitanas de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapo/documentos/delimitacion-de-las-zonas-metropolitanas-de-mexico-2015> (Consultado el 25 de marzo del 2021)
- CONAPO (Consejo Nacional de Población), SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social), INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2015. Delimitación de las zonas metropolitanas de México. Censo 2020. Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2020/dgeiawf.semarnat.gob.mx_8080/approot/dgeia_mce/html/RECUADROS_INT_GLOS/D1_SISTEMA_URBANO/D1_R_SISCDS00_01.htm (Consultado el 01 de junio del 2022).
- Cove M. C., L. E. Pardo, R. Manuel Spínolam, V. L. Jackson y J. C. Sáenz. 2012. Coyote *Canis latrans* (CARNIVORA: CANIDAE) Range Extension in Northeastern Costa Rica; Possible Explanations and Consequences. *Revista Latinoamericana de Conservación*, 2(2): 82-86
- Crooks K. R. 2002. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 16(2): 488-502
- Cruz-Espinoza A., G. González y A. Santos. 2008. Dieta y abundancia relativa del coyote (*Canis latrans*) en un bosque templado de la sierra Norte de Oaxaca, México. En: Lorenzo C., E. Espinoza y J. Ortega (editores). *Avances en el estudio de los mamíferos de México II*. Asociación Mexicana de Mastozoología, México, D.F. Pp: 239-252
- Cupul F. 2002. Víctimas de la carretera: Fauna apachurrada. *Gaceta CUC*. Departamento de Ciencias. Centro Universitario de la Costa.
- Dakin E. E. y J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(1): 504-509

- Damm D. L., J. B. Armstrong, W. M. Arjo y A. J. Piaggio. 2015. Assessment of Population Structure of Coyotes in East-Central Alabama using Microsatellite DNA. *Southeastern Naturalist*, 14(1): 106-122
- DeCandia A. L., C. S. Henger, A. Krause, L. J. Gormezano, M. Weckel, C. Nagy, J. Munshi-South y B. M. vonHoldt. 2019. Genetics urban colonization: neutral and adaptative variation in coyotes (*Canis latrans*) inhabiting the New York metropolitan area. *Journal of Urban Ecology*, 5(1): 1-12
- Delgado-Trejo C., R. Herrera-Robledo, N. Martínez-Hernández, C. Bedolla-Ochoa, C. E. Hart, J. Alvarado-Díaz, I. Suazo-Ortuño, H. Nava-Bravo, L. López-Toledo y E. Mendoza. 2018. Vehicular Impact as a Source of Wildlife Mortality in the Western Pacific Coast of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(1): 1234-1244
- De la Llata Gómez R., G. Muñoz Arango, A. Lozano Guzmán, R. Téllez Gutiérrez y S. A. Damián Hernández. 2001. Libramientos Carreteros de la Ciudad de Querétaro. Centro Queretano de Recursos Naturales, Reporte Técnico 2. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ), Querétaro, Qro., México.
- Escalante T., J. J. Morrone y G. Rodríguez. 2007. La distribución de los mamíferos terrestres y la regionalización biogeográfica natural de México. *Tópicos en Sistemática, Biogeografía, Ecología y Conservación de Mamíferos* (Sánchez-Rojas G. y A. E. Rojas-Martínez, editores.) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, Pp 9-17
- Evanno G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(1): 2611-2620
- Ewers R. M., y R. K. Didham. 2006. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(1):117-142

- Excoffier L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(1):564-567
- Fahrig L. 2017. Ecological Responses to Habitat Fragmentation Per Se. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1): 1 – 23
- Fahrig L., V. Arroyo-Rodríguez, J. R. Bennett, V. Boucher-Lalonde, E. Cazetta, D. J. Currie, F. Eigenbrod, A. T. Ford, S. P. Harrison, J. A. G. Jaeger, N. Koper, A. E. Martin, J. L. Martin, J. P. Metzger, P. Morrison, J. R. Rhodes, D. A. Saunders, D. Simberloff, A. C. Smith, J. I. Watling. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity? *Biological Conservation*, 230:179–186
- FIDERCO (Fideicomiso para el Desarrollo de la Región Centro-Occidente). 2005. Programa de Desarrollo de la Región Centro Occidente (PDRCO). Disponible en: <http://www.centrooccidente.org.mx/fiderco.html> (Consultado el 18 de febrero del 2021)
- Forman R. T. T. y R. D. Deblinger. 2000. The Ecological road-effect zone for transportation planning, and a Massachusetts highway example. *Conservation Biology*, 14(1): 36 - 46
- Francisco L. V., A. A. Langston, C. S. Mellersh, C. L. Neal y E. A. Ostrander. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian genome*, 7(1): 359-362
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126(1): 131-140
- Frankham R., J. D. Ballou, K. Ralls, M. D. B. Eldridge, M. R. Dudash, C. B. Fenster, R. C. Lacy y P. Sunnucks. 2017. Why should we conserve genetic diversity? *En*: Frankham, R., J. D. Ballou, K. Ralls, M. D. B. Eldridge, M. R. Dudash, C. B. Fenster, R. C. Lacy y P. Sunnucks. 2017. *Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*. Oxford University Press, Oxford, UK Pp: 2-4

