



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

RELACIÓN ENTRE LA
PERTURBACIÓN DE UNA SELVA SECA
Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA
POBLACIONAL DE *Liomys irroratus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

IRMA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TUTOR DE TESIS: DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **GONZALEZ GONZALEZ IRMA** con número de cuenta **99519300** con la tesis titulada **"RELACIÓN ENTRE LA PERTURBACIÓN DE UNA SELVA SECA Y LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *LIOMYS IRRORATUS*"**, realizada bajo la dirección del **DR. DAVID VALENZUELA GALVAN:**

Presidente: DR. LUIS BERNARDO VÁZQUEZ HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Secretario: DR. DAVID VALENZUELA GALVÁN
Suplente: DR. RAUL ERNESTO ALCALÁ MARTÍNEZ
Suplente: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de septiembre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la elaboración del proyecto de Maestría.

A mi comité tutorial, Dr. David Valenzuela, Dra. Ella Vázquez y Dr. Gerardo Ceballos por el asesoramiento recibido para el enriquecimiento del proyecto durante las evaluaciones tutorales.

A los revisores de tesis, Dra. Ek del Val de Gortari, Dr. Luis Bernardo Vázquez y Dr. Raúl Alcalá Martínez, por las sugerencias y correcciones hechas a mi trabajo.

Al laboratorio de Ecología y Genética del Instituto de Ecología de la UNAM por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A E. Mason, M. Cadena y E. Rivas por que en sus tesis se colectaron las muestras usadas para este proyecto.

Al CIByC-UAEM por apoyo logístico para la realización de este trabajo.

Parte de las muestras de este trabajo se colectaron con financiamiento de CONACyT otorgado al proyecto J34490-V a cargo de D. Valenzuela.

Gracias al Cuerpo Académico de Ecología Evolutiva de la UAEM pues la secuenciación de las muestras de tejido fue financiada con presupuesto de PROMEP otorgado a un proyecto de investigación de este cuerpo académico.

INDICE

Introducción general	3
1. Capítulo 1. Estudios con microsatélites en el orden Rodentia	
1.1 Resumen/Abstract	5
1.2 Introducción	6
1.3 Material y Método	8
1.4 Resultados	8
1.5 Discusión	11
1.6 Conclusión	12
1.7 Bibliografía	13
1.8 Anexo I	14
2. Capítulo 2. Relación entre la perturbación de una selva seca y la estructura genética poblacional de <i>Liomys irroratus</i>	
2.1 Introducción	20
2.1.1 Flujo genético	21
2.1.2 Genética del Paisaje	22
2.1.3 Marcadores moleculares	24
2.1.4 ADN mitocondrial	25
2.1.5 Citocromo b	26
2.1.6 Estructura genética	26
2.1.7 Selvas secas	26
2.2 Objetivos	28
2.3 Hipotesis	28
2.4 Material y Método	30
2.4.1 Área de estudio	30
2.4.1.1 Selección de los sitios	32
2.4.1.2 Sitios de muestreo	32
2.4.1.3 Sitios perturbados y no perturbados	32
2.4.2 Especie de estudio	33
2.4.2.1 Características generales	33
2.4.2.2 Biología	35
2.4.2.3 Ecología	35
2.4.3 Trabajo de campo y obtención de muestras	36
2.4.4 Extracción de ADN	37

2.4.5 Amplificación y secuenciación	38
2.4.6 Análisis de datos	38
2.4.6.1 Diversidad genética	39
2.4.6.3 Estructura y diferenciación genética	40
2.4.6.4 Relación entre haplotipos	41
2.5 Resultados	
2.5.6.2 Diversidad genética	42
2.5.6.3 Diferenciación y estructura genética	43
2.5.6.4 Relación entre haplotipos	45
2.6 Discusión	47
2.7 Conclusión	50
2.8 Bibliografía	52
2.9 Anexos	
2.9.1 Anexo 2: Muestras de falanges de roedores de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla utilizadas en este estudio	56
2.9.2 Anexo 3: Protocolo de extracción para tejido animal (cola de ratón, falanges) con el kit PROMEGA	57
2.9.3 Anexo 4: Elaboración de geles de agarosa al 1 y 1.5% para visualización de extracción de DNA y producto de PCR	58
2.9.4 Anexo 5: Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	59
2.9.5 Anexo 6: Haplotipos compartidos	60
3. Conclusión general	87
4. Bibliografía	89

Resumen

Este trabajo lo dividí en dos capítulos. El primero de ellos es una revisión bibliográfica sobre el uso de la microsatélites como técnica molecular y fue realizado como un trabajo adicional y como justificación para el uso de otro marcador molecular en estudio principal. El segundo capítulo es el estudio principal de esta tesis.

Así en el primer capítulo, describimos que los microsatélites representan una técnica molecular ampliamente utilizada desde 1989. En general, permiten hacer estimaciones de diversos parámetros de las poblaciones, como hibridización, historia evolutiva en poblaciones y especies, filogeografía, detección de cuellos de botella y endogamia. Asimismo, se emplean para determinar el impacto de la conducta reproductiva, la estructura social y la dispersión. Dado que es una técnica relativamente nueva, la mayor parte de los artículos publicados que se utilizaron para esta revisión han sido para caracterización de los cebadores. Gracias a que permiten obtener resultados que reflejan los procesos genéticos más recientes a los que está sujeta una población, están siendo utilizados en estudios de Genética del paisaje, una disciplina de reciente auge. Sin embargo, encontramos que los estudios con microsatélites están sesgados a ciertos grupos taxonómicos de roedores. Una de las posibles razones de tal sesgo es la complejidad y el costo para crear las librerías genómicas de dichos marcadores.

En las selvas secas, dos de los factores que potencialmente pueden afectar la composición espacial y temporal de la diversidad de vertebrados son la estacionalidad climática y la perturbación y fragmentación del hábitat. La perturbación y fragmentación de la vegetación puede tener efectos sutiles y difíciles de detectar sobre la biodiversidad y, con ello, afectar la probabilidad de permanencia de las especies a mediano y largo plazo, por ejemplo puede afectar las características genéticas de las poblaciones. La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH) en Morelos, México, que protege uno de los remanentes de selva seca más importantes del país en el centro de México, presenta a su vez diferentes grados de alteración. En dicho escenario se evaluó la diversidad y estructura genética de poblaciones del ratón *Liomys irroratus*, para determinar cómo cambian dichos parámetros entre sitios que presentan grados de perturbación de la selva seca contrastantes; asimismo, para explorar las implicaciones de los resultados obtenidos para el manejo de la biodiversidad en la REBIOSH. Se colectaron muestras de tejido (falanges) de 79 individuos del ratón espinoso mexicano *Liomys irroratus* en cuatro sitios con diferentes grados de perturbación dentro de la reserva. Se amplificó el gen mitocondrial citocromo b (550 pares de bases) y se determinó que los loci no están sujetos a procesos selectivos (pruebas de neutralidad no significativas), el número de haplotipos fue alto (59), así como la diversidad nucleotídica ($\pi_{total}=0.505\pm 0.020$) y haplotípica ($h_{total}=0.987\pm 0.0069$). La divergencia entre las poblaciones fue mayoritariamente asociada a la diferencia entre individuos ($D_{xy}=49.6-51.5\%$) y la distancia genética dentro y entre poblaciones fue alta. El número de migrantes por generación fue 13.4 (N_m estimado a partir de δ_{st} y γ_{st}). Las poblaciones no presentaron aislamiento por distancia ni estructuración genética (análisis de varianza molecular y red media de haplotipos). Se sugieren dos escenarios posibles para explicar los resultados encontrados, primero puede ser que la estudiada sea una sola población panmíctica que fue genéticamente muy diversa, o que se trata de una metapoblación. Es importante que para cualquier acción de conservación que se diseñe, se incluya el mantener la alta diversidad genética que presentan las poblaciones de *L. irroratus* en la reserva.

Palabras clave: *Liomys irroratus*, selvas secas, perturbación, Genética del paisaje, estructura genética.

Abstract

This work is divided into two chapters. The first is a literature review on the use of microsatellites as molecular technique, it was performed as additional work and as a justification for the use of other molecular marker in the main study. The second chapter is the main study of this thesis about the relationship between dry forest disturbance and the genetic structure of *Liomys irroratus*.

Thus in the first chapter, we describe that microsatellites are a widely used molecular technique since 1989. In general, it allows to estimate various population genetics parameters, such as hybridization, evolutionary history and species populations, phylogeography, detection of bottlenecks and inbreeding. Also it is used to determine the impact of reproductive behavior, social structure and dispersion. Since it is a relatively new technique, most of the published articles were used for this review have been for the characterization of the primers. Thanks to that it provides results that reflect the most recent genetic processes which are subject a population, they are being used in studies of landscape genetics, a discipline of recent boom. However, we found that microsatellite studies are biased to certain taxonomic groups of rodents. One of the possible reasons for this bias is the complexity and cost to create genomic libraries of these markers.

The second chapter is the main study. It is carried out in a dry forest. In the dry forests, two of the factors that could affect the spatial and temporal composition of vertebrate diversity are the seasonality, and habitat disturbance and fragmentation. The disturbance and fragmentation of vegetation can have subtle and difficult effects to detect on biodiversity and thereby affect the probability of permanence of species in the medium and long term, for example, it may affect the genetic characteristics of populations. The Biosphere Reserve of Sierra de Huautla (REBIOSH) in Morelos, Mexico, which protects one of the remnants of dry forest in the country at the center of Mexico, has also different degrees of alteration. Under this scenario, we evaluated the diversity and genetic structure of mouse populations of *Liomys irroratus*, to determine how these parameters change between sites that present levels of disturbance of the contrasting dry forest, also to explore the implications of the results for the management of the biodiversity in the REBIOSH. Tissue samples were collected (phalanges) of 79 individuals of Mexican spiny pocket mouse *Liomys irroratus* in four sites with different degrees of disturbance within the reserve. The mitochondrial cytochrome b gene (550 bp) was amplified and we found that the loci are not subject to selection procedures (tests of neutrality does not significant), the number of haplotypes was high (59) and nucleotide diversity ($\pi_{total} = 0.505 \pm 0.020$) and haplotype ($h_{total} = 0.987 \pm 0.0069$). The divergence among populations was mainly associated with the difference between individuals ($D_{xy} = 49.6-51.5\%$) and genetic distance within and between populations was high. The number of migrants per generation was 13.4 (N_m estimated from δ_{st} y γ_{st}). Populations showed neither isolation by distance nor genetic structuring

(analysis of molecular variance and mean haplotype network). We suggest two possible scenarios to explain the results found, firstly the population studied is a single panmictic population that was genetically very diverse, or that it is a metapopulation. It is important for any conservation action that is designed, is included to maintain the present high genetic diversity of *L. irroratus* in the reserve.

Key word: *Liomys irroratus*, dry forests, perturbation, Landscape Genetics, genetic structure

INTRODUCCIÓN GENERAL

La genética de poblaciones busca describir la diversidad y estructura genética de las poblaciones y proponer teorías que expliquen el efecto de diferentes procesos sobre la microevolución. La variabilidad genética es, en sentido amplio, el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. De ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación como para el avance de la genética evolutiva (Eguiarte et al. 2004).

Los estudios de genética de poblaciones permiten conocer la historia evolutiva de un grupo, encontrar evidencias de cuellos de botella, brindar datos filogeográficos útiles para la conservación y/o analizar la diferenciación genética entre subpoblaciones, por mencionar algunas aplicaciones. Particularmente, la diferenciación genética entre subpoblaciones es un indicador de la conectividad y es producida en gran parte por la diversidad de ambientes, el sistema de apareamiento y al efecto relativo que hayan tenido el flujo genético y la deriva genética en la historia de las poblaciones. Los estimados de diferenciación genética en especies mexicanas, como pinos, encinos, agaves, cícadras y algunos insectos, entre otros, ejemplifican que la heterogeneidad de ecosistemas de nuestro país se refleja también en una heterogeneidad genética. Este argumento requiere más sustento. Puede haber gran diferenciación genética aún en ambientes homogéneos si por ejemplo el flujo genético es limitado y las poblaciones son pequeñas. El impacto de la fragmentación debida a actividades humanas se refleja en la estructura y en los niveles de variación genética de las poblaciones. Aun así, hacen falta más estudios explícitos que evalúen dicho riesgo, particularmente en especies con tamaños poblacionales pequeños (Fitzpatrick et al. 2007).

Los enormes avances en técnicas y análisis moleculares han tenido gran impacto sobre los estudios de genética de poblaciones, los cuales han sido clave para mejorar las posibilidades de realizar evaluaciones detalladas y aplicadas en el área de la genética poblacional. Los avances moleculares más importantes han sido: 1) el desarrollo de la reacción en cadena de la polimera (PCR por sus siglas en inglés) con el cual se pueden amplificar segmentos específicos de ADN a concentraciones deseadas; 2) la aplicación de conjuntos de iniciadores conservados evolutivamente, 3) la utilización de loci hipervariables de microsatélites y 4) la utilización de protocolos de secuenciación de ADN. Estas innovaciones, junto con la reciente explosión de análisis poderosos y relativamente fáciles de utilizar en programas de cómputo, han permitido obtener información, en otro tiempo inalcanzable, en todos los niveles jerárquicos biológicos (Sunnucks 2000).

Dos de los marcadores más ampliamente utilizados son las secuencias de ADN mitocondrial y los microsatélites. El ADN mitocondrial se emplea principalmente para reconstruir patrones históricos de demografía poblacional, biogeografía y especiación. Sin embargo, se ha sugerido recientemente que la naturaleza penetrante de la selección directa e indirecta sobre el ADN mitocondrial hace que cualquier conclusión que se derive con su utilización sea ambigua (Hurst et al. 2005). Por otro lado, los microsatélites son los arreglos genéticos más utilizados recientemente en genética de poblaciones por ser más sensibles para responder preguntas de flujo genético e historia poblacional, incluso en especies con variación genética limitada (Sunnucks 2000).

Los estudios genéticos poblacionales basados en marcadores moleculares con alto poder de resolución permiten evaluar los efectos de la fragmentación sobre la estructura genética de las poblaciones, ya que las restricciones que los patrones del paisaje y la matriz imponen a la dispersión, y de esta forma a la distribución de plantas, animales y sus genes en el paisaje, tienen implicaciones para la dinámica y la persistencia de las poblaciones, así como para la diversidad local de las especies. Como consecuencia, el mantenimiento del intercambio de individuos o genes entre las poblaciones en diferentes parches de hábitat o la restauración de tal intercambio (i.e. defragmentación) son determinantes para conservación (Fisher y Lindenmayer 2007).

Además, este tipo de estudios en ciertos hábitats y ciertas especies son imprescindibles para poder llevar a cabo acciones de conservación. Por ejemplo, a pesar de la gran riqueza biológica de las selvas tropicales húmedas y secas de México, son quizá los ecosistemas más amenazados, ya que presentan las mayores tasas de deforestación y fragmentación a nivel global (Whitmore 1991, Achard *et al.* 2002) y nacional (Masera *et al.* 1997). Como consecuencia se tienen paisajes altamente modificados (paisajes antropizados o agropaisajes) inmersos en una matriz de vegetación con diferentes grados de conservación, en un gradiente que va desde zonas bien conservadas y relativamente extensas, fragmentos de selva, acahuales, vegetación de galería, cercas vivas y pastizales (Dirzo et al. 2008). Los estudios genéticos poblacionales son fundamentales para evaluar el efecto que la fragmentación que estos paisajes tiene sobre la viabilidad de las especies que los habitan.

El orden Rodentia es un grupo importante para evaluaciones de viabilidad genética en ambientes fragmentados, dado que alberga el mayor número de especies en comparación con otros órdenes de mamíferos de México y del mundo. Un gran número de estas especies son de distribución amplia y se distribuyen en una extensa variedad de tipos de vegetación, hecho que eleva considerablemente su importancia ecológica (Ceballos y Oliva 2004). Sin embargo, existe muy poca investigación genética sobre ellos.

Este trabajo se dividió en dos capítulos, cada uno tiene un formato independiente puesto que el primero de ellos es una investigación adicional al trabajo principal de tesis que es el segundo capítulo.

El primer capítulo es una revisión bibliográfica de artículos científicos, la cual pretende ejemplificar en qué tipos de estudios con roedores se han utilizado los marcadores moleculares de microsatélites. Además, representa una justificación para el hecho de no haber utilizado los microsatélites en el estudio principal; debido fragmentación y perturbación dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, el enfoque pretendido fue el de Genética del paisaje. En este enfoque se consideran escalas espaciales relativamente pequeñas, los individuos de las especies de estudio están cercanamente relacionados, por lo cual la diferenciación genética entre ellos es pequeña; así los análisis genéticos dependen del poder de resolución de los marcadores moleculares (Holderegger y Wagner 2008). Con este fin, se utilizan principalmente dos marcadores moleculares, uno de ellos son los microsatélites o repeticiones cortas de secuencias (SSRs, por su siglas en inglés, Allendorf y Luikart 2007); éstos son los más ampliamente utilizados en animales (Storfer et al. 2007), por lo cual se había decidido utilizarlos en el estudio. Sin embargo, no se obtuvo la librería que se necesitaba y se decidió la utilización de otro marcador molecular también empleado en estudios de Genética del Paisaje, el citocromo b del ADN mitocondrial cuyas características se describen en el capítulo II.

El segundo capítulo es el estudio principal de esta tesis, el cual trata sobre los efectos de la perturbación del hábitat sobre la estructura genética poblacional de *Liomys irroratus* dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Dicha reserva presenta diferentes grados de perturbación de la vegetación, debido principalmente a actividades antropogénicas; razón por la cual en este segundo capítulo los resultados obtenidos se pretenden explicar bajo un enfoque de Genética del paisaje.

Finalmente, debido a que cada capítulo está escrito de manera independiente, se incluye una conclusión general donde se exponen las nuevas interrogantes que el trabajo plantea y las posibles formas de abordarlas.

CAPITULO I

Estudios con microsatélites en el orden Rodentia

Resumen

Los microsatélites representan una técnica molecular ampliamente utilizada desde 1989. En general, permiten hacer estimaciones de diversos parámetros de las poblaciones, como hibridización, historia evolutiva en poblaciones y especies, filogeografía, detección de cuellos de botella y endogamia. Asimismo, se emplean para determinar el impacto de la conducta reproductiva, la estructura social y la dispersión. Dado que es una técnica relativamente nueva, la mayor parte de los artículos publicados que se utilizaron para esta revisión han sido para caracterización de los cebadores. Gracias a que permiten obtener resultados que reflejan los procesos genéticos más recientes a los que está sujeta una población, están siendo utilizados en estudios de Genética del paisaje, una disciplina de reciente auge. Sin embargo, encontramos que los estudios con microsatélites están sesgados a ciertos grupos taxonómicos de roedores. Una de las posibles razones de tal sesgo es la complejidad y el costo para crear las librerías genómicas de dichos marcadores.