- Gantz G. y F. F. Knowlton. 2005. Seasonal activity areas of coyotes in the Bear River Mountains of Utah and Idaho. *Journal of Wildlife Management*, 69(4): 1652-1659
- Gardmark A., K. Enberg, J. Ripa, J. Laakso y V. Kaitala. 2003. The Ecology of Recovery. *Annales Zoologici Fennici*, 40(40):131-144
- Garnier-Géré P. y L. Chikhi. 2013. Population Subdivision, Hardy-Weinberg Equilibrium and the Wahlund. *eLS. Wiley & Sons, Ltd: Chichester*
- Gehrt S. 2007. Ecology of coyotes in urban landscapes. 12th *Wildlife Damage Management Conference*, 303 -311
- Gehrt S., J. L. Brown y C. Anchor. 2011. Is the Urban Coyote a Misanthropic Synanthrope? The Case from Chicago. *Cities and the Environment*, 4(1): 1-23
- Gese E. 2001. Territorial defense by coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming: Who, how, where, when and why. *Canadian Journal of Zoology*, 79(1): 980-987
- González-Gallina A. y M. G. Hidalgo-Mihart. 2018. A Review of Road-killed Felids in Mexico. *THERYA*, 9(2):147-159
- Grilo C., J. A. Bissonette y M. Santos-Reis. 2008. Response of carnivores to existing highway culverts and underpasses: Implications for road planning and mitigation. *Biodiversity and Conservation*, 17(1): 1685-1699
- Grinder M. I. y P. R. Krausman. 2001. Home range, habitat use and nocturnal activity of coyotes in an urban environment. *The Journal of Wildlife Management*, 65(4): 887-898
- Gruber B. y A. Adamack. 2019. PopGenReport: A simple framework to analyse population and Landscape Genetic Data. *R package version 3.0.4*
- Guillot G., A. Estoup, F. Mortier y J. F. Cosson. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(1): 1261-1280
- Habel J. C., M. Husemann, A. Finger, P. D. Danley y F. E. Zachos. 2014. The relevance of time series in molecular ecology and conservation biology. *Biological Reviews*, 89(1): 484-492

- Haddad N. M., L. A. Brudvig, J. Clobert, K. F. Davies, A. Gonzalez, R. D. Holt, T. E. Lovejoy, J. O. Sexton, M. P. Austin, C. D. Collins, W. M. Cook, E. I. Damschen, R. M. Ewers, B. L. Foster, C. N. Jenkins, A. J. King, W. F. Laurance, D. J. Levey, C. R. Margules y J. R. Townshend. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, 1(2):1-9
- Hanski I. 1998. Metapopulation dynamics. *Nature*, 396(1):41-49
- Hanski I. y O. Ovaskainen. 2019. Metapopulation models. *Encyclopedia of Ecology (Second edition)*, 2(1): 136-144
- Havlick D. 2004. Roadkill. *Conservation magazine*, 5(1):30-34
- Hendrik P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(1): 1633-1638
- Hennessy C. A., J. Dubach y S. D. Gehrt. 2012. Long-term pair bonding and genetic evidence for monogamy among urban coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Mammalogy*, 93(3): 732-742
- Heppenheimer E., D. S. Cosio, K. E. Brzeski, D. Caudill, K. Van Why, M. J. Chamberlain, J. W. Hinton y B. vonHoldt. 2018. Demographic history influences spatial patterns of genetic diversity in recently expanded coyote (*Canis latrans*) populations. *Heredity*, 120(1):183-195
- Hidalgo-Mihart M. G., L. Cantú-Salazar, C. A. López-González, E. Martínez-Meyer y A. González-Romero. 2001. Coyote (*Canis latrans*) Food Habits in a Tropical Deciduous Forest of Western Mexico. *The American Midland Naturalist*, 146(1):210-216
- Hidalgo-Mihart M. G., L. Cantú-Salazar, A. González-Romero y C. A. López-González. 2004. Historical and present distribution of coyote (*Canis latrans*) in Mexico and Central America. *Journal of Biogeography*, 31(1): 2025-2038
- Hill J. E., T. L. DeVault y J. L. Belant. 2019. Cause-specific mortality of the world's terrestrial vertebrates. *Global Ecology and Biogeography*, 28(1): 680 - 689

- Hinton J.W., F. T. van Manen, M. J. Chamberlain. 2015. Space Use and Habitat Selection by Resident and Transient Coyotes (*Canis latrans*). *PLoS ONE*, 10(7): e0132203
- Hinton J. W., E. Heppenheimer, K. M. West, D. Caudill, M. L. Karlin, J. C. Kilgo, J. J. Mayer, K. V. Miller, M. Walch, B. vonHoldt y M. J. Chamberlain. 2018. Geographic patterns in morphometric and genetic variation for coyote populations with emphasis on southeastern coyotes. *Ecology and Evolution*, 9(1): 3389-3404
- Hody J. W. y R. Kays. 2018. Mapping the expansion of coyotes (*Canis latrans*) across North and Central America. *ZooKeys*, 759(1): 81-97
- Honnay O. 2008. Genetic Drift. *Encyclopedia of Ecology*, 2(3):114-117
- Iglesias C. 2002. El coyote, ¿especie introducida o invasora? En: dirección de Investigación y Documentación Científica UNACHI (editor). *Coyote en Panamá impacto socioeconómico*. Disponible en: http://www.unachi.ac.pa/assets/descargas/vip/investigacion_sobre_el_coyote_p.pdf (Consultado el 20 de mayo del 2021)
- Huijser M. P., P. McGowen, J. Fuller, A. Hardy, A. Kociolek, A. P. Clevenger, D. Smith y R. Ament. 2008. Wildlife-Vehicle Collision Reduction Study: Report Congress. U.S. Department of Transportation. Federal Highway Administration. Reporte No. FHWA-HRT-08-034
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2017. Uso de suelo y vegetación. Serie VI. Conjunto nacional. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/temas/usosuelo/#Mapa> (Consultado el 26 de octubre del 2020)
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2021. Anuario estadístico y geográfico por entidad Federativa 2020. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825197513.pdf (Consultado el 18 de mayo del 2021).

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2022. Accidentes de Tránsito en Zonas Urbanas y Suburbanas. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/app/tabulados/interactivos/?px=ATUS_4&bd=ATUS&idrt=168&opc=t (Consultado el 16 de marzo del 2022).
- Janecka J. E., M. E. Tewes, I. A. Davis, A. M. Haines, A. Caso, T. L. Blankenship y R. L. Honeycutt. 2016. Genetic Differences in the response to landscape fragmentation by a habitat generalist, the bobcat, and a habitat specialist, the ocelot. *Conservation Genetics*, 17(1):1093-1108
- Jombart T. y Z. N. Kamvar. 2020. adegenet: Exploratory Analysis of Genetic and Genomic Data. *R package version 2.1.3*
- Jost L., F. Archer, S. Flanagan, O. Gaggiotti, S. Hoban y E. Latch. 2017, Differentiation measures for conservation genetics. *Evolutionary Applications*, 11(1): 1139-1148
- Kalinowski S. T., M. L. Taper y T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(1): 1099-1106
- Kamler J. F. y P. S. Gipson. 2000. Space and hábitat use by resident and transient coyotes. *Canadian Journal of Zoology*, 78(1): 2106-2111
- Kamvar Z. N. y J. F. Tabima. 2021. Poppr: Genetic Analysis of Populations with Mixed Reproduction. *R package version 2.9.3*
- Kane N. 2011. Should I use FST, G'ST or D? The Molecular Ecologist. *News and commentary for ecology, evolution and everything in between*. Disponible en: <https://www.molecular ecologist.com/2011/03/02/should-i-use-fst-gst-or-d-2/> (Consultado el 27 de octubre del 2021)
- Kays R. 2018. *Canis latrans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/3745/163508579> (Consultado el 8 de octubre del 2020)
- Kingman, J. F. C. 1982. The Coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13(1): 235-248