Palabras clave: microsatélites, Rodentia, Genética del paisaje, estructura genética.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten determinar el grado de variación genética existente entre los individuos de una población, entre poblaciones y entre especies (Awise 2004). Los mejores marcadores son aquellos que, en la misma región del genoma, muestran variación entre organismos de la misma especie. Esto permite determinar diversidad entre familias y poblaciones; establecer linajes, servir como base para la identificación de especies, cepas, híbridos y recursos genéticos; establecer paternidad y realizar el mapeo genómico aplicable en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología

molecular y genética de la conservación, entre otros (Liu y Cordes 2004).

Para que un sistema molecular sea utilizado como marcador debe tener ciertas propiedades como: ser reproducible, no estar sujeto a selección natural, que permita comparaciones homólogas entre diferentes organismos, ser fácil de utilizar, tener una estructura genética sencilla, ser heredado de forma estricta, proveer estados cualitativos de carácter (fenotipo) y, que la adquisición de un nuevo estado se presente en la frecuencia adecuada para el tipo de estudio (Awise 2004). A la fecha se han descrito y estudiado un gran número de marcadores moleculares, siendo los más usados las enzimas de restricción, los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's por sus siglas en inglés),

la secuenciación de diferentes genes pertenecientes al ADN mitocondrial, los minisatélites y los microsátélites (Sunnucks 2000, Avise 2004).

Los microsátélites o repeticiones de secuencias simples (SSRs por sus siglas en inglés) son secuencias en tándems (fragmentos), de 1-6 pares de bases, que se encuentran en todos los genomas de procariontes y eucariontes que se han analizado hasta el momento. Están presentes tanto en la región codificadora como en la no codificadora del ADN y normalmente se caracterizan por las altas tasas de mutación, que dan como resultado una alta diversidad alélica y por tener un alto grado de polimorfismo (característica general de los marcadores moleculares, Hedrick 2005). El origen de su polimorfismo no está aún clarificado, pero al parecer se debe a eventos de recombinación durante la replicación del ADN (Zane et al. 2002). Además son codominantes y suficientemente específicos por lo que se puede diferenciar individuos dentro de una población (Selkoe y Toonen 2006).

En particular, para los ecólogos son de gran interés porque es uno de los pocos marcadores moleculares (junto con los AFLP's o ISSR's) que permiten responder preguntas a una escala fina (*i.e.* tiempo ecológico reciente, ~70 años; Selkoe y Toonen 2006); por ejemplo, son una

herramienta eficiente para estudios que buscan explicar cómo las características geográficas y ambientales estructuran la variación genética a nivel individual y poblacional, lo cual tiene implicaciones no sólo para la ecología sino también en evolución y conservación (Storfer et al. 2007)..

Como cualquier otro marcador molecular, los microsátélites también han presentado algunos retos y dificultades (Selkoe y Toonen, 2006); la mayor dificultad ha sido que necesitan ser aislados *de novo* para la mayoría de las especies que se pretende estudiar., esto debido a que la mayoría de los microsátélites se encuentran casi siempre en las regiones no codificantes donde la tasa de sustitución nucleotídica es más alta que en las regiones codificantes (Kocher et al 1989, Zane et al. 2002). Por consiguiente, la estrategia para diseñar "primers universales" que correspondan a las secuencias conservadas que ha sido muy efectiva para el ADN mitocondrial, para microsátélites es más problemática (Zane et al. 2002). Sin embargo, la presencia de regiones flanqueantes altamente conservadas han sido reportadas para algunos loci de microsátélites en cetáceos (Schlötter et al. 1999), tortugas (FitzSimmons et al. 1995) y peces (Rico et al. 1996), permitiendo amplificación cruzada para especies que divergen de 470 millones de años. Para algunos grupos taxonómicos

como en los roedores, un grupo muy grande de mamíferos, todavía no han sido ampliamente utilizados.

El orden Rodentia es el más grande de mamíferos, está formado por 2, 277 especies, divididas en 481 géneros y 33 familias, representa alrededor del 42% de la Biodiversidad de mamíferos del mundo (Wilson y Reeder, 2005).

Particularmente en México, el orden Rodentia es el más diverso con 233 especies que representan el 45% del total de mamíferos del país, seguido de los murciélagos (139 spp; 27%; Ceballos et al. 2002). Además, representan la mayoría de las especies endémicas que se encuentran en el país, 115 especies (71%) que incluyen a 76 mурidos, 12 heterómidos, 13 tuzas, 13 ardillas y un agutí (Ceballos et al. 2005).

Debido a la gran riqueza de este grupo y a la enorme utilización de los microsatélites en estudios genéticos, nos propusimos realizar una revisión de artículos científicos para evaluar la contribución del uso de la técnica de microsatélites al estudio de la genética poblacional de roedores; identificar las preguntas que se han abordado, así como los dificultades que han llevado a que esta técnica se use más o menos con diferentes grupos, por distintos grupos de investigación.

Además, evaluar el potencial de esta técnica para el estudio de genética del paisaje con roedores. Con la genética del paisaje se busca entender, en general, la influencia de procesos ecológicos sobre la variación genética por medio de cuantificar la relación entre las variables del paisaje, la estructura genética poblacional y la variación genética (Storfer et al. 2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos una búsqueda de artículos científicos en el buscador Scopus (www.scopus.org) con los términos de búsqueda: “rodents & microsatellites”, en título, resumen o palabras clave.

Los artículos obtenidos fueron clasificados en función del tipo de preguntas que responden, en función de la familia que estudiaron, el año de su publicación y por regiones geográficas, esto último considerando el lugar donde se encuentra la institución a la que pertenece el primer autor. Además, analizamos cuántos de dichos artículos responden preguntas que podrían considerarse de genética del paisaje o que directamente buscaron responder preguntas en ese contexto.

RESULTADOS

De acuerdo con el criterio de búsqueda, se obtuvieron 58 artículos científicos que realizaron estudios con roedores y microsatélites (Anexo 1). Los 58 artículos se dividen en 10 tipos de preguntas, caracterización de microsatélites, diversidad y estructura genética poblacional, genética del paisaje, análisis de paternidad, cuellos de botella, sistemas de apareamiento, mapas genéticos, diversidad alélica, taxonomía y filogeografía. Existe un sesgo en la distribución de frecuencias del tipo de preguntas, siendo los estudios de caracterización de microsatélites los mayormente realizados (Anexo 1).

De estos artículos, en 22 trabajos (38%) se hizo la caracterización (descripción) de microsatélite para diferentes especies de roedores (Anexo 1), sólo uno con un género mexicano: *Dipodomys* (*Heteromyidae*); 11 artículos corresponden a estudios que tienen un enfoque de genética del paisaje (19%), en seis artículos se realizaron estudios que corresponden a estudios de diversidad y estructura genética (10%), análisis de paternidad se realizaron en cuatro trabajos (7%), al igual que los mapas genéticos, y los 11 artículos restantes (18%) se dividen en los cinco últimos tipos de preguntas antes mencionados (Fig 1).

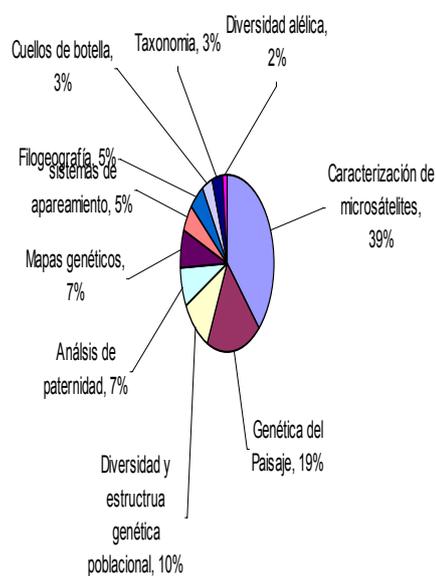


Fig 1. Porcentaje de correspondiente al tipo de pregunta hecha en los estudios de roedores y microsatélites.

En cuanto a las familias de roedores que han sido estudiadas con microsatélites como marcador molecular, también existe un sesgo en la distribución de frecuencias, ya que de las nueve familias encontradas, sólo cuatro son las más utilizadas para estudios con microsatélites (Fig. 3). La familia más utilizada es Muridae con 22 artículos (38%), seguida de Cricetidae con 15 artículos (26%), Sciuridae con 10 (17%), Ctenomyidae con cinco (9%), Heteromyidae con dos (3%) y el resto con sólo un artículo cada una (2%) son Hydrochoeridae (endémica a Europa), Spalacidae, Octodontidae y Myocastoridae (Fig 2).

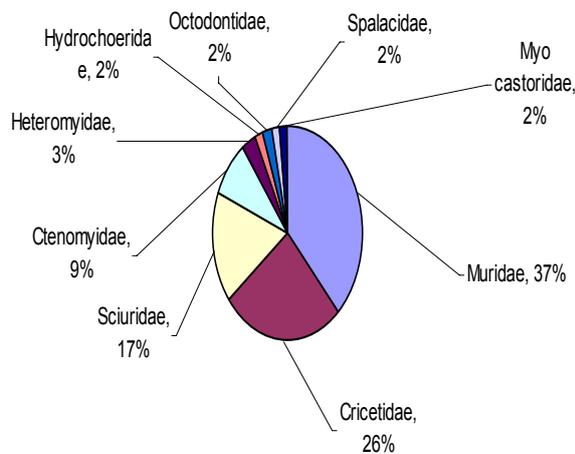


Fig 2. Porcentaje de estudios por familia utilizada en estudios con roedores y microsatélites.

Los estudios de microsatélites y roedores han sido publicados hasta el momento en 24 revistas, de éstas la mayoría en Molecular Ecology Notes y Molecular Ecology: ocho en cada una (13%), seguidas de Conservation Genetics: seis trabajos (10%), Journal of Mammalogy: cinco (8%), Evolution: cuatro (7%), Mammalian Genome y Genomics: tres (5%) cada una. Los 21 trabajos restantes (36%) corresponden a 17 revistas diferentes, con uno o dos artículos por revista, lo cual significa que también existe un sesgo hacia ciertas revistas que han publicado artículos con estudios de roedores con microsatélites (Fig 3).

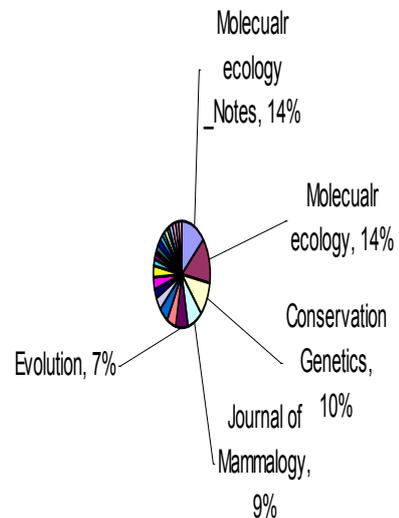


Fig 3. Porcentaje de trabajos por revista relacionados con roedores y microsatélites.

Al analizar los resultados por país, son 20 países los que cuentan con publicación de estudios de roedores y microsatélites; de éstos, Estados Unidos es el país con mayor número de publicaciones con 15 artículos (25%); por el contrario, hay 10 países que corresponden a la mitad de los que se encontraron en esta revisión que tienen solo una publicación; en el caso de México sólo dos publicaciones (Fig. 4).

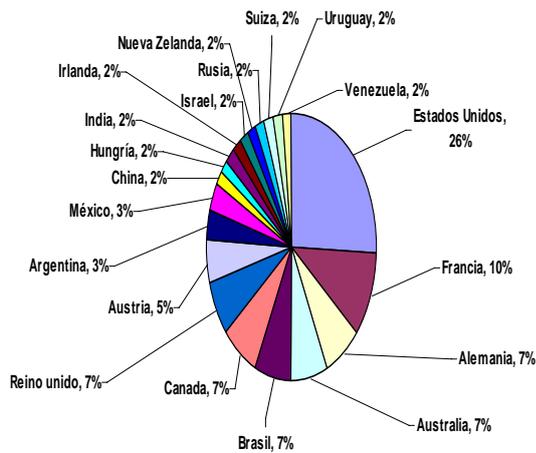


Fig 4. Porcentaje de artículos publicados por país con la temática de roedores y microsatélites.

Observando los resultados por año, encontramos trabajos publicados durante catorce años no consecutivos, siendo la primera publicación en 1993 y la más reciente en abril de 2008. Existe también un sesgo en los años de publicación ya que en tres años se publicaron la mitad de los artículos revisados: 2004, 2005 y 2007, siendo 2004 el año con mayor número de publicaciones (12, 20%); por el contrario, durante 1993 y 1998 sólo hubo una publicación (2%). Al momento de realizar el presente estudio (2008) sólo encontramos una publicación (Fig. 5).

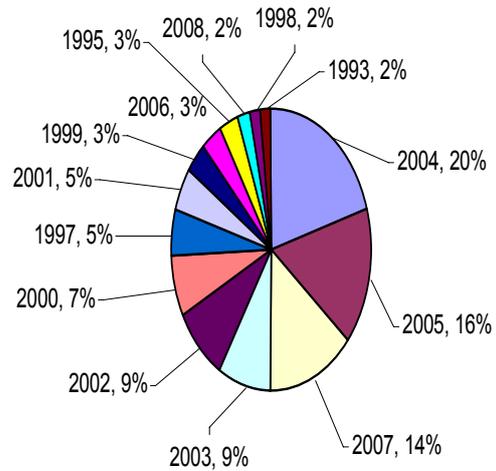


Fig 5. Porcentaje de artículos de roedores y microsatélites publicados por año.

DISCUSIÓN

Considerando el sesgo observado en el presente trabajo, con relación a los estudios que han utilizado microsatélites como marcador molecular, vemos que la mayoría se han concentrado en el desarrollo de bibliotecas genómicas, por lo que no sorprende que *Molecular Ecology* y *Molecular Ecology Notes* sean las revistas en las que encontramos el mayor número de publicaciones. Ello porque *Molecular Ecology*, en su primer volumen, indica explícitamente que se publican trabajos cuyos temas de investigación estén enfocados en responder preguntas utilizando tecnologías moleculares (Burke et al., 1992). Sin embargo, a partir de 2001 con la aparición de *Molecular Ecology Notes*, se cambió el perfil de la revista, por

lo cual en el primer volumen impreso (2001) de *Molecular Ecology Notes* se resalta que fue creada para “facilitar la diseminación rápida de los avances en ecología molecular, tales como programas de cómputo, innovaciones metodológicas y desarrollo de marcadores moleculares”. Cabe resaltar no obstante que la primera descripción de microsatélites fue publicada en el *American Journal of Human Genetics* en 1989, por Litt y Luty del departamento de bioquímica de la Universidad de Ciencias de la Salud de Oregón, en los Estados Unidos, lo que nos habla de que este país fue el pionero en realizar estudios utilizando este marcador.

A pesar de que el auge de los microsatélites fue en 1989, nuestros resultados muestran que es sólo a principios del año 2000 que éstos empezaron a ser utilizados en roedores. Ello motiva a preguntarse cuál puede ser la razón de esto, pues en otros grupos como los cánidos (Ortega 2007) han sido mucho más utilizados.

Una posible respuesta es que los grupos que han sido más estudiados son grupos carismáticos (*i.e.* Carnívora) o cuyas poblaciones están amenazadas o en peligro de extinción (*i.e.* felinos). Esas características los convierten en grupos prioritarios para estudios de muy diversos temas. Sin embargo, hay que reconocer que

los roedores son de gran utilidad como grupo modelo, ya que presentan características como tiempos generacionales cortos, altas densidades poblacionales y tamaño corporal pequeño, características que los convierten en un buen modelo para realizar estudios sobre genética y conservación (Jenzen 1984, Paillat y Butet 1996). Sus tiempos generacionales cortos han permitido estimar el efecto de disturbios recientes (Redeker *et al.* 2006). La alta densidad poblacional (10 – 45 ind/ha) es relevante porque permite discriminar condiciones asociadas con otros factores diferentes a los esperados bajo efectos antropogénicos. (Sommer 2003). Su tamaño pequeño está asociado con una limitante en el movimiento de individuos, por lo que son potencialmente más susceptibles, y por ello útiles para evidenciar efectos negativos sobre su capacidad de dispersión (Paillat y Butet 1996).

Otra causa, de por qué en general hay pocas librerías de microsatélites, aunque no derivada de esta revisión, puede ser porque es un proceso costoso porque está basado en secuenciación y diseño de cebadores específicos para cada locus. Además, se requiere tener información, generalmente de la secuencia completa, de la región genómica donde se localiza el microsatélite (Montaño-Pérez *et al.* 2006). Los pasos para la realización de una librería

genómica (aislamiento y secuenciación de microsatélites, diseño de los cebadores, optimización de PCR, amplificación de cada par de primer, y prueba de polimorfismos en individuos no relacionados) son caros y/o implican mucho tiempo, lo que ha llevado a muchos grupos de investigación a recurrir a servicios externos de instituciones académicas o compañías. El costo de tales servicios varía, pero está relacionado con el número de loci polimórficos que se requieren, una encuesta a proveedores de servicios indicó que, en promedio, 10 loci polimórficos tienen un costo de 5,000 a 10,000 dólares, son entregados en cualquier parte del mundo de uno a tres meses (Abdelkrim et al. 2009); razón por la que podría preferirse invertir en librerías para ciertos grupos.

Sin embargo, en nuestros resultados podemos observar que se han empezado a desarrollar las bibliotecas genómicas de ciertas familias de roedores. Ciertamente, los estudios de conservación, análisis de paternidad entre otros son, de acuerdo a nuestros resultados, aún muy pocos.

De acuerdo a nuestros resultados, la familia Muridae ha sido la de mayor objeto de estudio, una hipótesis es porque es la familia más numerosa de mamíferos (150 géneros y 730 especies; Wilson y Reeder 2005) y de más amplia distribución.