- Kiselyova T. Y., J. Kantanen, N. I. Vorobyov, B. E. Podoba y V. P. Terletsky. 2014. Linkage Disequilibrium Analysis for Microsatellite Loci in Six Cattle Breeds. *Russian Journal of Genetics*, 50(4): 406-414
- Kitchen A. M., E. M. Gese y E. R. Schauster. 2000. Changes in coyote activity patterns due to reduced exposure to human persecution. *Canadian Journal of Zoology*, 78(1): 853 - 857
- Kohn M. H. y R. K. Wayne. 1997. Facts from feces revisited. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 12(6): 223-227
- Lookingbill T. R. y E. S. Minor. 2017. Assessing Multi-Scale Landscape Connectivity Using Network Analysis. En: Gergel S. E. y M. G. Turner (editores.) *Learning Landscape Ecology. A Practical Guide to Concepts and Techniques*. 2da edición. Springer-Verlag Nueva York.
- López-González C. A. 2011. Record of a White-colored coyote (*Canis latrans*) in the Chihuahuan Desert of Durango, Mexico. *Acta Zoologica Mexicana (nueva serie)*, 27(3): 871-873
- Lukasik V. M. y S. M. Alexander. 2011. Spatial and Temporal Variation of Coyote (*Canis latrans*) diet in Calgary, Alberta. *Cities and the Environment*, 4(1): 1-23
- Magurran A. E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing. London. 256 p.
- Mahan B. R. 1978. Occurrence of melanistic canids in Nebraska. *Proceeding of the Nebraska Academy of Science*, 5(1): 121-122
- Manel S., M. K. Schwartz, G. Luikart y P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18(4): 189-197
- Mayo O. 2008. A Century of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Research and Human Genetics*, 11(3): 249-256
- Meirmans P. y P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure: *Fst* and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11(1): 5-18

- Mellersh C. S., A. A. Langston, G. M. Acland, M. A. Fleming, K. Ray, N. A. Wiegand, L. V. Francisco, M. Gibbs, G. D. Aguirre y E. A. Ostrander. 1997. A linkage Map of the Canine Genome. *Genomics*, 46(1): 326-336
- Méndez E., F. Delgado y D. Miranda. 1981. The coyote (*Canis latrans*) in Panama. *International Journal for the Study of Animal Problems*, 2(1): 252-255
- Méndez-Carvajal P. y R. Moreno. 2014. Mammalia, Carnivora, Canidae, *Canis latrans* (Say, 1823): Actual distribution in Panama. *Check List, Journal of Species List and Distribution*, 10(2): 376-379
- Miles L. S., J. C. Johnson, R. J. Dyer y B. C. Verrelli. 2018. Urbanization as a facilitator of gene flow in a human health pest. *Molecular Ecology*, 27(16): 3219 – 3230
- Miller M. P. 2005. Alleles in Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity*, 96(6): 722 - 724
- Mohlke K. L., E. M. Lange, T. T. Valle, S. Ghosh, V. L. Magnuson, K. Silander, R. M. Watanabe, P. S. Chines, R. N. Bergman, J. Tuomilehto, F. S. Collins y M. Boehnke. 2001. Linkage Disequilibrium Between Microsatellite Markers Extends Beyond 1 cM on Chromosome 20 in Finns. *Genome Research*, 11(1): 1221-1226
- Monge-Nájera J. y B. Morera Brenes. 1986. Why is the coyote (*Canis latrans*) expanding its range? A critique of the deforestation hypothesis. *Revista de Biología Tropical*, 35(1): 169-171
- Monzón J., R. Kays y D. E. Dykhuizen. 2014. Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. *Molecular Ecology*, 23(1):182-197
- Morrone J. J., D. Espinosa-Organista, C. Aguilar Zúñiga y J. Llorente-Bousquets. 1999. Preliminary classification of the Mexican biogeographic provinces: A parsimony analysis of endemism based on plant, insect and bird taxa. *Southwestern Naturalist*, 44(4): 508-515

- Morrone J. J. y J. Márquez. 2003. Aproximación a un atlas biogeográfico mexicano: componentes bióticos principales y provincias biogeográficas. Pp 1-4. *En: Morrone J.J y J. Llorente-Bousquets (editores). 2003. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía.* Las Prensas de Ciencias UNAM, México.
- Mumma M. A., C. E. Soulliere, S. P. Mahoney y L. P. Waits. 2014. Enhanced understanding of predator-prey relationships using molecular methods to identify predator species, individual and sex. *Molecular Ecology*, 14(1): 100-108
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(1): 3321-3323
- Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, Nueva York
- Paradis E. 2010. PEGAS: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26:419-420
- Parker G. R. 1995. Eastern Coyote: The Story of Its Success. Primera edición. Nimbus Publishing.
- Patterson B. R. y F. Messier. 2001. Social organization and space use of coyotes in Eastern Canada relative to prey distribution and abundance. *Journal of Mammalogy*, 82(1): 463-477
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2006. GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295
- Peakall R. y P. E. Smouse. 2012. GenAlex ver.6.5: Genetic analisis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539
- Pfeifer, M., V. Lefebvre, C. A. Peres, C. Banks-Leite, O. R. Wearn, C. J. Marsh, S. H. M. Butchart, V. Arroyo-Rodríguez, J. Barlow, A. Cerezo, L. Cisneros, N. D'Cruze, D. Faria, A. Hadley, S. M. Harris, B. T. Klingbeil, U. Kormann, L.

- Lens, G. F. Medina-Rangel y R. M. Ewers, 2017. Creation of forest edges has a global impact on forest vertebrates. *Nature*, 551(7679): 187–191.
- Poessel S. A., S. W. Breck y E. M. Gese. 2016. Spatial ecology of coyotes in the Denver metropolitan area: influence of the urban matrix. *Journal of Mammalogy*, 97(5): 1414-1427
- Pritchard J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(1): 945-959
- Rashleigh R. M., R. A. Krebs y H. van Keulen. 2008. Population structure of Coyote (*Canis latrans*) in the Landscape of the Cleveland Ohio Area. *Ohio Journal of Science*. 108(4):54-59
- Riley S. P. D., J. P. Pollinger, R. M. Sauvajot, E. C. York, C. Bromley, T. K. Fuller y R. K. Wayne. 2006. A southern California freeway is a physical and social barrier to gene Flow in carnivores. *Molecular ecology*, 15(1): 1733-1741
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene Flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(1): 1219-1228
- Rousset F. 2020. genepop: Population Genetic Data Analysis Using Genepop. *R Package version 1.1.7*
- Ruell E. W. y K. R. Crooks. 2007. Evaluation of noninvasive genetic sampling methods for felid and canid populations. *Journal of Wildlife Management*, 17(5): 1690-1994
- Rytwinski T. y L. Fahrig. 2015. The Impacts of Roads and Traffic on Terrestrial Animal Populations. *En: van der Ree R., D. J. Smith y C. Grilo (editores). 2015. Handbook of Road Ecology*. Primera edición. John Wiley & Sons, Ltd.
- Sacks B. N., S. K. Brown y H. B. Ernest. 2004. Population structure of California coyotes corresponds to habitat-specific breaks and illuminated species history. *Molecular Ecology*, 13: 1265-1275
- Sasmal I., C. E. Moorman, M. B. Swingen, S. Datta y C. S. DePerno. 2019. Seasonal space use of transient and resident coyotes in North Carolina. *Canadian Journal of Zoology*, 97(4): 326 - 331

- Schaffer K. 2019. Glimpses of Wildlife in Motion Along Mexico's Highway 2. Wildlands Network. Disponible en: <https://wildlandsnetwork.org/blog/glimpses-of-wildlife-in-motion-along-mexicos-highway-2/> (Consultado el 12 de mayo del 2021)
- Schell C. J., J. K. Young, E. V. Lonsdorf, R. M. Santymire y J. M. Mateo. 2018. Parental habituation to human disturbance over time reduces fear of humans in coyote offspring. *Ecology and Evolution*, 8(1):12965-12980
- Schwartz A. L. W., F. M. Shilling y S. E. Perkins. 2020. The value of monitoring wildlife roadkill. *European Journal of Wildlife Research*, 66(1): 18
- SCT (Secretaría de Comunicaciones y Transportes). 2013. Datos viales. Disponible en: http://www.sct.gob.mx/fileadmin/DireccionesGrales/DGST/Datos-Viales-2013/Velocidad/22_QUERETARO.pdf (Consultado el 18 de febrero del 2021)
- SCT (Secretaría de Comunicaciones y Transportes). 2018. Libro Blanco. Concesión para la construcción de la Autopista "Atizapan-Atlacomulco", en el estado de México. Disponible en: https://www.sct.gob.mx/fileadmin/Transparencia/rendicion-de-cuentas/LB/01_LB.pdf (Consultado el 25 de marzo del 2021).
- SCT (Secretaría de Comunicaciones y Transportes) 2020. Datos Viales 2020. TPDA (Volúmenes de Tránsito Registrados en las Estaciones Permanentes de Conteo de Vehículos) 2019. Disponible en: <http://datosviales2020.routedev.mx/main> (Consultado el 23 de marzo del 2021)
- Seddon J. M. 2005. Canid-specific oligonucleótidos for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 6(1): 147-149
- SEGOB (Secretaría de Gobernación). 1995. *Programa Nacional de Desarrollo Urbano 1995-2000*. Diario Oficial de la Federación. 27 de marzo de 1996, México, D.F
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. *Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana*