Otra familia que ha sido ampliamente estudiada con microsatélites es Sciuridae, la cual incluye a perros de la pradera, marmotas, ardillas terrestres y voladores. Nuevamente, esta familia se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, sólo ausentes de Australia, Madagascar, las regiones polares, el sur de Sudamérica y algunas islas remotas (Ceballos y Oliva 2005). Además se reconocen actualmente 278 especies dentro de esta familia en el mundo, distribuidas en 51 géneros (Wilson y Reeder 2005), por lo que es fácilmente utilizada para diferentes estudios.

En este trabajo también buscamos evaluar el potencial de la técnica de microsatélites en estudios de genética del paisaje (Manel et al. 2003). Encontramos que aunque en varios de los estudios aquí revisados no se menciona explícitamente que fueran estudios de genética del paisaje, éstos corresponden al tipo de estudios que se engloban en esta área de investigación, de acuerdo a la descripción de Storffer y colaboradores (2007). Así, la mayoría de los estudios que revisamos están enfocados en evaluar hipótesis específicamente relacionadas en evaluar cómo la ecología de las especies de estudio se relaciona con los patrones de la variación genética, por ejemplo la predisposición a la dispersión a sitios de nacimiento (Song et al. 2005), o la cuantificación del efecto de la configuración

del paisaje sobre el flujo genético (Schweizer et al. 2007). Así, vemos que esta área de investigación está tomando fuerza desde que fue acuñado este término en 2003 por Manel y colaboradores.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo representa un análisis descriptivo de los estudios hechos con roedores en los cuales se han utilizado los microsatélites como el marcador molecular para responder preguntas tales como caracterización de microsatélites (descripción de bibliotecas genómicas), genética del paisaje, diversidad y estructura genética poblacional, análisis de paternidad, cuellos de botella, sistemas de apareamiento, mapas genéticos, taxonomía y filogeografía, y así apreciar el potencial de esta técnica molecular para estudios con roedores.

Desde el 2002 existe una tendencia a un mayor número de estudios con microsatélites en roedores, lo cual debe relacionarse a un mayor reconocimiento del poder de esta técnica ya que cumple con los requisitos indispensables para generar un sistema confiable, como otras técnicas ampliamente utilizadas (*i.e.* AFLP's, ISSR's, ADN mitocondrial y RAPD's). Sin embargo, y a pesar de que en años recientes los estudios que han incluido microsatélites se han incrementado considerablemente, es necesario contar con librerías genómicas de

más grupos, sobre todo porque utilizar microsatélites desarrollados para una especie normalmente no funcionan en otras, aún siendo especies hermanas (Munguía et al. 2007).

Aunque el tipo de preguntas para los que han sido utilizados los microsatélites abarcan gran diversidad de temas, éstas se ven limitadas porque van dirigidas a ciertos grupos, en ciertas regiones y por ciertos países.

Particularmente en el caso de México, de acuerdo a nuestros resultados, los estudios publicados sobre roedores con microsatélites aún son muy pobres, a pesar de que el país cuenta con el 11.5% del total de las especies de roedores descritas (Ceballos y Oliva, 2005).

Indudablemente, es importante impulsar estudios dirigidos a evaluar aspectos de genética poblacional en roedores, ya que éstos pueden ser utilizados como grupos modelo, pero sobre todo porque en nuestro país existen especies endémicas. las cuales deberían ser ampliamente estudiadas para acciones de protección.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelkrim, J., B.C. Robertson, J.A.L. Stanton y N.J. Gemmell. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific

- microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques* 46(3):185-191.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd ed. Sunderland, M.A: Sinauer Associates.
- Ceballos, G. y G. Oliva. 2005. *Mamíferos silvestres de México*. Conabio y Fondo de cultura Económica. México. 23-25 pp.
- Ceballos, G., J. Arroyo-Cabrales, R.A. Medellín y Y. Domínguez-Castellanos. 2005. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 9: 21-71.
- Ceballos, G., J., Arroyo-Cabrales y R.A., Medellín. Mamíferos de México. En *Diversidad y conservación de los Mamíferos Neotropicales* (Ceballos, G. y J.A., Simonetti eds.). Conabio. México. 377-414 pp.
- FitzSimmons N.N., C., Moritz y S.S., Moore. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 432-440.
- Hedrick, P.W., 2005. *Genetics of populations*. Third ed. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury Massachusetts. USA.
- Jenzen, T.S. 1984. Habitat distribution, home range and movements of rodents in mature forest and reforestation. *Acta Zoologica Fennica*. 171:305-307
- Kocher, T.D., W.K., Thomas, A., Meyer, S.V., Edwards, S., Pavo, F.X., Villablanca y A.C., Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 6196-6200.
- Litt, M. y J.A. Luty. 1989. An hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum Genet.* 44(3): 397-401-
- Liu, Z.J. y J.F., Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Manel, S., M.K., Schwartz, G., Luikart y P., Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18(4): 189-197.
- Montaño-Pérez, K., E., Villalpando-Canchola y F., Vargas-Albores. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia* 31(8): 563-569.
- Munguía Vega, A., Rodríguez-Estrella y M.C., Blázquez. 2007. Characterization of nine microsatellites loci on endemic kangaroo rats *Dipodomys simulans peninsularis* from southern Baja California Peninsula. *Molecular Ecology Notes* 7: 127-129.
- Müller, U.G. y L.L., Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14:19-32.
- Ortega, J. 2006. Estudios moleculares en murciélagos: inferencias basadas en ADN mitocondrial y microsatélites. En: *Genética y Mamíferos mexicanos: presente y futuro*. (E. Vázquez-Domínguez y D. J. Hafner, eds.). Editorial Borrad, USA.
- Redeker, S., W., Andersen, C., Pertoldi, A. B., Madsen, T.S., Jensen, y J.M., Jorgensen. 2006. Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks. in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Mammalian Biology*. 71:144-158
- Rico C, I., Rico, y G., Hewitt. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263, 549-557.
- Selkoe, K.A. y R.J., Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical

- guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**: 615-629.
- Schlötterer C., B., Amos y D., Tautz. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-65.
- Schweizer M., L., Excoffier y G., Heckel. 2007. Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* **16**(12): 2463-2473.
- Sommer, S. 2003. Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behavior after a recent population decline on the genetic variability of noncoding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent. *Molecular Ecology*. **12**:2845-1851
- Song M., Z., Zhang, K., Neumann y R., Gattermann. 2005. Sex-biased dispersal of greater long-tailed hamster (*Tscherskia triton*) revealed by microsatellites. *Canadian Journal of Zoology* **83**(6): 773-779.
- Storfer, A., M.A., Murphy, J.S., Evans, c.S., Goldberg, S. Robinson, S.F., Apear, R., Dezzani, L., Vierling y L.P. Waits. 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* **98**: 128-142.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population Biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**:199-203.
- Wilson, D.E. y P.M. Reeder. 2005. *Mammal species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Third Ed. The Johns Hopkins University Press.
- Zane, L., L., Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**: 1-16.

Anexo I

Caracterización de microsatélites

- Barclay S.D., B., Costello y W.B., Sherwin. 2006. Limited cross-species microsatellite amplification and the isolation and characterization of new microsatellite markers for the greater stick-nest rat (*Leporillus conditor*). *Molecular Ecology Notes* **6**(3): 882-885
- Bois P.R.J., L., Southgate y A.J., Jeffreys. 2001. Length of uninterrupted repeats determines instability at the unstable mouse expanded simple tandem repeat family MMS10 derived from independent SINE B1 elements *Mammalian Genome* **12**(2): 104- 111
- Callahan C.R., A.P., Henderson, M.S., Eackles y T.L., King. 2005. Microsatellite DNA markers for the study of population structure and dynamics in nutria (*Myocastor coypus*). *Molecular Ecology Notes* **5**(1): 124-126.
- Chiappero M.B., C.N., Cardenal y G.M., Panzetta-Dutari. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Calomys musculinus* (Muridae, Sigmodontinae, Phyllotini), the natural reservoir of Junin virus. *Molecular Ecology Notes* **5**(3): 593-595.
- Davis C., B., Keane, B., Swanson, S., Loew, P.M., Waser, C., Strobeck, R.C. y Fleischer. 2000. Characterization of microsatellite loci in bannertailed and giant kangaroo rats, *Dipodomys spectabilis* and *Dipodomys ingens*. *Molecular Ecology* **9**(5): 642- 644.
- Galan M., W.F., Van Hoof, D., Legrand, K., Berthier, A., Loiseau, L., Granjon y J.F., Cosson. 2004. A multiplex panel of microsatellite markers for widespread sub-Saharan rodents of the genus *Mastomys*. *Molecular Ecology Notes* **4**(3): 321-323.
- Gockel J., B., Harr, C., Schlotterer, W., Arnold, G., Gerlach y D., Tautz. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Apodemus flavicollis* (rodentia, muridae) and *Clethrionomys glareolus* (rodentia, cricetidae). *Molecular Ecology* **6**(6): 597-599.
- Herrera E.A., M.E., Chemello, E.A., Lacey, V., Salas y B.F., Sousa. 2004. Characterization of microsatellite markers from capybaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochoeridae). *Molecular Ecology Notes* **4**(4): 541-543.
- Janecek L.L., J.L., Longmire, H.A., Wichman y R.J., Baker. 1993. Genome organization of repetitive elements in the rodent, *Peromyscus leucopus*. *Mammalian Genome* **4**(7): 374-381.
- Kruckenhauser L. y W., Pinsker. 2004. Microsatellite variation in autochthonous and introduced populations of the Alpine marmot (*Marmota marmota*) along a European west-east transect. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **42**(1): 19-26.
- Kruckenhauser L., E., Haring y W., Pinsker. 1999. Microsatellite variation in two species of the genus *Marmota* (Rodentia, Sciuridae). *Folia Zoologica* **48** (SUPPL. 1): 29-36.
- Lacey E.A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: Molecular properties and population dynamics. *Heredity* **86**(5): 628-637.
- Loiseau A., A., Konecny, M., Galan, J., Bryja, J.F., Cosson y C., Brouat. 2007. New polymorphic microsatellite loci for rodents of the genus *Mastomys* using PCR multiplexing, and cross-species amplification in *Myomys* and *Praomys*. *Molecular Ecology Notes* **7**(4): 684-687.
- Maroja L.S., F.C., Almeida, R., Cerqueira, H.N., Seuanes y M.A.M. Moreira. 2003. *Nectomys squamipes* microsatellites and homologous loci in sigmodontine rodents. *Journal of Heredity* **94**(2): 171-174.

- Moro D. y P.B.S Spencer. 2003. Microsatellite primers for the Western Pebble-mound Mouse (*Pseudomys chapmani*) that show cross amplification for other species of Australian rodent. *Molecular Ecology Notes* **3**(2): 259-261.
- Moncrief N.D., N.E., Cockett, A.D., NET, W.L., Thomas y R.D., Dueser. 1997. Polymorphic microsatellites in the meadow vole *Microtus pennsylvanicus*: Conservation of loci across species of rodents. *Molecular Ecology* **6**(3): 299-301.
- Neumann K. y H., Jansman. 2004. Polymorphic microsatellites for the analysis of endangered common hamster populations (*Cricetus cricetus* L.). *Conservation Genetics* **5**(1): 127-130.
- Munguía Vega, A., Rodríguez-Estrella y M.C., Blázquez. 2007. Characterization of nine microsatellites loci on endemic kangaroo rats *Dipodomys simulans peninsularis* from southern Baja California Peninsula. *Molecular Ecology Notes* **7**: 127-129.
- Schroeder J.W., R.L., Honeycutt, A.P., Rooney, G., Han, S., Begall y M.H., Gallardo. 2000. Microsatellites from the South American Coruro, *Spalacopus cyanus*. *Molecular Ecology* **9**(9): 1447-1449.
- Stallings R.L. 1995. Conservation and evolution of (CT)(n)/(GA)(n) microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. *Genomics* **25**(1): 107-113.
- Toth G., Z., Gaspari y J., Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Surveys and analysis. *Genome Research* **10**(7): 967-981
- Trivedi S. 2004. Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. *Indian Journal of Biotechnology* **3**(3): 331-347.

Genética del paisaje

- Bidlack A.L. y J.A., Cook. 2002. A nuclear perspective on endemism in northern flying squirrels (*Glaucomys sabrinus*) of the Alexander Archipelago, Alaska, *Conservation Genetics*: **3**(3): 247-259.
- Dallas, J.F., B., Dod, P., Boursit. E.M., Prager y F. Bonhomme. 1995. Population subdivision and gene flow in danish house mice. *Molecular Ecology* **4**: 311-320.
- Da Silva A., G., Luikart, N.G., Yoccoz, A., Cohas y D., Allaine. 2006. Genetic diversity-fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Conservation Genetics* **7**(3): 371-382.
- Garner A., J.L., Rachlow y L.P., Waits. 2005. Genetic diversity and population divergence in fragmented habitats: Conservation of Idaho ground squirrels. *Conservation Genetics* **6**(5): 759-774.
- McEachern M.B., J.M., Eadie y D.H., Van Vuren. 2007. Local genetic structure and relatedness in a solitary mammal, *Neotoma fuscipes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **61**(9): 1459-1469.
- Robertson B.C., y N.J., Gemmell. 2004. Defining eradication units to control invasive pests. *Journal of Applied Ecology* **41**(6): 1042-1048.
- Schweizer M., L., Excoffier y G., Heckel. 2007. Fine-scale genetic structure and dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* **16**(12): 2463-2473.
- Song M., Z., Zhang, K., Neumann y R., Gattermann. 2005. Sex-biased dispersal of greater long-tailed hamster (*Tscherskia triton*) revealed by microsatellites. *Canadian Journal of Zoology* **83**(6): 773-779.

- Stewart W.A., J.F., Dallas, S.B., Piertney, F., Marshall, X., Lambin y S., Telfer. 1999. Metapopulation genetic structure in the water vole, *Arvicola terrestris*, in NE Scotland. *Biological Journal of the Linnean Society* **25**(1): 159-171.
- Telfer S., J.F., Dallas, J., Aars, S.B., Piertney, W.A., Stewart y X., Lambin. 2003. Demographic and genetic structure of fossorial water voles (*Arvicola terrestris*) on Scottish islands. *Journal of Zoology* **259**(1): 23-29.
- Wlasiuk G., J.C., Garza y E.P., Lessa. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys Rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* **57**(4): 913-926.

Diversidad y estructura genética

- Abdelkrim J., M., Pascal y S., Samadi. 2008. Genetic structure and functioning of alien ship rat populations from a Corsican micro-insular complex. *Biological invasions*: 1-10.
- Almeida F.C., L.S., Maroja, M.A.M., Moreira, H.N., Seuanez y R., Cerqueira. 2005. Population structure and genetic variability of mainland and insular populations of the Neotropical water rat, *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae). *Genetics and Molecular Biology* **28**(4): 693-699.
- Degner J.F., I.J., Stout, J.D., Roth, C.L. y Parkinson. 2007. Population genetics and conservation of the threatened southeastern beach mouse (*Peromyscus polionotus niveiventris*): Subspecies and evolutionary units. *Conservation Genetics* **8**(6): 1441-1452.
- Gava A. y T.R., De Freitas. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* **85**(6): 1201-1206.
- Gockel J. y T. Ruf. 2001. Alternative seasonal reproductive strategies in wild rodent populations. *Journal of Mammalogy* **82** (4): 1034-1046.
- Vega R., E., Vazquez-Dominguez, A., Mejia-Puente y A.D., Cuarón. 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Oryzomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation* **137**(2): 210-222.

Análisis de paternidad

- Cutrerá A.P., E.A., Lacey, C., Busch. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): Implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* **14**(8): 2511-2523.
- Goossens B., L., Graziani, L.P., Waits, E., Farand, S., Magnolon, J., Coulon, M.C., Bel, P., Taberlet y D., Allaine. 1998. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**: 281-288.
- Shurtliff Q.R., D.E., Pearse y D.S., Rogers. 2005. Parentage analysis of the canyon mouse (*Peromyscus crinitus*): Evidence for multiple paternity. *Journal of Mammalogy* **86**(3): 531-540.
- Solomon N.G., B., Keane, L.R., Knoch y P.J., Hogan. 2004. Multiple paternity in socially monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Canadian Journal of Zoology* **82**(10): 1667-1671.

Mapas genéticos

- Kaisaki P.J., M., Rouard M., P.A.C., Danoy, R.H., Wallis, S.C., Collins, M., Rice, E.R., Levy, M., Lathrop, M.T., Bihoreau y D., Gauguier. 2000. Detailed comparative gene map of rat chromosome 1 with mouse and human genomes and physical mapping of an evolutionary chromosomal breakpoint. *Genomics* **64**(1): 32-43.
- Koelsch B.U., M.F., Rajewsky y A., Kindler-Rohrborn. 2005. A 6-Mb contig-based comparative gene and linkage map of the rat schwannoma tumor suppressor region at 10q32.3. *Genomics* **85**(3): 322-329.
- Meagher S. y W.K., Potts. 1997. A microsatellite-based MHC genotyping system for house mice (*Mus domesticus*). *Hereditas* **127**: 75-82.
- Weinshenker D., M.M., Wilson, K.M., Williams, J.M., Weiss, N.E., Lamb y S.N., Twigger. 2005. A new method for identifying informative genetic markers in selectively bred rats. *Mammalian Genome* **16**(10): 784-791.

Sistemas de apareamiento

- Kyle C.J., T.J., Karels, C.S., Davis, S., Mebs, B., Clark, C., Strobeck y D.S., Hik. 2007. Social structure and facultative mating systems of hoary marmots (*Marmota caligata*). *Molecular ecology* **16**(6): 1245-1255.
- Schulte-Hostedde A.I., J.S., Millar y H.L., Gibbs. 2004. Sexual selection and mating patterns in a mammal with female-biased sexual size dimorphism. *Behavioral Ecology* **15**(12): 3561-3566.
- Schulte-Hostedde A.I., J.S., Millar y H.L., Gibbs. 2002. Female-biased sexual size dimorphism in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*): Sex-specific patterns of annual reproductive success and survival. *Evolution* **56**(12): 2519-2529.

Filogeografía.

- Karanth K.P., A., Avivi, A., Beharav y E., Nevo. 2004. Microsatellite diversity in populations of blind subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi* superspecies) in Israel: Speciation and adaptation. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**(2): 229-241..
- Mendez-Harclerode F.M., R.E., Strauss, C.F., Fulhorst, M.L., Milazzo, III D.C., Ruthven y R.D., Bradley. 2007. Molecular evidence for high levels of intrapopulation genetic diversity in woodrats (*Neotoma micropus*). *Journal of Mammalogy* **88**(2): 360-370.
- Orth A., K., Belkhir, J., Britton-Davidian, P., Boursot, T., Benazzou y F., Bonhomme. 2002. Natural hybridisation between two sympatric species of mice *Mus musculus domesticus* L. and *Mus spretus* Lataste. *Comptes Rendus-Biologies* **325**(2): 89-97.