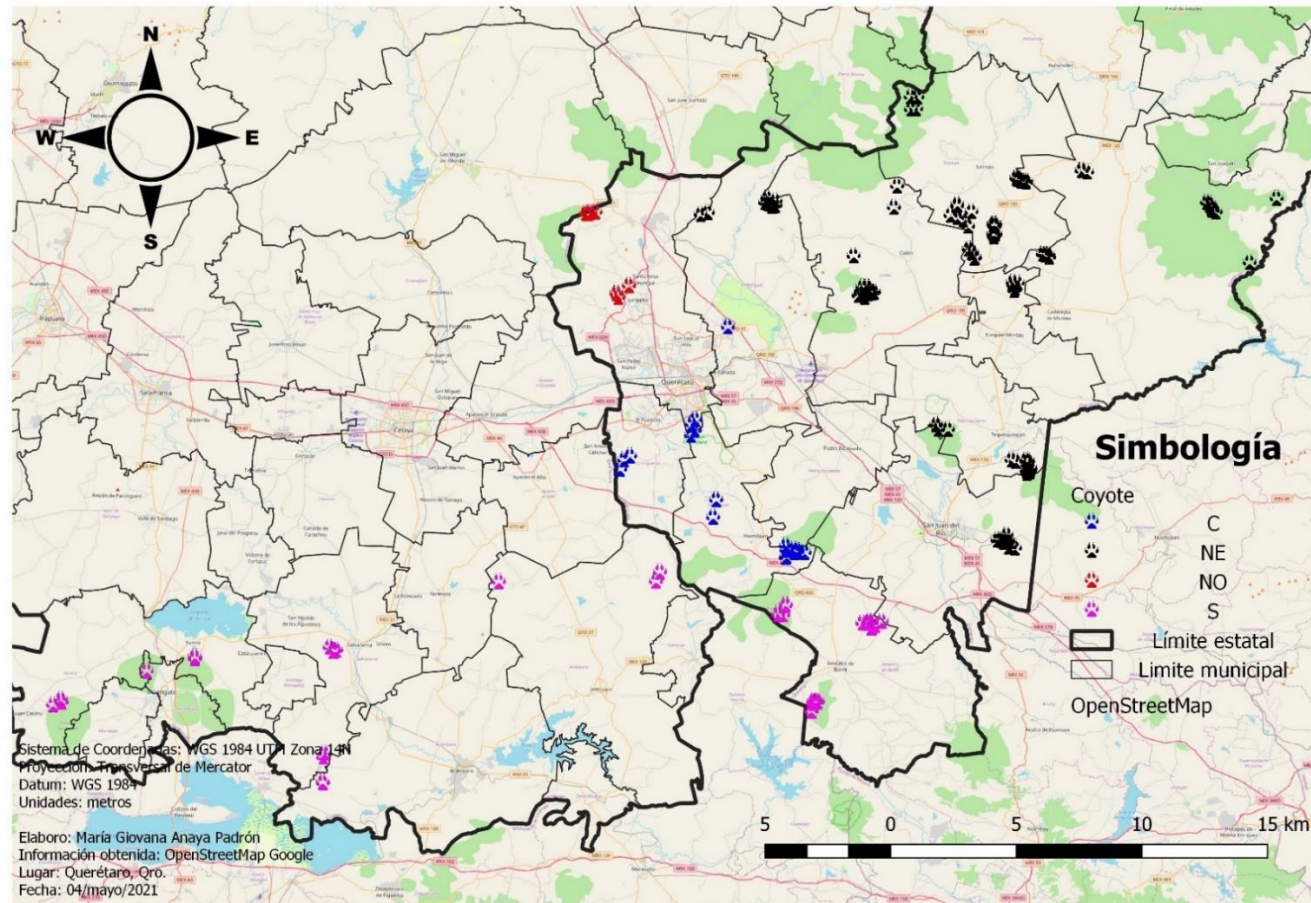
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Sobre Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos Peligrosos Biologico-Infecciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo*. Diario Oficial de la Federación. 17 de febrero del 2003.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo*. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección México, D.F.
- SIMPPI (Sistema Mexicano de Promoción de Parques Industriales) *Programa PyME con el apoyo de la Secretaría de Economía*. Disponible en: <http://www.contactopyme.gob.mx/cpyme/parques/intranets.asp> (Consultado el 25 de marzo del 2021).
- Single R. M. y G. Thomson. 2016. Linkage Disequilibrium: Population Genetics of Multiple Loci. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Academic Press, 400-404
- Thomassen H., R. Harrigan, K. Semple Delaney, S. Riley, L. Serieys, K. Pease, R. Wayne y T. Smith. 2018. Determining the drivers of population structure in a highly urbanized landscape to inform conservation planning. *Conservation Biology*, 32(1): 148-158
- Tigas L. A., D. H. Van Vuren, R. M. Sauvajot. 2002. Behavioral responses of bobcats and coyotes to habitat fragmentation and corridors in an urban environment. *Biological Conservation*, 108(1): 299 - 306
- Van der Ree R., D. J. Smith y C. Grilo. 2015. The Ecological Effect of Linear Infraestructure and Traffic: Challenges and Opportunities of Rapid Global Growth. *En: van der Ree R., D. J. Smith y C. Grilo (editores). 2015. Handbook of Road Ecology*. Primera edición. John Wiley & Sons, Ltd.
- Verma S. K., K. Prasad, N. Magesh, M. Sultana y L. Singh. 2003. Was elusive carnivore a panther? DNA typing of faeces reveals the mystery. *Forensic Science International*, 137(1):16-20