Cuellos de botella

- Maroja L.S., F.C., Almeida y H.N., Seuanez. 2003. Genetic differentiation in geographically close populations of the water rat *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Biology* **26**(4): 403-410.
- Neumann, K., H., Jansman, A., Kayser, S., Maak y R., Gattermann. 2004. Multiple bottlenecks in threatened western European populations of the common hamster *Cricetus cricetus* (L.). *Conservation Genetics* **5**(2): 181-193.

Taxonomía

Matocq M.D. 2002. Morphological and molecular analysis of a contact zone in the *Neotoma fuscipes* species complex. *Journal of Mammalogy* **83**(3): 866-883.

Panithanarak T., H.C., Hauffe, J.F., Dallas, A., Glover, R.G., Ward y J.B., Searle. 2004. Linkage-dependent gene flow in a house mouse chromosomal hybrid zone. *Evolution* **58**(1): 1-192.

Diversidad alélica

Hambuch T.M. y E.A., Lacey. 2002. Enhanced selection for MHC diversity in social tuco-tucos. *Evolution* **56**(4): 841-845.

CAPITULO II

Relación entre la perturbación de una selva seca y la estructura genética poblacional de *Liomys irroratus*

Resumen

En las selvas secas, dos de los factores que potencialmente pueden afectar la composición espacial y temporal de la diversidad de vertebrados son la estacionalidad climática y la perturbación y fragmentación del hábitat. La perturbación y fragmentación de la vegetación puede tener efectos sutiles y difíciles de detectar sobre la biodiversidad y, con ello, afectar la probabilidad de permanencia de las especies a mediano y largo plazo, por ejemplo puede afectar las características genéticas de las poblaciones. La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla (REBIOSH) en Morelos, México, que protege uno de los remanentes de selva seca más importantes del país en el centro de México, presenta a su vez diferentes grados de alteración. En dicho escenario se evaluó la diversidad y estructura genética de poblaciones del ratón *Liomys irroratus*, para determinar cómo cambian dichos parámetros entre sitios que presentan grados de perturbación de la selva seca contrastantes; asimismo, para explorar las implicaciones de los resultados obtenidos para el manejo de la biodiversidad en la REBIOSH. Se colectaron muestras de tejido (falanges) de 79 individuos del ratón espinoso mexicano *Liomys irroratus* en cuatro sitios con diferentes grados de perturbación dentro de la reserva. Se amplificó el gen mitocondrial citocromo b (550 pares de bases) y se determinó que los loci no están sujetos a procesos selectivos (pruebas de neutralidad no significativas), el número de haplotipos fue alto (59), así como la diversidad nucleotídica ($\pi_{total} = 0.505 \pm 0.020$) y haplotípica ($h_{total} = 0.987 \pm 0.0069$). La divergencia entre las poblaciones fue mayoritariamente asociada a la diferencia entre individuos ($D_{xy} = 49.6-51.5\%$) y la distancia genética dentro y entre poblaciones fue alta. El número de migrantes por generación fue 13.4 (Nm estimado a partir de δ_{st} y γ_{st}). Las poblaciones no presentaron aislamiento por distancia ni estructuración genética (análisis de varianza molecular y red media de haplotipos). Se sugieren dos escenarios posibles para explicar los resultados encontrados, primero puede ser que la estudiada sea una sola población panmíctica que fue genéticamente muy diversa, o que se trata de una metapoblación. Es importante que para cualquier acción de conservación que se diseñe, se incluya el mantener la alta diversidad genética que presentan las poblaciones de *L. irroratus* en la reserva.

Palabras clave: Liomys irroratus, selvas secas, perturbación, Genética del paisaje.

Abstract

In the dry forests, two of the factors that could affect the spatial and temporal composition of vertebrate diversity are the seasonality, and habitat disturbance and fragmentation. The disturbance and fragmentation of vegetation can have subtle and difficult effects to detect on biodiversity and thereby affect the probability of permanence of species in the medium and long term, for example, it may affect the genetic characteristics of populations. The Biosphere Reserve of Sierra de Huautla (REBIOSH) in Morelos, Mexico, which protects one of the remnants of dry forest in the country at the center of Mexico, has also different degrees of alteration. Under this scenario, we evaluated the diversity and genetic structure of mouse populations of *Liomys irroratus*, to determine how these parameters change between sites that present levels of disturbance of the contrasting dry forest, also to explore the implications of the results for the management of the biodiversity in the REBIOSH. Tissue samples were collected (phalanges) of 79 individuals of Mexican spiny pocket mouse *Liomys irroratus* in four sites with different degrees of disturbance within the reserve. The mitochondrial cytochrome b gene (550 bp) was amplified and we found that the loci are not subject to selection procedures (tests of neutrality does not significant), the number of haplotypes was high (59) and nucleotide diversity ($\pi_{total} = 0.505 \pm 0.020$) and haplotype ($h_{total} = 0.987 \pm 0.0069$). The divergence among populations was mainly associated with the difference between individuals ($D_{xy} = 49.6-51.5\%$) and genetic distance within and between populations was high. The number of migrants per generation was 13.4 (N_m estimated from δ_{st} y γ_{st}). Populations showed neither isolation by distance nor genetic structuring (analysis of molecular variance and mean haplotype network). We suggest two possible scenarios to explain the results found, firstly the population studied is a single panmictic population that was genetically very diverse, or that it is a metapopulation. It is important for any conservation action that is designed, is included to maintain the present high genetic diversity of *L. irroratus* in the reserve.

Key word: Liomys irroratus, dry forests, perturbation, Landscape Genetics.

INTRODUCCIÓN

Las modificaciones al paisaje y la fragmentación del hábitat son actualmente temas de gran interés en la biología de la conservación (Haila 2002, Fazey et al. 2005, Fisher y Lindenmayer 2007), ya que se considera que impactan negativamente a la mayoría de los grupos taxonómicos (Fisher y Lindenmayer 2007, Radespiel et al. 2008).

La fragmentación se ha estudiado intensamente (Haila 2002), ya que disminuye la conectividad e incrementa la distancia entre los parches de hábitat remanentes (Lindsay et al. 2008), lo que puede por ejemplo afectar la dispersión de genes mediante la polinización y, por consiguiente, el sistema de reproducción de plantas (O'Connell et al. 2006, Culley et al. 2007). Puede generar también un "rearreglo" del paisaje que puede producir cambios rápidos en la disponibilidad de nichos, resultando en cambios sobre la distribución y la estructura de la metapoblación (Trénel et al. 2008). En el caso de poblaciones amenazadas o en peligro, el riesgo de extinción aumenta debido a que estas poblaciones normalmente existen en densidades poblacionales bajas (Lindsay et al. 2008). Las consecuencias de la fragmentación pueden variar dependiendo del organismo, del tipo de hábitat, de la región geográfica, de factores como área remanente, distancia al siguiente hábitat continuo y grado de conectividad entre los parches (Haila 2002, Goodwin 2003, MacDonald y St. Clair 2004).

En particular, la fragmentación del paisaje ha provocado en muchos casos el aislamiento de las poblaciones y la reducción del tamaño poblacional de las mismas (Van de Zande et al. 2000). Los parches o fragmentos de hábitat suelen considerarse como "islas" en términos de flujo genético y diversidad genética, en los que disminuye la diversidad genética y aumenta la endogamia dentro de las poblaciones y, entre poblaciones, disminuye el flujo genético y aumenta la diferenciación genética (Primmack 1993, Kim et al. 1998, Haila 2002, Willi et al. 2007). Dichas poblaciones pequeñas y aisladas son muy susceptibles a eventos estocásticos, lo que resulta en fluctuaciones del tamaño poblacional y de otros parámetros demográficos. Además, los niveles de variabilidad genética (e.g. número de alelos o heterocigosidad) disminuyen en estas poblaciones, resultado principalmente de la deriva génica y entrecruzamiento (Van Treuren et al. 1993, Templeton y Read 1994, Garner et al. 2005). Este proceso de erosión genética puede disminuir el potencial adaptativo de las poblaciones a cambios ambientales, así como la adecuación individual, lo que incrementa el riesgo de extinción de las mismas (Goodman 1987, Hedrick 1996, Sachaccheri et al. 1998, Bijlsma et al. 2000).

Los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y la divergencia entre éstas varían de acuerdo con el grado de fragmentación que presentan (Garner et al. 2005), es decir, a mayor distancia geográfica entre los parches y/o a mayor tiempo de aislamiento, se espera que la diversidad genética disminuya y por lo tanto, las poblaciones presenten una mayor divergencia. Por el contrario, el flujo genético disminuye la diferenciación y la pérdida de la diversidad genética (Frankham et al. 2005).

Flujo genético

El movimiento de individuos y sus genes tienen efecto sobre gran diversidad de procesos ecológicos y evolutivos, tales como la persistencia de la población y la respuesta adaptativa a cambios ambientales (Frankham et al. 2005). Así, la dispersión efectiva o flujo genético es uno de los mayores procesos evolutivos que determinan la estructura genética de una población (Hedrick 2005). En la naturaleza, las poblaciones están frecuentemente divididas en distintas subpoblaciones conectadas entre sí por diferentes grados de flujo genético (Pérez-Espona et al. 2008).

Se puede distinguir entre flujo genético intraespecífico e interespecífico. El primero tiene un papel importante en la evolución de las especies debido a que su efecto de homogeneizar las frecuencias genéticas actúa en oposición del efecto de la deriva génica (Dallas et al. 1995). El segundo es un proceso complejo que está influenciado por muchos factores intrínsecos como la habilidad innata de dispersión y también por factores extrínsecos como las características del paisaje u otros factores ambientales (Lowe et al. 2004); además, se ve reducido por la disminución de la dispersión por barreras físicas y el aislamiento por distancia, lo que puede resultar en un incremento de la endogamia y la deriva génica.

El estudio del flujo genético en hábitat fragmentados y entre las especies asociadas a dichos hábitat, es de gran importancia ya que, por ejemplo especies comunes y de distribución amplia en general no necesitan mecanismos bien desarrollados para dispersarse; sin embargo, aquellas especies que tienen dispersión limitada tienen mayor riesgo en paisajes alterados, donde la matriz que rodea los parches es de mala calidad (Manel et al. 2003, Holderegger y Wagner 2008, Peakall y Lindenmayer 2006).

La influencia de las características del paisaje sobre la dispersión y sobre la estructura genética poblacional se reconoce desde hace tiempo (Fisher y Ford 1947). Sin embargo, sólo recientemente se planteado estudios específicos para evaluar el efecto de las características

del paisaje sobre la estructura genética poblacional ha sido evaluada cuantitativamente. Ello está asociado al surgimiento de una nueva área de investigación que combina ecología del paisaje con genética de poblaciones, una disciplina conocida como Genética del Paisaje (Manel et al. 2003).

Genética del paisaje

La genética del paisaje es un campo interdisciplinario que está evolucionando rápidamente, e integra el enfoque de la genética de poblaciones y el de la ecología del paisaje (Manel et al. 2003, Holderegger y Wagner 2006, 2008). En un sentido amplio, de acuerdo con Storffer y colaboradores (2007), es un “área de investigación que explícitamente cuantifica los efectos de la composición, configuración y calidad de la matriz del paisaje, sobre el flujo genético y la variación genética espacial”. Sólo recientemente empieza a tener su propia estructura conceptual y metodológica, así como sus propias herramientas analíticas o estadísticas, donde combina aproximaciones y métodos de la ecología del paisaje, de la genética de poblaciones y la estadística espacial (Guillot et al. 2009).

La incorporación de la matriz del paisaje dentro de los estudios de genética del paisaje es una diferencia básica para discriminar entre genética del paisaje y genética de poblaciones. En genética del paisaje la matriz se considera como el mayor determinante de procesos biológicos y ecológicos al nivel del paisaje, y las diferencias en cantidad y la calidad de las áreas que separan los parches de hábitat son esenciales (Holderegger y Wagner 2008).

En el contexto de la fragmentación del hábitat, la genética del paisaje se enfoca en evaluar en que grado el paisaje facilita el movimiento de los organismos (conectividad del paisaje), al relacionar los patrones del flujo genético con la estructura del paisaje. La variación genética neutral entre los individuos o la estimación directa del flujo genético reciente están relacionados estadísticamente con las características del paisaje, tales como la presencia de barreras hipotéticas o la distancia de menor costo para permitir el movimiento de un organismo de un parche de hábitat a otro, dada la naturaleza de la matriz o los tipos de hábitat (Stoffer et al. 2007, Holderegger y Wagner 2006, 2008).

Las restricciones que los patrones del paisaje y la matriz imponen a la dispersión, y de esta forma a la distribución de plantas, animales y sus genes en el paisaje, tienen implicaciones para la dinámica y la persistencia de las poblaciones tanto como para la diversidad local de las especies. Como consecuencia, el mantenimiento del intercambio de individuos o genes entre

las poblaciones en diferentes parches de hábitat, o la restauración de tal intercambio (i.e. defragmentación), son determinantes en conservación (Fisher y Lindenmayer 2007).

La conectividad del paisaje se define como la interacción entre la conducta y capacidad de movimiento de los organismos y la estructura del paisaje (Goodwin 2003) y tiene un componente funcional y otro estructural (Brooks 2003). El enfoque de la genética del paisaje es adecuado para evaluar el efecto de la conectividad estructural del paisaje, tanto en la dispersión como en el flujo genético entre los parches (Holderegger y Wagner 2008). Sin embargo, la influencia de las características del paisaje sobre la estructura de la población ha sido evaluada en muy pocos casos usando aproximaciones directas. Por ejemplo, Epps et al. (2005), al incorporar los efectos de las barreras construidas por el hombre en regresiones de aislamiento por distancia, encontraron que las vías de trenes, canales y áreas desarrolladas en menos de 40 años, causaron un decremento rápido del flujo genético entre las poblaciones de la oveja de cuernos grandes (*Ovis canadensis nelsoni*) del sur de California.

Aunque las barreras al flujo genético pueden determinarse a través de la asociación de la presencia de ciertas características del paisaje con las discontinuidades genéticas observadas, es normalmente difícil separar cuáles características son las que más probablemente afectan el flujo genético, sobre todo por las interrelaciones que tienen entre sí los diferentes rasgos (características) que conforman el paisaje. La incorporación de sistemas de información geográfica (GIS) y estadística a estudios de genética del paisaje representan herramientas muy valiosas para visualizar y cuantificar el efecto de las características del paisaje sobre la estructura de la población en un amplio número de organismos (Funk et al. 2005, Vignieri 2005, Holderegger y Wagner 2006, Storffer et al. 2007).

Debido a que en genética del paisaje se consideran escalas espaciales relativamente pequeñas, los individuos de la especie en estudio están más cercanamente relacionados, por lo que las diferencias genéticas entre ellos son normalmente pequeñas. Por lo tanto, los análisis genéticos moleculares dependen de su poder de resolución (Holderegger y Wagner 2008). Actualmente, en genética del paisaje se utilizan comúnmente dos diferentes tipos de marcadores moleculares neutrales: los polimorfismos amplificados de la longitud del fragmento (AFLP's) y los microsatélites (Storffer et al. 2007, Holderegger y Wagner 2008). Sin embargo, marcadores que son heredados de manera uniparental, como el ADN del cloroplasto (para plantas; cpADN) y el ADN mitocondrial (para animales; mtADN), también pueden ser utilizados si hay suficiente variación entre los individuos dentro de los límites del paisaje (Holderegger y Wagner 2008).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten determinar el grado de variación genética existente entre los individuos de una población, entre poblaciones y entre especies. Para que un sistema molecular sea utilizado como marcador, debe cumplir ciertas propiedades como: ser distintivo y estar distribuido de tal forma que permita comparaciones de homología entre diferentes organismos, ser fácil de manejar, presentar ausencia de secuencias repetidas, transposones, pseudogenes e intrones, ser heredado de forma estricta (sin recombinación o alguna forma de rearreglo), proveer estados de carácter cualitativos (útiles para análisis bajo criterio de parsimonia y microevolución) y que la adquisición de un nuevo estado de carácter se presente en la frecuencia adecuada para el tipo de estudio (Avice 2004).

Con dichos marcadores es posible obtener información sobre la variabilidad genética, tasa de migración, presencia de cuellos de botella o relaciones de parentesco (Selkoe y Toonen 2006), determinar las poblaciones y las especies prioritarias para la conservación (Primack et al. 2001), conocer las relaciones filogenéticas e inferir posibles orígenes (Croizer 1997) o reconstruir la historia evolutiva (Avice 2000). Hasta la fecha se han descrito varias técnicas para marcadores moleculares de ADN, la principal ventaja de todas éstas es que la cantidad de ADN es mínima, por lo que permiten el empleo de métodos no invasivos en poblaciones silvestres (Broquel et al. 2007). Algunos marcadores son más informativos que otros, pero lo importante es seleccionar el marcador que sea adecuado para cumplir con los objetivos de la investigación (Schlötterer 2004). Dentro de los principales marcadores moleculares se encuentran las aloenzimas, los microsátélites y las secuencias de ADN mitocondrial y nuclear.

ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (DNAMt) es una porción del genoma especialmente útil para mostrar herencia uniparental, en las que las características pasan de un progenitor (madre) a sus descendientes (Klug y Cummings 1999), así revela patrones de filopatria y diferenciación poblacional (Avice 1994, Moore 1995, Parker et al. 1998, Glenn et al. 2002). Ha sido ampliamente usado en estudios de poblaciones de varios grupos taxónomicos (Avice 1994, Dessauer et al. 2002).

El ADN mitocondrial posee la mayoría de las propiedades que permiten que sea utilizado como marcador molecular para estudios evolutivos. Es una molécula de doble cadena circular, cerrada, de 15-20 kb de largo, transmitido por herencia materna y replicación unidireccional

asimétrica. Esta integrado por genes que codifican para RNAr(2), RNAt(22) y RNAm (13), que son subunidades de proteínas importantes para el transporte de electrones durante la síntesis de ATP. En la mayoría de los organismos no contiene intrones, fragmentos repetidos o pseudogenes, las regiones intergénicas son muy pequeñas o ausentes. Tiene secuencias iniciadoras de la replicación y transcripción dentro de la denominada región control (también llamada D-loop en vertebrados). No es recombinante, tiene una tasa de evolución rápida (1 a 10 veces mayor que el genoma nuclear) y alto polimorfismo intraespecífico. Sin embargo, el genoma mitocondrial posee particularidades como la heteroplasmia, homoplasia, tasas de cambio distintas a lo largo de la molécula, variabilidad genética bajo efecto de selección (y/o neutralismo) y herencia estrictamente materna, las cuales representan limitantes que deben ser consideradas en la interpretación de la información (Avice et al. 1987).