- vonHoldt B. M., D. R. Stahler, E. E. Bangs, D. W. Smith, M. D. Jimenez, C. M. Mack, C. C. Niemeyer, J. P. Pollinger, R. K. Wayne. 2010. A novel assessment of population structure and gene flow in grey wolf populations of the Northern Rocky Mountains of the United States. *Molecular Ecology*, 19(1): 4412-4427
- Waits L. P. y D. Paetkau. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist; a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69:1419-1433
- Waits L. P. y A. Storfer. 2016. Basics of Population Genetics: Quantifying Neutral and Adaptive Genetic Variation for Landscape Genetic Studies. Pp: 41-45. *En: Balkenhol N., S. Cushman, A. Storfer y L. Waits (editors). 2016. Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications. Wiley Blackwell. John Wiley and Sons Ltd. UK.*
- Wandeler P., S. M. Funk, C. R. Lurgiader, S. Gloor y U. Breitenmoser. 2003. *Molecular Ecology*, 12(1): 647 - 656
- Wang J. y S. Shete. 2012. Testing departure from Hardy Weinberg Proportions. *Methods in molecular biology*, 850:77-102
- Wang Y., M. L. Allen y C. C. Wilmsers. 2015. Mesopredator spatial and temporal responses to large predators and human development in the Santa Cruz Mountains of California. *Biological Conservation*, 190(1): 23-33
- Williams C. L., K. Blejwas; J. J. Johnston y M. M. Jaeger. 2003. Temporal Genetic Variation in a Coyote (*Canis latrans*) Population Experiencing High Turnover. *Journal of Mammalogy*, 84(1): 117-184
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28(2): 114
- Wright S. 1951. The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15(1): 323-354
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3): 395-420
- Wright S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations, Vol II. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press, Chicago.

- Wultsch C., A. Caragiulo, I. Días-Freedman, H. Quigley, S. Rabinowitz y G. Amato. 2016. Genetic diversity and population structure of mesoamerican jaguars (*Panthera onca*): implications for conservation and management. *PLOS ONE*, 11(10): e0162377
- Wydeven A. P., D. J. Mladenoff, T. A. Sickley, B. E. Kohn, R. P. Thiel y J. L. Hansen. 2001. Road density as a factor in habitat selection by wolves and other carnivores un the Great Lakes Region. *Endangered Species*, 18(4): 110

ANEXO 1

Mapa donde se observa la ubicación de las 282 muestras confirmadas de coyote según los grupos hipotéticos. Las principales carreteras federales se muestran en rojo y las estatales en amarillo. También, se observan las principales zonas urbanas del área de estudio. Las subpoblaciones de coyote hipotéticas se observan en azul el grupo del Centro, negro el grupo del Noreste, rojo el grupo del Noroeste y rosa el grupo del Sur.



ANEXO 2

Listado de los loc microsatélites utilizados en el estudio. (Francisco *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 1997; Breen *et al.*, 2001; Damm *et al.*, 2015; DeCandia *et al.*, 2019; Adducci II *et al.*, 2020)

Microsatélite	di/tetranucleótido	3'	5'	Cromosoma	Tamaño	Tinción
FH2001	Tetranucleótido	TCCTCCTCTTCTTTCCAT TGG	TGAACAGAGTTAAGGA TAGACACG	cfa 23	131-157	HEX
FH2054	Tetranucleótido	GCCTTATTCATTGCAGTT AGGG	ATGCTGAGTTTTGAAC TTTCCC	cfa 12	80-174	NED
FH2088	Tetranucleótido	CCCTCTGCCTACATCTC TGC	TAGGGCATGCATATAA CCAGC	cfa 15	90-130	HEX
FH2096	Tetranucleótido	CCGTCTAAGAGCCTCCC AG	GACAAGGTTTCCTGGT TCCA	cfa 11	84-100	FAM
FH2226	Tetranucleótido	GGACTACCCCATTGCAT TTG	GAATCGAGTCCCATAT CGGG	cfa 07	166-212	FAM
FH2293	Tetranucleótido	GAATGCCCTTCACCTTG	AGGAAAAGGAGAGATG ATGCC	cfa 10	208-500	FAM
FH2535	Tetranucleótido	GTCATTGACAGACTACA AATCTCC	ACAGACTTGACAGTATT TTGTCTG	cfa 15	111-147	FAM
FH2611	Tetranucleótido	GAAGCCTATGAGCCAGA TCA	TGTTAGATGATGCCTT CCTTCT	cfa 36	185-211	FAM
FH3725	Tetranucleótido	GAAAGAACTCACTCAAA ACTTCC	AAATGTTACTTCAGAAA AGCTGG	cfa 14	116-196	NED
AHT121	Dinucleótido	TATTGCGAATGTCACTG CTT	ATAGATACTCTCTCT CCG	cfa 13	101-129	HEX
Cxx.119	Dinucleótido	TTGATTTCCCTGTAGCT TA	GATGRAAAGAATGAGA GAGG	cfa 04	87-97	NED
Cxx.172	Dinucleótido	CCTGTCTCCTGTGGACC AAT	ACATGCAAAAGGACAC ATTACG	cfa 37	142-160	HEX
C09.173	Dinucleótido	ATCCAGGTCTGGAATAC CCC	TCCTTTGAATTAGCACT TGGC	cfa 09	123-129	FAM