Los segmentos del ADNmt mayormente utilizados para estudios intraespecíficos ecológicos, biológicos y filogenéticos, son los segmentos del citocromo *b*, de la citocromo oxidasa III y región control.

Citocromo *b*

El citocromo *b* es la única proteína transcrita por genoma mitocondrial. Pertenece al complejo III del sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria y presenta una molécula equivalente en el cloroplasto (Widger et al. 1984). Estructuralmente, la secuencia (de la proteína y la del gen) ha sido utilizada para la identificación de especies y para conocer la variabilidad genética de las poblaciones.

La variabilidad genética y composición de bases dentro de la secuencia de citocromo *b* no se distribuye ni resulta de manera azarosa. La primera posición del codón presenta pocos cambios, mientras que la tercera tiene grandes diferencias entre especies (altas tasas de sustituciones silenciosas). La tasa de transición-reversión es inconstante en cada sitio del codón. La base en la tercera posición del codón es en su mayoría guanina, en la segunda posición timina y en la primera posición hay selección diferencial entre adenina y citosina de acuerdo al grupo de estudio (Prusak y Grzybowski 2004). Las regiones altamente conservadas se encuentran en las posiciones 30-40, 70-80, 120-150, 160-190 y 260-280, que corresponden a los centros de transferencia de electrones Qo y Qi, además de cuatro histidinas, mientras que las más variables son dos, la que va de la posición 230-250 y la cercana a la terminal carboxilo de la proteína (Martin y Palumbi 1993, Prusak y Grzybowski 2004).

En mamíferos, la tasa de evolución del citocromo *b* no es lineal. La tasa de remplazo de aminoácidos (y sustituciones no sinónimas) es más alta que en otros grupos (aprox 1.4 aminoácidos/millón de años) dada la acumulación de transversiones silenciosas. La fracción correspondiente a Q_i muestra niveles disímiles de variabilidad entre grupos pero para mamíferos es la más alta (Martin y Palumbi 1993).

Estructura genética

La estructura genética de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos (Wenink 1996). En las poblaciones naturales dicha estructura tiene un patrón temporal, ya que la proporción de individuos con un genotipo u otro cambia tanto en tiempos cortos (ecológicos) como largos (evolutivos). Asimismo, existe un patrón espacial de la estructura genética que se refleja en las diferencias genotípicas o fenotípicas entre individuos de la misma especie distribuidos en sitios diferentes (Hartl y Clark 1997, Hedrick 2005). Examinar las variaciones genéticas entre las poblaciones permite reconocer sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman et al. 2000). Dicha variación genética es un prerequisite para la evolución y de ahí su importancia (Hartl y Clark 1997, Hedrick 2005, Allendorf y Luikart 2007). Actualmente se reconoce que el conocimiento de la estructura genética es importante para evaluar la viabilidad de una población, información a su vez esencial para determinar acciones de conservación (Frankham et al. 2005, Pires de Campos et al. 2007).

Recientemente se ha propuesto que los patrones de estructura genética dentro y entre poblaciones deberían integrarse dentro de una evaluación más compleja de los patrones de ocupación humana y otros datos ambientales. Así, los parámetros genéticos pueden ser explícitamente analizados en un paisaje ocupado por humanos, ya que esto también lleva a una evaluación de cómo las modificaciones antropogénicas a nivel del paisaje afectan la diversidad genética (Manel et al. 2003, Guillot et al. 2005, Pires de Campos et al. 2007, Radespiel et al. 2008), ya que barreras artificiales como carreteras pueden inhibir el flujo genético y consecuentemente influenciar la diferenciación (estructura) genética. Por ello, la diferenciación genética se puede explicar como resultado de factores naturales y también antropogénicos (Radespiel et al. 2008).

Selvas secas

La selva seca conocida también como selva baja o bosque tropical caducifolio es característica de regiones de clima cálido, que se desarrolla entre los 0 a 1,900 msnm, con una temperatura media anual de 20 a 29°C, que presenta en relación a su grado de humedad. Tiene una estación de secas y otra de lluvias muy marcadas a lo largo de año, por lo que su precipitación media varía de 300 a 1,800 mm. Son comunidades que en condiciones poco alteradas suelen ser densas con árboles de hasta 15 m de alto, frecuentemente entre 8 a 12 m (Rzedowski y Equihua 1987).

En las selvas tropicales y particularmente en la selva seca predominan dos factores que potencialmente pueden afectar la composición espacial y temporal de la diversidad de vertebrados: la estacionalidad climática y la perturbación y fragmentación del hábitat. El primero es determinante en la disponibilidad de recursos y por tanto en las especies presentes: se ha encontrado que la diversidad es mayor cuando (época de lluvias) y donde (vegetación de arroyo adyacente a la selva seca) la disponibilidad de recursos es mayor (Ceballos 1996). El segundo tiene efectos sobre la composición y abundancia de especies, los cuales dependen del grupo taxonómico, de la dimensión y el tipo de perturbación, de la conectividad entre fragmentos y del tiempo transcurrido tras la perturbación (Malcolm 1997, Laurance et al. 1997).

Hay también efectos más sutiles y difíciles de detectar como por ejemplo los que se dan sobre características genéticas de las poblaciones y con ellos en la viabilidad a mediano y largo plazo de las mismas. La interacción de procesos tanto ecológicos como evolutivos determinan los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y el grado en que éstas están genéticamente estructuradas (diferenciadas) a lo largo de su distribución (Matocq et al. 2000). El efecto de la perturbación y fragmentación de la vegetación sobre la genética poblacional de mamíferos en general, y de las selvas secas en particular, ha sido poco estudiado.

La diversidad de especies en las selvas secas se caracteriza por la elevada concentración de fauna y flora endémicas. Las selvas secas mexicanas son consideradas como los ecosistemas con mayor número de especies endémicas en Latinoamérica. Sin embargo, varias especies de las selvas secas mexicanas se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana de especies amenazadas (NOM-059-ECOL-2001) como el perico de frente amarilla (*Amazona oratrix*), la guacamaya verde (*Ara militaris*), el murciélago platanero (*Musonycteris harrisoni*), el tigrillo (*Leopardus wiedii*), la rata arborícola (*Xenomys nelsoni*) o el escorpión (*Heloderma horridum*), entre otros.

Por otra parte, en México la mayoría de las especies endémicas son roedores, lo que es de esperarse dada su muy elevada diversidad y baja movilidad, en comparación con otros órdenes. Las 113 especies de roedores endémicos incluyen a 74 cricétidos, 12 hetéromidos, 13 geómidos, 13 sciúridos y un agutí (Ceballos et al. 2005). Por lo cual, conocer la estructura y diversidad genética de poblaciones de mamíferos dentro de las selvas secas, en particular de sitios fragmentados es esencial para diseñar estrategias de conservación adecuadas y entender procesos de diferenciación y especiación (Kim et al. 1998).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la estructura y variabilidad genética de *Liomys irroratus* en un paisaje con diferentes grados de perturbación de la vegetación en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), Morelos, México.

Objetivos particulares

Determinar la variación y estructura genética poblacional de *Liomys irroratus* en sitios perturbados y no perturbados dentro de la REBIOSH.

Evaluar el flujo genético entre las diferentes poblaciones; asociarlo a características ambientales y determinar si existen barreras potenciales a éste

Evaluar las implicaciones de los resultados para el manejo de la biodiversidad en la REBIOSH

HIPÓTESIS

Se ha argumentado que las características del paisaje estructuran la variación genética a nivel poblacional y de individuos, por ejemplo, las barreras antropogénicas no permiten que individuos poco vágiles se desplacen, lo que reduce el flujo genético y la diversidad genética (Manel et al. 2003, Guillot et al. 2005, Holderegger, 2006). Por lo cual, esperamos encontrar diferencias en la estructura y variabilidad genética de poblaciones de *Liomys irroratus* relacionadas con los diferentes grados de perturbación del paisaje (sitios no perturbados y perturbados), que afectan el grado de estrés ambiental que un organismo enfrenta en un sitio dado (e.g. menor disponibilidad de recursos alimenticios, agua, sombra, mayor exposición potencial a depredadores) y con la conectividad potencial entre sitios. Debido a esto, esperamos que en sitios no perturbados haya una mayor diversidad genética que en sitios perturbados; además habrá flujo genético entre sitios no perturbados. Los sitios perturbados presentarán una mayor estructuración genética así como aislamiento por distancia y escaso o nulo flujo genético.

MATERIAL Y MÉTODO

Área de estudio

La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla se encuentra en el estado de Morelos, en los municipios de Amacuzac, Puente de Ixtla, Jojutla, Tlaquiltenango y Tepalcingo. Los principales poblados dentro de la reserva son: Huautla, Huaxtla, Rancho Viejo, Xantiopan, Axuchitlán, El Limón, Huixastla, Pueblo Viejo, Xochipala, Coaxintlán, El Salto y El Zapote; la RBSH limita al sur con los estados de Puebla y Guerrero y tiene una superficie total de 59,310.65 hectáreas ubicadas entre altitudes de los 700 a los 2,400msnm (Dorado et al. 2005). Dentro de la reserva coexisten 29 comunidades de cinco municipios de Morelos (Amacuzac, Puente de Ixtla, Jojutla, Tlaquiltenango y Tepalcingo). Esta zona se encuentra alterada en varios sitios por la apertura de áreas al cultivo, al pastoreo y la extracción de madera, ya que la mayoría de los cerca de 20,000 habitantes están dedicados a actividades agropecuarias, como la cosecha de maíz, frijol, calabaza, chile y cacahuete y la cría de ganado vacuno, caprino, porcino y equino. (Sánchez y Romero 1995).

La vegetación dominante es de selva baja caducifolia (SBC, Miranda y Hernández 1963) y más del 90% de la zona está cubierta por este tipo de vegetación en diferentes grados de perturbación. Además hay algunas áreas con selva mediana subcaducifolia, encinares y una manchón pequeño de pinos (Dorado et al. 2005). La SBC se caracteriza por una marcada estacionalidad climática, en la que la lluvia se concentra en cinco meses del año y esto ocasiona una fenología contrastante que se distingue porque casi todas sus especies pierden las hojas durante la época seca. Los árboles son en general de tamaño pequeño, de 4 a 15 m de alto (Pérez et al. 1992). Se han registrado en esta región un total de 937 especies de plantas vasculares, incluidas en 449 géneros y 130 familias. Las familias más abundantes en cuanto a número de especies son: Fabaceae, Poaceae, Asteraceae y Burseraceae (Dorado et al. 2005). Se han registrado más de 350 especies de vertebrados: ocho de peces, 11 de anfibios, 52 de reptiles, 220 de aves y en el caso de los mamíferos se han reportado 66 especies (de 18 familias) que representan el 47% de las especies registradas en el estado de Morelos; de éstas, 12 son roedores: dos de las cuales son ardillas (Sciuridae) y 10 ratones (Dorado et al. 2005).

De acuerdo con datos del INEGI de 1981, los tipos de suelo dominantes en el área de la reserva son: feozem háplico, regosol éutrico y en los cuerpos montañosos se encuentran litosoles. Estos tres tipos de suelos presentan severas limitantes para la producción agrícola

del CiByC-UAEM. En este mapa se identificaron sitios que pudieran reunir uno de los criterios generales de perturbación explicados más adelante (e.g. que mostraran en el mapa buena cobertura de SBC o mostraran un mosaico de SBC, SBC perturbada y otros tipos de vegetación) y que fuera posible, logísticamente, trabajarlos (e.g. accesibilidad, disposición de los dueños de los predios para poder trabajar en ellos). Una vez elegidos dichos sitios, se hicieron recorridos de campo de las zonas potenciales de trabajo tratando de identificar el resto de los criterios considerados en la definición de perturbación (e.g. características del sotobosque e intensidad de uso por el ganado), y obteniendo las coordenadas de estos sitios con un GPS. Posteriormente el personal del LISIG determinó, a partir de interpretaciones ortofotográficas escala 1:5000 para áreas de 100 ha tomando como centro las coordenadas geográficas obtenidas en campo, el porcentaje cubierto por SBC no perturbada, SBC perturbada, vegetación secundaria y otros tipos de vegetación, áreas agrícolas, cuerpos de agua y zonas urbanizadas.

Sitios de muestreo

De las áreas anteriormente descritas, seleccionamos dos pares de sitios que tuvieran el mayor contraste posible en esos porcentajes, procurando que cada par se ubicara en una misma microregión geográfica o microcuenca (e.g. en la misma cañada, en el mismo lado de una serranía dominante en el lugar). Con esta selección en pares buscamos homogeneizar el posible efecto de factores no evaluados, como historia geológica, características edafológicas locales, accesibilidad para el mismo poblado, historia de uso del suelo similar, etc. (Figura 2).

Sitios perturbados y sitios no perturbados

Los sitios que se caracterizaron como perturbados (Axuchitlán y Xantiopan perturbado) presentan estructura arbórea homogénea y cobertura reducida, selva en fragmentos alternos con áreas desmontadas, sotobosque escaso con presencia de pastos y presencia constante de ganado) y los sitios considerados como no perturbados (La Virgen y Xantiopan no perturbado) presentan estructura arbórea heterogénea y cobertura cerrada, selva dentro de una matriz continua sin intrusión de áreas desmontadas, sotobosque abundante, sin pastos y presencia nula o mínima de ganado (Figura 2).

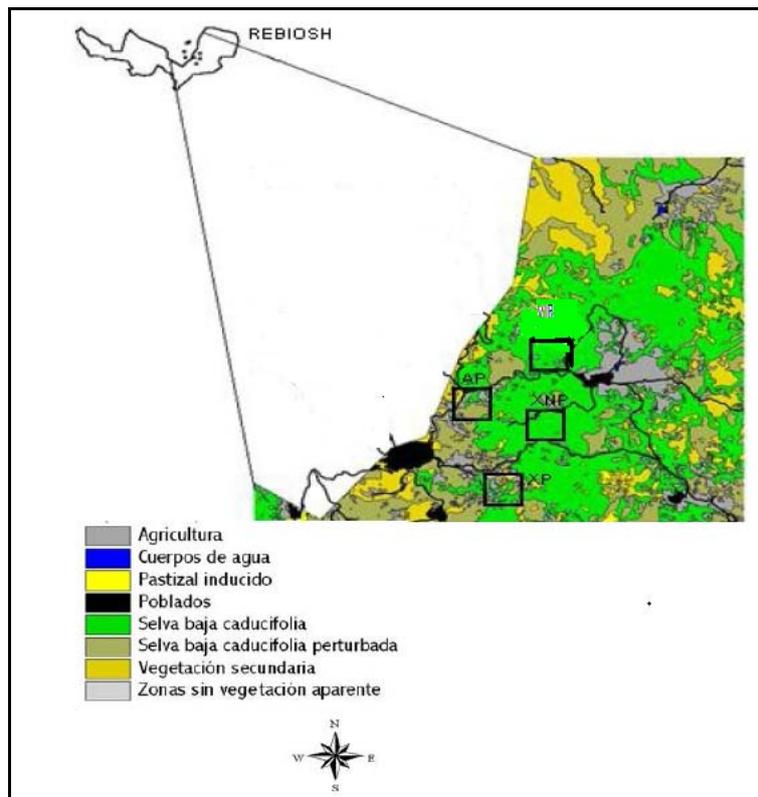


Figura 2. Localización de los sitios de trapeo en la reserva y sus alrededores. Los cuadros en color blanco representan la ubicación geográfica de los sitios de estudio y las líneas negras los caminos disponibles. VIR: La Virgen (No perturbado), AP: Axuchitlan (perturbado); XNP: Xantiopan no perturbado; XP: Xantiopan perturbado.

Especie de estudio

Liomys irroratus pertenece a la familia Heteromyidae la cual es endémica del continente americano, incluye alrededor de 60 especies y seis géneros de ratas canguros y ratas y ratones de abazones (Wilson y Reeder 2005), la mayoría de las cuáles habitan en zonas áridas. En México la familia está representada por 42 especies en cinco géneros: *Dipodomys*, *Chaetodipus*, *Perognathus*, *Liomys* y *Heteromys*; 14 especies son endémicas de nuestro país (Ceballos y Oliva 2005).

El género *Liomys* comprende cinco especies, cuatro de éstas (*L. irroratus*, *L. salvini*, *L. pictus* y *L. spectabilis*) habitan en México (Dowler y Genoways 1978, Schmidly et al. 1993), mientras que *Liomys adpersus* se encuentra en Panamá (Williams et al. 1993). *Liomys irroratus* se distribuye desde el sur de Texas (EUA) hasta el centro de México, donde se le

encuentra al este de la Sierra Madre Occidental desde Chihuahua hasta Michoacán, hacia el centro del país hasta Oaxaca y otra vertiente del Golfo desde Tamaulipas hasta Veracruz (Genoways 1973; Ramírez-Pulido et al. 1982, Ramírez-Pulido y Castro-C 1994, Wilson y Reeder 2005, Espinosa y Chávez-Tapia 2005). Se le encuentra generalmente en selvas secas o matorrales espinosos, donde la precipitación anual es mayor a 500 mm; también se encuentra, sin embargo, en pastizales, bosque de coníferas y encinos, en zonas de cultivo y pastoreo (Sánchez-Cordero y Fleming 1993, Schmidly et al. 1993). Se localiza desde el nivel del mar hasta los 3050 msnm (Espinosa y Chávez-Tapia 2005). Junto con *Perognathus flavus* son las únicas especies de heterómidos presentes en el estado de Morelos, pero *P. flavus* sólo está registrado para la zona norte del estado (Álvarez-Castañeda 1996).