ANEXO 3

Listado de los pares de loci microsatélites en el análisis de Desequilibrio de ligamiento (*LD*). Se observa el valor de correlación (*r*) y la significancia para el desequilibrio de ligamiento ($p < 0.05$).

Par de loci	<i>r</i>	<i>p</i> < 0.05
FH2001:FH2054	1.40E-01	*
FH2001:FH2088	7.90E-02	*
FH2001:FH2096	3.30E-02	*
FH2001:FH2611	-1.40E-02	
FH2001:AHT121	8.80E-03	
FH2001:C09_173	2.30E-02	
FH2001:CXX119	2.50E-01	*
FH2001:CXX172	-3.10E-02	
FH2001:FH2226	-1.70E-03	
FH2001:FH2293	1.50E-01	*
FH2001:FH2535	-2.90E-02	
FH2001:FH3725	3.70E-02	
FH2054:FH2088	8.20E-02	*
FH2054:FH2096	1.10E-01	*
FH2054:FH2611	4.10E-02	*
FH2054:AHT121	7.20E-02	
FH2054:C09_173	-9.00E-02	
FH2054:CXX119	7.30E-02	
FH2054:CXX172	5.90E-02	
FH2054:FH2226	6.60E-02	
FH2054:FH2293	1.30E-01	*
FH2054:FH2535	2.40E-02	
FH2054:FH3725	-2.10E-02	*
FH2088:FH2096	1.80E-02	*
FH2088:FH2611	3.30E-02	
FH2088:AHT121	-1.50E-02	
FH2088:C09_173	6.60E-02	
FH2088:CXX119	1.60E-01	*
FH2088:CXX172	1.30E-02	
FH2088:FH2226	1.10E-02	
FH2088:FH2293	-4.00E-02	

FH2088:FH2535	1.20E-03	
FH2088:FH3725	2.40E-02	
FH2096:FH2611	1.90E-03	
FH2096:AHT121	1.20E-01	*
FH2096:C09_173	7.30E-02	
FH2096:CXX119	6.40E-02	
FH2096:CXX172	-4.50E-02	
FH2096:FH2226	2.50E-02	
FH2096:FH2293	-4.70E-02	
FH2096:FH2535	8.00E-03	
FH2096:FH3725	4.30E-02	*
FH2611:AHT121	-8.10E-03	
FH2611:C09_173	7.90E-02	
FH2611:CXX119	9.30E-02	
FH2611:CXX172	2.80E-02	
FH2611:FH2226	-1.20E-02	
FH2611:FH2293	-2.40E-02	
FH2611:FH2535	-5.10E-03	
FH2611:FH3725	1.40E-02	
AHT121:C09_173	1.20E-01	*
AHT121:CXX119	-5.20E-03	
AHT121:CXX172	-2.60E-02	
AHT121:FH2226	-3.30E-02	
AHT121:FH2293	-4.60E-02	
AHT121:FH2535	-1.30E-02	
AHT121:FH3725	1.10E-01	*
C09_173:CXX119	-4.30E-03	
C09_173:CXX172	-3.90E-02	
C09_173:FH2226	-1.20E-01	*
C09_173:FH2293	-4.00E-02	
C09_173:FH2535	-2.00E-02	
C09_173:FH3725	2.60E-02	
CXX119:CXX172	-2.10E-02	
CXX119:FH2226	4.80E-02	
CXX119:FH2293	8.70E-02	
CXX119:FH2535	1.10E-02	
CXX119:FH3725	5.70E-02	
CXX172:FH2226	4.10E-02	
CXX172:FH2293	2.70E-02	

CXX172:FH2535	8.70E-03	
CXX172:FH3725	-3.10E-02	
FH2226:FH2293	1.70E-02	
FH2226:FH2535	3.40E-02	*
FH2226:FH3725	4.40E-16	
FH2293:FH2535	-3.50E-02	
FH2293:FH3725	-9.40E-03	
FH2535:FH3725	4.90E-03	