Figura 3. Mapa de la distribución de *Liomys irroratus* (Ceballos y Oliva 2005)

Características generales

L. irroratus es un ratón de tamaño mediano, presenta un par de abazones en las mejillas como los demás heterómidos, su pelaje es hirsuto, formado de pelos duros rodeados de pelos más suaves, de coloración café grisácea en el dorso; tiene una franja lateral muy tenue de color rosa pálido a amarillo ante y el vientre es blanco (Dowler y Genoways 1978, Hall 1981). El pelaje del juvenil es más gris y consiste de pelos más suaves. La cola es bicolor con punta pincelada, las extremidades posteriores tienen cinco cojinetes plantares; la garra del segundo dedo de las patas traseras tiene forma de espolón, diseñada para la huida (Dowler y Genoways 1978).

Biología

Tiene actividad reproductiva durante casi todo el año, aunque el pico reproductivo parece ocurrir de agosto a noviembre (Dowler y Genoways 1978). Álvarez-Castañeda (1996) reporta para Morelos la presencia de hembras preñadas en mayo y junio, así como lactantes de marzo a junio. Sánchez y Romero (1995) reportan la mayor actividad reproductiva de machos de esta especie (en El Limón, dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla) en julio y agosto, mientras García-Estrada et al. (2002) reportan, para El Limón también, que la mayoría de las crías y juveniles los capturaron en noviembre. Aunque en general se reporta que los heterómidos tropicales tienen períodos reproductivos más prolongados que los de los heterómidos de zonas desérticas, Sánchez-Cordero y Fleming (1983) reportan que varias especies de *Liomys* (entre las que no se tomó en cuenta a *L. irroratus*) tienen un periodo reproductivo restringido estacionalmente y sobre todo a la temporada seca y el periodo inicial de las lluvias. En los mismos sitios de estudio de este proyecto, la actividad reproductiva de *L. irroratus* se encuentra restringida por el régimen de lluvias: Cadena (2003) encontró individuos reproductivos principalmente en la época de lluvias (de agosto a noviembre), aunque reporta algunos individuos reproductivos en diciembre, enero, mayo y junio. Su ciclo reproductivo es generalmente monoéstrico y dura entre 21 y 28 días, en cada parto nacen de dos a ocho crías y el promedio es de cuatro (Ceballos y Galindo 1984, Ceballos y Miranda 2000, Dowler y Genoways 1978).

Ecología

Lo mismo que la mayoría de los roedores, *L. irroratus* ocupa un lugar fundamental en la base de diversas redes tróficas como consumidor primario, especialmente de semillas; por sus hábitos granívoros es un importante dispersor y depredador de semillas (Ceballos y Galindo 1984, Ceballos y Miranda 2000, McDonald 2001, Villa y Cervantes 2003). Es depredado por diversas especies de mamíferos, reptiles y aves (Ceballos y Galindo 1984, MacCracken et al. 1985, Sánchez-Cordero y Fleming 1993, Villa y Cervantes 2003).

Tiene una estructura social compleja, es altamente territorial igual que los demás miembros de su familia, y comúnmente mantiene zonas de influencia bien definidas por individuo (Sánchez y Romero 1995, Vázquez 1997, Ceballos y Miranda 2000); asimismo, construye madrigueras comunales clasificadas con diversas formas y funciones (Domínguez 2000). Aparentemente la distribución de algunas especies está restringida por la presencia de otra especie de *Liomys* donde llegan a ser simpátricas (Schmidly et al. 1993). Se ha

argumentado que este ratón puede llegar a convertirse en una plaga para la agricultura debido principalmente a la ausencia de depredadores y a sus hábitos granívoros (González-Romero 1980, Ceballos y Galindo 1984). Sin embargo, la evidencia recopilada por Cadena (2003) en la misma zona de muestreo en la que se realizó el presente estudio, sugiere que es una especie que se ve afectada por la perturbación natural, en ese estudio se encontraron densidades bajas en hábitat previamente señalados como muy utilizados por la especie (e. g. bardas de piedra y cercanías de campos de cultivo) según Davis y Russell (1954), sembradíos y bordes Mellink (1995), García-Estrada et al. (2002), este último trabajo se realizó también en la Sierra de Huautla.

Trabajo de campo y obtención de muestras

El trabajo de campo fue realizado previamente a este estudio, como parte de un proyecto de monitoreo de mamíferos en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. En cada sitio se estableció un cuadrante dividido en siete transectos paralelos de 70 m cada uno y marcando una estación de trampeo cada 10 m. Cada transecto fue separado de los otros por 10 m, lo que forma una cuadrícula con 64 estaciones de trampeo, cada una identificada con un sistema de coordenadas que consiste en una letra (A-H) y un número (0-7). Se colocó una trampa tipo Sherman (para animales vivos) en el suelo en cada una de las estaciones de trampeo y además una en un árbol, a 1.5-2 m del suelo, en las líneas 2, 4 y 6, teniendo un total de 88 trampas por cuadrante (Figura 3). Las trampas fueron cebadas con una mezcla de hojuelas de avena, crema de cacahuate y esencia de vainilla o bien con semillas de girasol, de acuerdo con las recomendaciones de Romero-Almaráz (2000).

El periodo de trampeo fue dividido en tres estaciones (lluvias, secas tempranas y secas tardías) tomando como principal factor la gran diferencia en precipitación que hay a lo largo del año. Todos los trampeos se realizaron evitando los periodos de luna llena. Las trampas en un cuadrante se activaron por la tarde el día inicial de cada muestreo y se operaron durante tres noches consecutivas, revisándolas diariamente por la mañana (entre las 07:00 y las 10:00 h) recebando cuando fuera necesario. Para cada captura, se registró la fecha, número y ubicación de la trampa. De todos los individuos capturados se tomaron medidas morfométricas, así como el peso, también se determinó el sexo, grupo de edad: cría, juvenil o adulto (con base en las características del pelaje y el estado reproductivo), presencia o ausencia de parásitos, estado reproductivo (considerando como machos activos a aquellos que presentaron los testículos escrotados y en el caso de las hembras cuando presentaban vagina inflamada, desarrollo

mamario, lactancia y/o presencia de embriones), y de cada uno se obtuvieron también muestras de tejido, pelo y excretas.

Para la obtención de tejido, los animales capturados se marcaron mediante el método de ectomización de falanges utilizando la técnica descrita por Martoff (1963, Romero-Almaráz 2000). En el diseño de los protocolos de captura, manejo y marcaje se siguieron las recomendaciones de Clyde et al. (1995), procurando también minimizar el estrés de los individuos (de acuerdo al Committee for Acceptable Field Methods in Mammalogy, 1992). Las falanges fueron almacenadas en etanol al 70% hasta su uso.

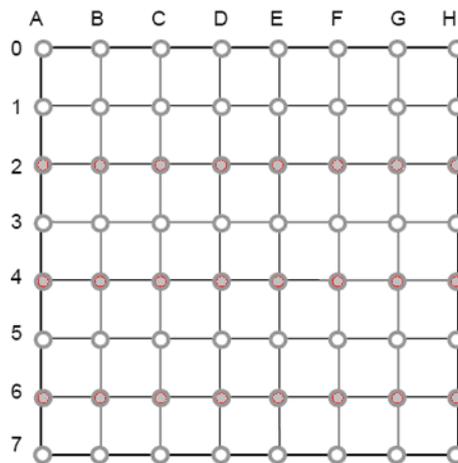


Figura 4. Diagrama del cuadrante empleado en cada sitio para la captura de roedores y distribución de trampas dentro del mismo.

El presente trabajo se restringió sólo a los dos primeros años (2001 y 2002) de colecta de roedores del estudio del que este trabajo es parte, las muestras de tejido corresponden a 20 individuos (10 hembras y 10 machos) por cada uno de los sitios (XP sólo 19 individuos; Anexo 2).

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

Realicé la extracción de ADN de las falanges con el kit comercial PROMEGA, siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo 3). Para estimar la concentración de ADN y su degradación,

visualicé las muestras en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio al 0.5 µg/ml y visualizados con luz UV, empleando una referencia de pesos moleculares (Anexo 4).

Amplificación y secuenciación

Amplifiqué una porción del gen mitocondrial del citocromo *b* (cyt *b*), utilizando los pares de oligos MVZ04 y MVZ45 (Smith y Patton 1993, Cuadro 1), en un Termociclador PTC-100 (M.J. Research, Waltham, MA); las condiciones utilizadas para la reacción se presentan en el Anexo 5. Observé los productos amplificados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados bajo luz UV. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) en un secuenciador automático 3730xl.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cyt *b* (Smith y Patton, 1993)

Cadena Forward (Light)	Secuencia (5'-3')
MVZ45	ACNACHATAGCNACAGCATTTCGTAGG
Cadena Reverse (Heavy)	
MVZ04	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC

Análisis genéticos

Una vez obtenidas las secuencias, realicé un BLAST por medio del GenBank para asegurarme que los fragmentos secuenciados pertenecieran a la región del cit *b* de *Liomys irroratus*. Alineé manualmente las secuencias de DNA con el programa Bioedit v.7.0. (Hall 2004) y comprobé su correcta alineación comparándolas con secuencias de la misma especie tomadas del GenBank; además realicé un alineamiento múltiple en Bioedit v.7.0 implementando CLUSTALW para descartar errores de alineamiento a ojo.

Análisis estadísticos

Pruebas de neutralidad

Con el propósito de descartar procesos de selección natural que pudieran estar afectando los patrones de polimorfismo dentro de las poblaciones, evalué las secuencias para probar neutralidad usando los estadísticos D y F de Fu y Li (1993); el primero se basa en las diferencias entre el número total de singletons (η_s , mutaciones que aparecen sólo una vez entre las secuencias) y el número total de mutaciones (η), mientras que el segundo se basa en las diferencias entre el número total de singletons y la media del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (k). Utilicé otro índice para evaluar neutralidad, la D de Tajima (Tajima 1989), estadístico que se basa en las diferencias entre los sitios segregantes (S) y la media del número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias π . Estos análisis los hice con el programa DNAsp v. 5.00.07 (Rozas et al. 2009).

Diversidad genética

Para evaluar los niveles de diversidad genética en las poblaciones de los cuatro sitios estudiados, estimé los índices de diversidad genética medidos como diversidad haplotípica (h), que es considerada como una medida de heterocigosidad media (proporción de los heterocigos por locus en una población que se reproduce al azar; Nei 1987) y la diversidad nucleotídica (π), definida como la media del número de cualquier diferencia nucleotídica o sustitución por sitio para un grupo de secuencias (alelos) de ADN muestreadas, y su varianza está dada por (Nei 1987, Nei y Miller 1990):

$$\pi = \sum_{i < j} \pi_{ij} / n_c$$
$$V(\pi) = \frac{4}{n(n-1)} \left[(6-4n) \left\langle \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij} \right\rangle^2 + (n-2) \sum x_i x_j x_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}^2 \right]$$

Donde n_c es el total de comparaciones y π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre dos secuencias i y j . Comúnmente se estima la diversidad nucleotídica con la corrección de Jukes y Cantor (1969), donde las diferencias observadas son convertidas a la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio (δ_{xy}) entre dos secuencias (Lynch y Crease 1990).

Además, calculé el número de sitios polimórficos o segregantes (S), el número de sitios parsimoniosamente informativos, el número de mutaciones η , y el número promedio de diferencias nucleotídicas (k) (Tajima 1983):

$$k = \sum \sum_{ij} k_{ij} / \binom{n}{2}$$

La diversidad haplotípica h y su varianza (Nei 1987):

$$h = n \left(1 - \sum \frac{x_i^2}{n} \right) / (n-1); V_{(h)} = \left(\frac{n}{n-1} \right)^2 \sum x_i^2$$

Para todos estos análisis utilicé el programa DNAsp.

Diferenciación entre poblaciones y estructura genética

Con el propósito de evaluar qué tan divergentes son las poblaciones entre sí y los valores de flujo génico para el total de la población, calculé la divergencia nucleotídica como la media del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre diferentes poblaciones (D_{xy}), así como el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre poblaciones (D_a), ambas con la corrección de Jukes y Cantor (1969, Nei 1987).

Como medidas de diferenciación genética entre subpoblaciones, calculé la F_{ST} (Wright 1951), la cual estima la frecuencia de los alelos en cada locus en diferentes subpoblaciones, δ_{st} y γ_{st} de Nei (1982) para datos provenientes de secuencias, de manera que se pudieran además obtener los valores de flujo génico para cada índice. Con base en estos estimadores pude calcular el número de migrantes Nm , que determina el número efectivo de individuos migrantes por generación (Hudson et al. 1992, Templeton et al. 1995). Para estos análisis utilicé el programa DNAsp.

Como otra forma de evaluar la diferenciación estimé las distancias genéticas entre los cuatro sitios y también considerando el grupo de los sitios perturbados y no perturbados, con el programa MEGA v.4.0 (Tamura et al. 2007). Utilicé el modelo de distancia Kimura dos parámetros (Kimura 1980), tomando en cuenta las transversiones y las transiciones, con 10,000 réplicas de Bootstrap calculadas según Nei y Kumar (2000).

Para evaluar si el patrón de diferenciación genética sigue un modelo de aislamiento por distancia (Wright 1943, Slatkin 1993) realicé una prueba de Mantel (Mantel 1967) en Isolation by distance web service (IBDWS, Jensen et al. 2005), que permite evaluar la significancia de la regresión entre distancias genéticas pareadas expresadas como $F_{ST}/1-F_{ST}$ contra distancia geográfica transformada en log normal (Rousset 1997). La significancia estadística se estimó después de 10,000 pruebas de permutación.

Estructura poblacional

Como una medida de subdivisión poblacional realicé un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa ARLEQUIN v.3.0 (Schneider et al. 2000), basada en el estadístico Φ que considera la distancia molecular entre todos los pares de haplotipos (número de diferencias pareadas) y refleja la correlación de diversidad haplotípica en diferentes niveles de jerarquía, sin tomar en cuenta la información geográfica (Excoffier et al. 1992). Esto permite establecer cómo se encuentran estructuradas las poblaciones y estimar el porcentaje de variación debido a cada nivel poblacional; los niveles de significancia fueron: $\alpha = 0.05$ y 10,000 permutaciones al azar. Consideré dos escenarios: a) un solo grupo y b) dos grupos: uno correspondiente a los sitios perturbados (poblaciones Ax y XP) y otro correspondiente a los sitios no perturbados (poblaciones XNP y Vir). Los índices están definidos como sigue:

$$F_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}; F_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} \text{ y } F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

donde;

F_{CT} : estructura genética entre grupos

F_{SC} : estructura genética entre subpoblaciones dentro de los grupos

F_{ST} : estructura genética dentro de las subpoblaciones

Relación entre haplotipos

Para visualizar la unión entre los haplotipos construí una red de unión mínima entre haplotipos con el programa NETWORK v. 4.2.0.1 (Fluxus Technology Ltd. disponible en <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), con base en la metodología 'Median-Joining' (Bandelt et al, 1999). Los parámetros utilizados fueron una epsilon de cero para evitar obtener redes complejas y difíciles de interpretar; la relación transiciones/transversiones 1:2 ya que la tasa de

transiciones es mayor que la de tranversiones; el criterio “connection cost” descrito por Röhl et al. (1999), la opción “frecuencia>1” como inactiva para que se consideren tanto los haplotipos únicos como los compartidos; además elegí la opción “star-contraction”, la cual se usa para obtener una simplificación de la red o para identificar eventos de expansión poblacional; y cálculos posteriores (“postcalculations”) para eliminar vectores o uniones innecesarias. El resultado es una red media de unión entre los haplotipos muestreados, la cual consiste de nodos y uniones que conectan los nodos. Los nodos son las secuencias del conjunto de datos, o vectores medios. Las uniones son las diferencias de carácter. Un vector medio es una secuencia hipotética (comúnmente ancestral) la cual se requiere para conectar las secuencias existentes dentro de la red por medio de la máxima parsimonia. Sin el vector medio podría no haber la conexión más corta entre las secuencias del conjunto de datos.

RESULTADOS

Una vez realizada la edición y el alineamiento de las secuencias del cit *b* obtuve un total de 550 pares de bases. Las pruebas de neutralidad mostraron desviaciones no significativas (estadístico de Tajima $D = -0.317$, $p < 0.10$; estadísticos de Li $D = 1.458$, $0.10 < p < 0.05$ y $F = 0.847$, $p < 0.10$), lo que indica que los loci no están sujetos a procesos selectivos.

Diversidad genética

El número de sitios variables (polimórficos) y el número de haplotipos mostraron valores altos ($S = 544$, $544/550 = 99\%$; $H = 59$), con 21 haplotipos compartidos entre las cuatro poblaciones. La diversidad haplotípica y nucleotídica también fueron altas ($h_{total} = 0.987 \pm 0.006$, $h_{media} = 0.986$ y $\pi_{total} = 0.505 \pm 0.020$, $\pi_{media} = 0.510$), con valores similares en todas las poblaciones (Tabla1).

Tabla 1. Diversidad genética total y por localidad. N es el tamaño de muestra; S es el número de sitios segregantes (polimórficos); h es la diversidad haplotípica con su desviación estándar (\pm d.s.) y π es la diversidad nucleotídica (\pm d.s.)

Localidad	N	# de haplotipos	Haplotipos	S	h (\pm d.s.)	π (\pm d.s.)
AX	20	17	1,3,4,5,18,25, 28,33, 36, 38, 39,40,46,59	538	0.984 \pm 0.020	0.510 \pm 0.040
XNP	20	19	5,9,14,15,17,19,2 1,21,22,23,30,35, 43, 47, 53,56,57	538	0.995 \pm 0.018	0.492 \pm 0.046
VIR	20	18	2,3,6,7,8,10,11,12 ,13,24,45,51,52,5 8	544	0.989 \pm 0.019	0.501 \pm 0.045
XP	19	16	1,2,5,26,27,29,31, 32,34,41,44,48,50 ,54,55	529	0.977 \pm 0.027	0.534 \pm 0.034
total	79	59		544	0.987\pm0.006	0.505\pm0.020

Diferenciación entre poblaciones y estructura genética

Diferenciación genética

Bajo la hipótesis nula de que las poblaciones no son diferentes genéticamente, se obtuvieron varios estadísticos. Los valores promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio D_{xy} fueron altos, con un intervalo de 49.6 a 51.5%; el número de sustituciones netas por sitio D_a no fueron significativos (Tabla 2), Lo que significa que la divergencia está dada entre poblaciones, pero también, de acuerdo a la definición del estadístico D_{xy} , hay un alto número de sustituciones nucleotídicas en los genotipos analizados, por lo que la divergencia viene dada desde el nivel de individuo.

Tabla 2. Valores de divergencia nucleotídica, medidos como los valores promedio de las sustituciones nucleotídicas por sitio entre las diferentes poblaciones (D_{xy} , arriba de la diagonal) y el número de sustituciones netas por sitios entre las diferentes poblaciones (D_a , debajo de la diagonal).

	AP	XP	XNP	VIR
AP		0.510	0.496	0.496
XP	-0.007		0.512	0.515
XNP	-0.001	-0.0003		0.500
VIR	-0.005	-0.002	-0.005	

Por su parte, los estadísticos de heterogeneidad a partir de los que se puede establecer el flujo génico entre poblaciones, los métodos de δ_{st} y γ_{st} (Nei, 1982) a partir de las secuencias, y la F_{st} de Hudson et al. (1992) para un modelo de isla de estructura poblacional, mostraron valores que pequeños ($\delta_{st} = 0.018$, $\gamma_{st} = 0.036$ y $F_{st} = -0.03$), señal de que las poblaciones no están diferenciadas. El número de migrantes Nm se estimó sólo a partir de δ_{st} y γ_{st} , y se obtuvo un valor de 13 migrantes por generación ($Nm=13.4$)

Los valores de distancia genética pareada entre las cuatro poblaciones fueron altos (0.056 a 0.178; Tabla 3), similares a aquellos de divergencia. La distancia genética dentro de cada subpoblación también fue alta (0.811 a 0.882, Tabla 3).

Tabla 3. Matriz de distancias genéticas pareadas (arriba de la diagonal) y distancias geográficas en km (debajo de la diagonal)

	Distancias entre poblaciones				Distancias dentro de poblaciones	
	AP	XP	XNP	VIR	AP	
AP		0.056	0.178	0.072		0.868
XP	2.95		0.152	0.058		0.882
XNP	2.20	2.37		0.122		0.865
VIR	2.90	4.48	2.77			0.811

Al evaluar aislamiento por distancia con la prueba de Mantel obtuve una correlación entre distancia genética y geográfica positiva pero no significativa ($r = 0.298$, $p = 0.483$), lo que indica que las poblaciones no están geográficamente aisladas.

Estructura poblacional

La prueba exacta de diferenciación genética mostró resultados no significativos, tanto al considerar la población como un grupo o al separarla en dos grupos (perturbado y no perturbado). Ello corrobora que no existe diferenciación genética entre las subpoblaciones; el total de la variación está dentro cada subpoblación.

Así, el análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 100% de la variación está distribuida dentro de las subpoblaciones. Al considerarse dos grupos (P y NP), la estructuración genética entre los dos grupos (F_{CT}) no fue significativa, tampoco entre las poblaciones dentro de

los grupos (F_{SC}); por el contrario, la estructuración genética fue significativa dentro de las subpoblaciones (F_{ST} ; Tabla 4).

Al considerar las cuatro poblaciones como una sola, el AMOVA mostró resultados no significativos para la estructuración genética entre las subpoblaciones (F_{SC}), ni para la estructuración genética dentro de cada subpoblación (F_{ST} ; Tabla 5).

Tabla 4. Porcentaje de la variación y significancia de los valores de los índices de fijación.

Fuente de variación	% de variación	Índices de fijación	Significancia
Entre grupos	0	$F_{CT} = -0.003$	$p = 0.43$
Entre subpoblaciones dentro de grupos	0	$F_{SC} = -0.003$	$p = 0.12$
Dentro de subpoblaciones	100	$F_{ST} = -0.006$	$p = 0.009$

Tabla 5. Porcentaje de la variación y significancia de los valores de los índices de fijación.

Fuente de variación	% de variación	Índices de fijación	Significancia
Entre subpoblaciones dentro de grupos	0	$F_{SC} = 0.01$	$p = 0.61$
Dentro de subpoblaciones	100	$F_{ST} = -0.005$	$p = 0.99$

Descripción de la red media de haplotipos

La red media de haplotipos (Figura 5) no muestra un patrón claro de separación ni en grupos (P y NP) ni en poblaciones (AP, XP, XNP o VIR). Dentro de los haplotipos comunes (haplotipos compartidos) se agrupan haplotipos pertenecientes a todos los sitios de muestreo. Por ejemplo uno de los haplotipos más comunes está marcado en la red como P11, este haplotipo representa a los haplotipos P12, N16, N17, P33, P34 y P11; el otro haplotipo más común fue P36, el cual representa a los haplotipos P37, P38, P14, P15, P36 y N18. Lo mismo sucede con los otros haplotipos no únicos (Anexo 2). Además, se observa que se crearon un gran número de vectores medios (89), lo que podría estar indicando una falta de muestreo.

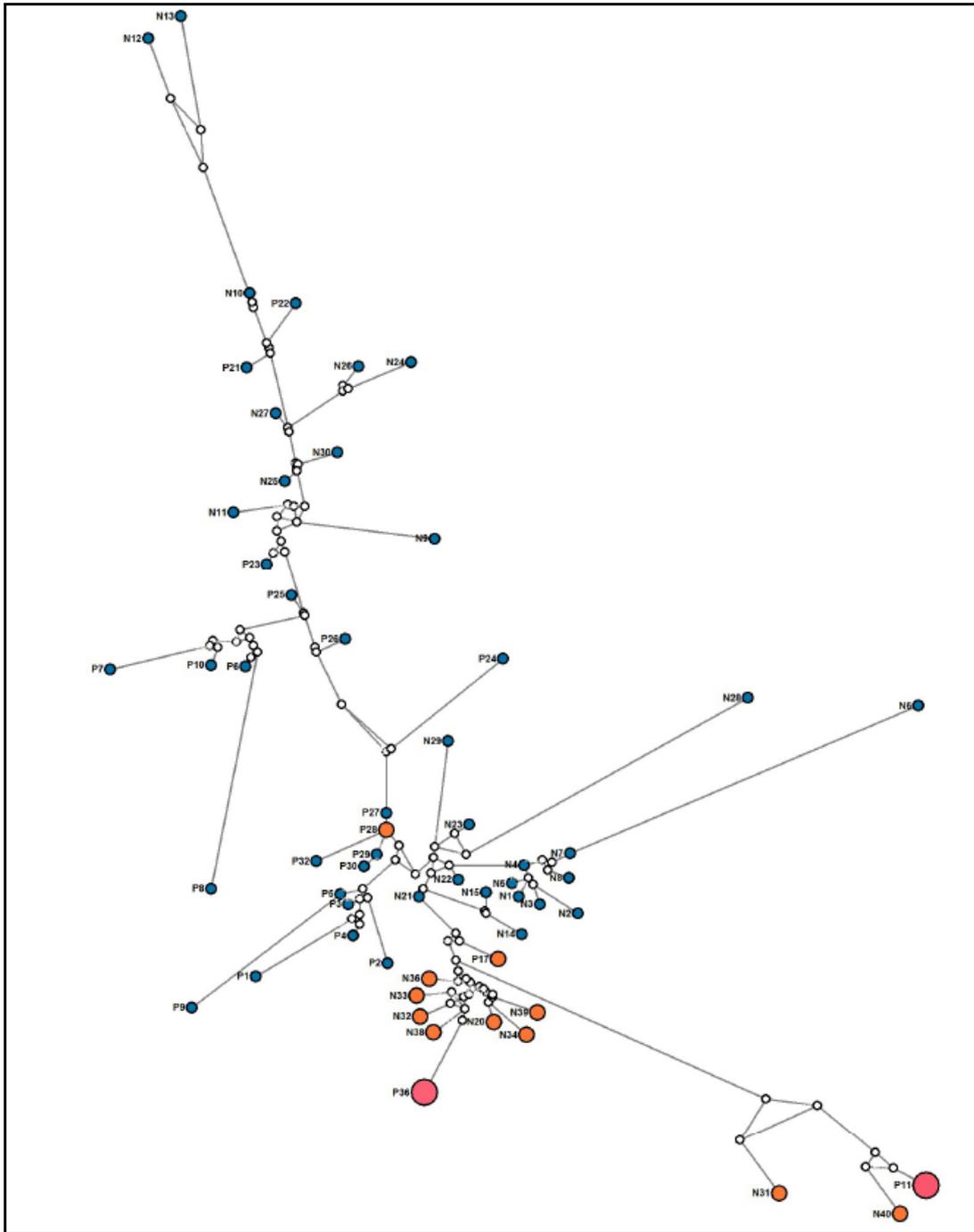


Figura 5. Red media de haplotipos: muestra el número de haplotipos y sus conexiones. El tamaño y color del círculo representan la frecuencia con que se presentó cada haplotipo; color azul representa los haplotipos únicos; color anaranjado representa una frecuencia igual a 2; color rosa una frecuencia igual a seis; círculos sin color son los vectores medios. El tamaño de las ramas representa el número de mutaciones. P: sitios perturbados (AP y/o XP) y N: sitios no perturbados (XNP y/o VIR).

DISCUSIÓN

Diversidad genética

Los resultados muestran que las poblaciones estudiadas de *L. irroratus* en la REBIOSH poseen valores significativamente altos de variabilidad genética nucleotídica ($\pi = 0.505$), lo cual concuerda con el estudio de Nabholz et al. (2008), quienes encontraron que la diversidad del ADN mitocondrial (citocromo *b*) es altamente variable entre los órdenes y las familias de mamíferos, y donde el orden Rodentia es el más polimórfico ($\pi_{media} = 0.033$). Los autores explican que el polimorfismo mitocondrial en mamíferos no está dado por características de historia de vida, sino que hay una relación entre la taxonomía y la diversidad genética, la cual podría deberse a variaciones en las tasas de mutación en los diferentes linajes de mamíferos, como ha sido reportado por Gissi et al. (2000) y Spradling et al. (2001).

Asimismo, *L. irroratus* es una especie que presenta altos valores de diversidad haplotípica ($h=0.987$). Se han observado valores similares en otros mamíferos utilizando citocromo *b*, aunque con intervalos grandes de variación intraespecífica: la nutria gigante (*Pteronura brasiliensis*, $h= 0.87$, Garcia et al. 2007), en varias poblaciones del armiño (*Mustela erminea*, $h=0.58-0.96$, Martínkova et al. 2007), en el mono aullador de manos rojas (*Alouatta balzebut*, $h= 0.96$, Nascimento et al. 2008), en la marsopa de Dall (*Phocoenoides dalli*, $h= 0.95$, Escorza-Teviño et al. 2007), varias poblaciones del ratón leonado (*Apodemus flavicollis*, $h= 0.95-0.99$, Michaux et al. 2005) y del ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*, $h= 0.97-0.98$, Michaux et al. 2005), en la rata arrocera (*Oryzomys couesi*, $h=0.94$, Vega 2006), en el ratón o rata de monte (*Otodylomys phyllotis*, $h= 0.95$, Gutiérrez-García 2008), e incluso en otros vertebrados como el pez aguja azul (*Makaira nigricans*, $h=0.97$, Buonaccorsi et al. 2001). Cabe señalar que estos valores de diversidad genética para algunas de estas especies (i.e. *Phocoenoides dalli*) son más altos de lo que se esperaba, considerando que presentan una marcada estructuración genética que normalmente está asociada con una baja diversidad genética. Debido a esto, la alta diversidad de haplotipos (59) observada podría explicarse como característica del orden, pero también podría ser una consecuencia del tamaño muestral, el cual si fuera mayor podría homogeneizar este resultado.

Avise (2000) señala que valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica son esperados para poblaciones numerosas y estables. En el caso de *L. irroratus*, las poblaciones estudiadas no necesariamente representan poblaciones grandes ni estables, sin embargo, hay que tomar en cuenta que en la REBIOSH *L. irroratus* es la segunda especie de ratón más

abundante. Ello podría ser una explicación para la alta diversidad genética encontrada, sobre todo si consideramos que estas poblaciones no presentaron estructuración y las características del paisaje, es decir la fragmentación, no han tenido un efecto de aislamiento al menos aquel detectado a través del ADN mitocondrial.

Diferenciación genética

Los resultados también muestran que la divergencia está dada dentro de las poblaciones, lo cual concuerda con el gran número de haplotipos encontrados. Es más, ninguno de los estadísticos obtenidos muestra una estructura poblacional o diferenciación significativa, lo que indica que las poblaciones como fueron seleccionadas (sitios perturbados y sitios no perturbados) no son genéticamente diferentes. Esto muestran también los análisis de distancia genética, cuyo valor fue prácticamente nulo entre poblaciones.

El valor observado de trece migrantes por generación confirma también la nula estructuración de las poblaciones, lo cual va de la mano con el hecho de que las poblaciones compartan tan alto número de haplotipos. El alto flujo genético puede estar asociado con la configuración del paisaje dentro de la REBIOSH, donde los cuatro “parches” de selva estudiados no están geográficamente aislados sino que están inmersos en una matriz de selva con diferentes grados de calidad (David Valenzuela, comunicación personal). Así, sin importar las características fisiogeográficas, es muy probable que efectivamente exista un intercambio de genes entre sitios. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con precaución y necesitan ser investigados a mayor profundidad con el uso de metodologías más adecuadas para la estimación de la migración, como podría ser con el programa Migrate-n (Beerli y Felsenstein 1999 y 2001, Beerli 2006) o Lamarc v 2.0 (Kunher 2006); en este estudio no se pudieron emplear ya que algunos de los requisitos que se deben cumplir es que sí exista estructuración genética (Migrate-n) y un número mayor de muestra (Lamarc v. 2.0), características que no cumplían nuestros datos.

No existen estudios con roedores en condiciones similares a los que presenta *L. irroratus* en la reserva, es decir en fragmentos con diferente grado de perturbación, que permitieran comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, sí existen ejemplos con otras especies del género donde se ha documentado que la diversidad genética está íntimamente relacionada con factores fisiológicos y ambientales, donde la variabilidad genética (medida con isoenzimas) determina la mejor adecuación de los individuos, sobre todo en ambientes estacionales de selva baja (*Liomys pictus*, Vázquez-Domínguez et al. 1998, 1999, 2002). Así, sería muy interesante estudiar genéticamente individuos de otras especies con marcadores

mitocondriales como los usados en este estudio, para determinar los resultados obtenidos se pueden explicar como una característica interespecífica.

Estructura genética

Como ya se mencionó, las poblaciones de *L. irroratus* estudiadas no presentaron una estructuración genética, lo cual se refleja en los diferentes índices analizados y con la red media de haplotipos. De acuerdo con estos resultados, los cuatro fragmentos de selva representan una única población panmíctica, aún cuando estos fragmentos sean diferentes por el grado de perturbación que presentan y sean geográficamente distintos.

Como un análisis adicional se utilizó el programa Geneland (Guillot et al. 2005), que permite determinar, entre otros parámetros, el número de poblaciones posibles junto con un mapa que permite visualizar el número más probable de poblaciones genéticas. No se muestran los resultados ya que se obtuvo una sola población.

Cabe señalar que aunque el marcador molecular utilizado no provee un poder de resolución a una escala temporal fina, es decir de eventos muy recientes más acorde a una escala ecológica, éste ha probado ser un marcador efectivo para detectar estructura poblacional y patrones de variación geográfica intraespecífica. Ello se ha demostrado en varios estudios que evidencian estructura genética en poblaciones silvestres como por ejemplo el caracol común de jardín (*Helix aspersa*) con una $F_{ST} = 0.088$ (Arnaud et al. 2003), el topo eslizón *Eumecis egregius*, $\Phi_{ST} = 0.631$, la largartija de matorrales de Florida (*Sceloporus woodi*), $\Phi_{ST} = 0.876$ y el eslizón de arena de Florida (*Neoseps reynoldsi*), $\Phi_{ST} = 0.667$ (Branch et al. 2003); y el tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*, $F_{ST} = 0.530$, Sharma et al. 2007).

Estructura poblacional

Dada la nula estructuración, la alta variabilidad genética observada para poblaciones de *L. irroratus*, y las características del paisaje dentro de la REBIOSH (fragmentos no aislados), es factible plantear dos escenarios de estructuración poblacional: 1) los resultados reflejan una sola población ancestral o 2) un sistema o modelo Metapoblacional.

Podemos considerar el primer caso ya que con el ADN mitocondrial se pueden reconstruir patrones históricos de la demografía de las poblaciones (Hurst et al. 2009), escenarios pasados, por lo que en el presente estudio se denotaría la historia de la población "original" de *L. irroratus* dentro de la REBIOSH, la cual tenía un tamaño poblacional grande y amplia distribución, era genéticamente diversa, con varios haplotipos comunes reflejados en los

21 haplotipos compartidos detectados (Anexo 6). Por lo tanto, al dividirse recientemente dicha población como resultado de la fragmentación del hábitat, en cada parche permanecieron un gran número de haplotipos que ahora se ven como haplotipos “únicos”. En el segundo caso, un modelo metapoblacional es concebido como un conjunto de poblaciones distribuidas en diferentes fragmentos de hábitat, cuyas subunidades (subpoblaciones) están interconectadas por diferentes niveles de dispersión de los individuos que las conforman (Hanski 1999). Para especies restringidas a la vegetación original, al dividirse el hábitat en parches resulta en la formación de un área o matriz que no es adecuada o es inhabitable y que actúa como barrera o sumidero (Opdam 1991). Este escenario se sustenta con el hecho de que no se detectó aislamiento por distancia, aún cuando los parches están alejados geográficamente alrededor de 3 km, pero que se sabe que están conectados gracias a la matriz que los rodea.

CONCLUSIONES

Los análisis de la relación entre la perturbación de la selva seca en la REBIOSH y la estructura genética poblacional de *L. irroratus* indican que:

- 1) La alta diversidad genética observada para *L. irroratus* en la REBIOSH puede explicarse primeramente como consecuencia de una alta tasa de mutación de este gen mitocondrial, similar a la de otras especies de mamíferos. Asimismo, se encontró que las características del paisaje (fragmentación) no tienen efecto detectable sobre las poblaciones estudiadas, como lo reflejan los resultados de no estructuración ni diferenciación genética.
- 2) Debido a que el ADN mitocondrial es en general un marcador adecuado para evaluar procesos históricos más que recientes o de escalas más ecológicas, los resultados obtenidos probablemente estén reflejando patrones históricos en estas poblaciones. Siendo así, los resultados obtenidos muestran un escenario donde la población era una unidad continua, panmíctica, de tamaño poblacional grande, de amplia distribución y genéticamente muy diversa. Estas características deberían existir previo a la fragmentación actual.
- 3) Un modelo metapoblacional también explicaría los resultados obtenidos, debido principalmente al gran número de haplotipos compartidos entre los cuatro sitios de estudio y a que los fragmentos no se encuentran aislados.

- 4) Es evidente que el tiempo desde que ocurrió la fragmentación (hace aproximadamente 50 años) no ha sido suficiente para disminuir la diversidad genética a nivel mitocondrial y que se refleje a su vez en aislamiento y estructuración. Sin embargo, ello no implica de ninguna manera que no existan alteraciones genéticas y demográficas en las poblaciones, asociadas a la fragmentación y perturbación del hábitat.
- 5) Por lo anterior, y para poder evaluar eventos recientes, sería necesario utilizar un marcador molecular con un poder de resolución a menor escala, como los microsatélites. Ello además complementaría la información obtenida en este estudio, ya que se podría tener la historia pasada y actual de las poblaciones aquí estudiadas.
- 6) Asimismo, y con el fin de identificar las características que podrían tener un efecto detrimento sobre la diversidad genética, y así esclarecer el escenario actual de *L. irroratus*, es necesario examinar su historia demográfica a detalle y con un muestreo más amplio.
- 7) El efecto de la actual fragmentación del hábitat sobre los patrones de flujo genético no pudieron determinarse en este estudio, sin embargo lo que sí pudo determinarse es que estas poblaciones tiene altos niveles de diversidad genética (mitocondrial), información que es sin duda necesario considerar, para establecer recomendaciones y acciones de conservación. Ello, porque efectivamente debe considerarse la conservación de *L. irroratus*, ya que se conoce que es una especie especialista y que su abundancia es menor en los sitios perturbados de la REBIOSH en comparación con los no perturbados. La alteración del hábitat por actividades antropogénicas es una amenaza permanente por lo que es deseable iniciar planes de conservación para ésta y, por supuesto, otras especies de la selva baja.

BIBLIOGRAFÍA

- Animal Care and Use committee.** 1998. Guidelines for the capture, handling and care of mammals. As approved by the American Society of Mammalogists. (<http://www.mammalsociety.org/pubsociety/index.html>)
- Álvarez-Castañeda, S. T.** 1996. Los Mamíferos del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. 211pp.
- Allendorf F.W. y G. Luikart.** 2007. Conserving global biodiversity? Conservation and the Genetics of Populations. *Conservation Genetics* 9(2): 437-438.
- Álvarez-Castañeda, S. T.** 1996. Los Mamíferos del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México. 211pp.
- Animal Behavior Society.** 2000. Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. *Animal Behavior*. 59:253-257.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Niegel, C.A. Reeb y N. C. Saunders.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C.** 1994. Molecular Markers, Natural History and evolution. Chapman y Hall. USA.
- Avise, J.C.** 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press.USA.
- Avise, J.C.** 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Bandelt, H.J., P. Forster y A. Röhl.** 1999. Median-Joining Networks for inferring intraspecific Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37-48.
- Beerli, P. y J.Felsenstein.** 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152(2): 763-773.
- Beerli, P. y J. Felsenstein.** (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98(8):4563-4568.
- Best. T. L.** 1993. Patterns of morphologic and morphometric variation in heteromyid rodents. (Capítulo 3:197-235). En: Genoways, H. H. & Brown, J. H. (eds) Biology of the Heteromyidae. American Society of Mammalogists. Special publication #10. pp. 719.
- Begon, M., J.L.Harper y C. R. Townsend.** 1999. Ecology; individuals, populations and communities. 3d. ed. Sinauer, Sunderland, Mass. 1068pp.
- Bijlsma, R., J. Bungaard y A. Buerema.** 2000. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations? Predictions from Drosophila. *Journal of Evolutionary Biology* 13:502-514.
- Branch, L.C., A.M. Clarck, P.E. Moler y B.W. Bowen.** 2003. Fragmented landscapes, habitat specificity, and conservation genetics of three lizards in Florida scrub. *Conservation genetics* 4: 199-212.
- Brooks, C.P.** 2003. A scalar analysis of landscape connectivity. *Oikos* 102: 433-439.
- Broquet, T., N. Ménard y E. Petit.** 2007. Non invasive populations genetics : a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8: 249-260.
- Brown, J.H., T.G. Whitham, S. K. Morgan y C. A. Gehring.** 2001. Complex Species Interactions and the Dynamics of Ecological Systems: Long-Term Experiments. *Science* 293(5530): 643-650.

- Buonaccorsi, V.P., J.R. McDowell y J.E. Graves.** 2001. reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology* 10: 1179-1196.
- Cadena, M.** 2003. Efectos de la perturbación y estacionalidad en la comunidad de roedores en una selva baja caducifolia en Morelos, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela de Ciencias, Universidad de Las Américas-Puebla. Puebla, México.
- Ceballos, G. y Galindo, C.** 1984. Mamíferos silvestres de la cuenca de México (pp. 79, 180). Limusa. México. 299pp.
- Ceballos, G.** 1996. Vertebrate diversity, ecology, and conservation in neotropical dry forests. Pp. 195-220. *in* Seasonally dry tropical forests (S.H. Bullock, H. A. Mooney and E. Medina, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ceballos, G. y Miranda A.** 2000. Guía de campo de los mamíferos de la costa de Jalisco, México. Fundación Ecológica de Cuixmala. UNAM, México. 502pp.
- Ceballos, G. y G. Oliva.** 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 985 Pp.
- Cervantes, F. A., Lorenzo, C. & Ward, O. G.** 1999. Chromosomal relationships among spiny pocket mice, *Liomys* (Heteromyidae), from Mexico. *Journal of Mammalogy* 80(3):823-832.
- Clyde, J., William J., McShea., M. J. Conroy y T. H. Kunz.** 1995. Chapter 8: Capturing Mammals. *In*: Wilson E. D. et al. 1995. Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals.
- Croizer, R.H.** 1997. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny, and conservation worth. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 243-268.
- Culley, T.M., S.J. Sbita y A. Wick.** 2007. Population Genetic Effects of Urban habitat Fragmentation in the Perennial Herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR Markers. *Annals of Botany* 100. 91-100.
- Dallas, J.F., B. Dod, P. Boursot, E.M. Prager y F. Bonhomme.** 1995. Population subdivision and gene flow in Danish house mice. *Mol. Ecol.* 4: 311-320.
- Davis, W. B. y R. J. Russel.** 1954. Mammals of the Mexican state of Morelos. *Journal of Mammalogy* 35: 63-80.
- Dessauer, H. C., T. C. Glenn, and L. D. Densmore.** 2002. Studies on the molecular evolution of the Crocodylia: footprints in the sands of time. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)* 294:302-311
- Dorado, O. y R. de la Maza** (coordinadores). 1998. Documento técnico justificativo para la creación de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla-Cerro Frío. Instituto Nacional de Ecología y Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla, UAEM. México. 70pp + anexos.
- Dorado, O., B. Maldonado, D.M. Arias, V. Sorani, R. Ramírez, E. Leyva y D. Valenzuela.** 2005. Plan de manejo y conservación de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la SEMARNAT. México, D.F. ISBN 968-817-744-X.
- Dorado, O., Valenzuela, D. y Ramírez, R. (En prensa).** Ficha técnica 29 Sierra de Huautla. *En*: Ceballos, G., Maass, M., Bezaury, J. & Espinoza, E. (eds). Diversidad, amenazas y regiones prioritarias para la conservación de las selvas secas del pacífico de México. CONABIO / CONANP / UNAM / WWF.
- Dowler, R. C. y Genoways, H. H.,** 1978. *Liomys irroratus* Mammalian Species 82:1-6. García, E. (1981). Modificaciones al sistema de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana. Editorial Larrios, México. 150pp.

- Epps, C.W., P.J. Palsboll, J.D. Wehausen, G.K. Roderick, R.R.I.I. Ramey y D.R. McCullough.** 2005. Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecology Letters*, **8**, 1029–1038.
- Espinosa, L.A. y C. Chávez-Tapia.** 2005. Ratón espinoso. Pp 628. En Ceballos, G. y G. Oliva, (eds). Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 985 Pp.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro.** 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Escorza-Treviño, S. y E. Dizon.** 2000. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of Dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Molecular Ecology* 9: 1049-1060.
- Fazey, I., Fischer, J. y Lindenmayer, D.B.** 2005. What do conservation biologists publish? *Biological Conservation* 124: 63-73
- Fisher R.A. y E.B. Ford.** 1947. The spread of a gene in natural conditions in a colony of moth *Panaxia dominula* L. *Heredity*, **1**, 143–174.
- Fisher, J. y D.B. Lindenmayer.** 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a síntesis. *Global Ecol. Biogeogr* 16: 265-280.
- Fitzpatrick, B.M. y H.B. Shaffer.** 2007. Introduction history and habitat variation explain the landscape genetics of hybrid tiger salamanders. *Ecological Applications* 17(2): 598-608.
- Frankham R, J. Ballou y D. Briscoe.** 2005. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York.spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Mol. Ecol.* 14: 483-496.
- Fu Y. y W. Li.** 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.
- Funk, W.C., M.S. Blouin, P.S. Corn, B.A. Maxell, D.S. Philliod y S. Amish.** 2005. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology* 14:483-496.
- García-Estrada, C., Romero-Almaraz, Ma. De L. y Sánchez-Hernández, C.** 2002. Comparison of rodent communities in sites with different degrees of disturbance in deciduous forest of Southeastern Morelos, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 85: 153-168.
- García, A., M. Valtierra-Azotla y G. Ceballos.** In preparation. Temporal and spatial variation in population and community structure in herptiles of a tropical deciduous forests in western Mexico.
- García, D.M., M. Marmontel, F.W. Rosas y F.R. Santos.** 2007. Conservation Genetics of the giant otter (*Pteronura brasiliensis* (Zimmerman, 1780)) (Carnivora, Mustelidae). *Braz. J. Biol.* 67 (4. Suppl.): 819-827.
- Garner, A., J. Rachlau y I. Waits.** 2005. Genetics diversity and population divergence in fragmented habitats: conservation of Idaho ground squirrels. *Conservation genetics* 6: 759-779.
- Genoways, H.H.**1973. Systematics and evolutionary relationships of spiny pocket mice, genus *Liomys*. Special publications the Museum Texas Tech University, 5: 1-368.
- Gissi, C., A. Reyes, G. Pesole y C. Saccone,** 2000 Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1022–1031.
- Glenn T.C., J.L. Stanton, A. Lu, L.M. Davis, J.R. Alvarado Bremer, Rhodes WE, Brisbin Jr. IL and Sawyer RH.** 2002. Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodylians. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 294:312-324.

- Goodman, D.** 1987. The demography of chance extinction. Pages 11-34 in M. E. Soulé, editor. *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Goodwin, B.J.** 2003. Is landscape connectivity a dependent or independent variable? *Landscape Ecology* 18: 687-699.
- Graham Bell, M.J. Lechowicz y M.J. Waterway.** 2000. Environmental heterogeneity and species diversity of forest sedges. *Journal of Ecology* 88 (1): 67–87.
- Guillot, G.** 2008. Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation—the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24(19): 2222-2228.
- Guillot, G., R. Leblois, A. Coulon, A.C. Frantz.** 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18: 4734-4756.
- Guillot, G., A. Estoup, F. Mortimer y J.F. Cosson.** 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170(3): 1261-1280.
- Gutiérrez García, T.A.** 2008. Estructura genética y filogeografía de *ototylomys phyllotis*. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Haila, Y.** 2002. A conceptual generalology of fragmentation research: from island Biogeography to landscape ecology. *Ecological Applications* 12(2): 321-334.
- Hall, E.R.** 1981. *The Mammals of North America*. 2 Vol. John Wiley y Sons, Nueva York.
- Hall T.** 2004. Bioedit sequence alignment editor. Version 7.0.0
- Hanski, I.** 1989. Metapopulation dynamics: does it help to have more of the same? *TREE* 4: 113- 114.
- Hartl, I.D. y A.G. Clark.** 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts. EUA.
- Hedrick, P. W.** 1996. Bottleneck(s) or metapopulation in cheetahs. *Conservation Biology* 10:897-899.
- Hedrick, P. w.** 2005. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. Massachusetts.
- Holderegger, R. y H.H. Wagner.** 2006. A brief guide to Landscape Genetics. *Landscape Ecology* 21:793-796.
- Holderegger, R. y H.H. Wagner.** 2008. Landscape Genetics. *Bioscience* 58: 199-207.
- Hudson R., D. Boos y N. Kaplan.** 1992. A statistical test for detecting populations subdivision. *Molecular Biology Evolution* 9: 138-151.
- Jensen, J.L., A.J. Bohonak, y S.T. Kelley.** 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.16 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jukes T. y C. Cantor.** 1969. Evolution of proteína molecules. P. 21-132 en: munro H. (editores). *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York.
- Kim, I. Philips, C.J. Monjeau, J.A., Birney, E.C., Noack, K., Pumo, D.E., Sises, R.S., y Dole, J.A.** 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Mol Ecol* 7:667-678.
- Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions trough comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham y F. H. Sheldon.** 2000. Relations among Cave Swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparison of microsatellite and cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4(1):107-121.
- W.S. Klug y M.R. Cummings.** 1999. *Conceptos de genética*. Prentice Hall.
- Kremen, C.** 1992. Assessing the indicator properties of species assemblages for natural areas monitoring. *Ecological Applications* 2: 203-217.
- Kunher, M.K.** 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22 (6): 768-770.

- Laurance, W. F., R.O. Bierregaard, Jr., C. Gascon, R. K. Didham, A.P. Smith, A. J. Lynam, V. M. Viana, T.E. Lovejoy, K.E. Sieving, J.W. Sites, Jr., M. Andersen, M. D. Tocher, E. A. Kramer, C. Restrepo y C. Moritz.** 1997. Tropical forest fragmentation: synthesis of a diverse and dynamic discipline. Pp. 502-514. In Laurance, W.F. y R. O. Bierregaard, Jr. (eds.) *Tropical Forest Remnants. Ecology, management and conservation of fragmented communities.* The University of Chicago Press, Chicago, Estados Unidos.
- Lindsay, D.L., K. R. Barr, R.F. Lance, S.A. Tweddale, T.J. Hayden y P.L. Leberg.** 2008. Habitat fragmentation and genetic diversity of an endangered, migratory songbird, the golden-cheeked warbler (*Dendroica chrysoparia*). *Molecular Ecology* 17: 2122-2133.
- Lowe AJ, S.A. Harris y P. Ashton** .2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application.* Blackwells. Oxford, 326pp.
- Lynch, M. y T. Crease.** 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
- MacCracken, J. G., Uresk, D. W. & Hansen, R. M. (1985).** Burrowing owl foods in Conata Basin, South Dakota. *Great Basin Naturalist* 45(2):287-290.
- Martínkova, N., R. A. McDonal y J. B. Searle.** 2007. Stoats (*Mustela erminea*) provide evidence of natural overland colonization of Ireland. *Proc. R. Soc. B.* 274: 1387-1393.
- McDonald, D.W. (ed.). (2001).** *The New encyclopedia of mammals.* Oxford University Press, Oxford, UK.
- McDonald, W. y C.C. St Clair.** 2004. Elements that promote highway crossing structure use by small mammals in Banff National Park. *Journal of Applied Ecology* 41: 82-93.
- Malcolm, J.** 1997. Biomass and diversity of small mammals in amazonian forest fragments. Pp. 207-221. In Laurance, W.F. y R. O. Bierregaard, Jr. (eds.) *Tropical Forest Remnants. Ecology, management and conservation of fragmented communities.* The University of Chicago Press, Chicago, Estados Unidos.
- Manel, S., M.K. Schwartz, L. Gordon y P. Taberlet.** 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18(4): 189. 197.
- Mantel N.** 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Martin, A.P. y S.R. Palumbi.** 1993. Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and Mammals. *Molecular and biological Evolution* 10(4): 873-891.
- Matocq, M.D., J.L. Patton y M.N. Da Silva.** 2000. Population genetic structure of two ecologically distinct amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution* 54: 14223-1432.
- Mellink, E.** 1995. Uso del hábitat, dinámica poblacional y estacionalidad reproductiva de roedores en el altiplano potosino, México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 1:1-8.
- Michaux, J.R., R. Liboos y M.G. Filippucci.** 2005. So close and so different :comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. *Heredity* 94:52-63.
- Miranda A.** 1997 Informe final del proyecto B033. Deforestación y fragmentación del hábitat; consecuencias ecológicas sobre la fauna de mamíferos de la selva tropical estacional. pp. 1-46. (<http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Letras=B&Numero=33>)
- Moore, W. S.** 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49, 718-726.
- Nabholz, B., J.F. Mauffrey, E. Bazin, N. Galtier y S. Glemin.** 2008. Determination of Mitochondrial Genetic Diversity in Mammals. *Genetics* 178: 351-361.

- Nascimento, F.F., C. R. Bonvicino, M.M. De Oliveira, M.P.C. Scheneider y H. N. Seuánez.** 2008. Population Genetic Studies of *Alouatta belzebul* from the Amazonian and Atlantic Forest. *American Journal of Primatology* 70: 423-431.
- Nei, M.** 1982. Evolution of human races at the gene level. P. 167-181 en. Bonne-Tamir, B., T. Cohen y R. Goodman (editores). Human genetics part A: the unfolding genome. Alan R. Liss. New York.
- Nei, M.** 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Nei, M. y S. Kumar.** 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Nueva York.
- Nei, M. y J.C. Miller.** 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitution within and between populations for restriction data. *Genetics* 125: 873-879.
- O'Connell, L.M., A. Mosseler y O.P. Rajora.** 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97: 418-426.
- Opdam, P.** 1991. Metapopulation theory and habitat fragmentation: a review of holarctic breeding bird studies. *Landscape Ecology* 5(2): 93-106.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst.** 1998. What molecules can tell us about populations choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Peakall, R. y D. Lindenmayer.** 2006. Genetic insights into population recovery following experimental perturbation in a fragmented landscape. *Biological Conservation* 132, 520-532.
- Pérez-Espona, S., F.J., Pérez-Barbería, J.E. McLeod, C.D. Jiggins, I.J. Gordon y J.m. Pemberton.** 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). *Mol. Ecol.* 17: 981-996.
- Pérez-Espona, S., F.J., Pérez-Barbería, W.P. Goodall-Copestake, C.D. Jiggins y I.J. Gordon.** 2009. Genetic Diversity and population structure of Scottish highland red deer (*Cervus Elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity* 102: 199-210.
- Pires de Campos Telles, M., J.A. Felizola Diniz-Filho, R. Pereira Bastos, T. Nascimento Soares, L. Dall'Ara y L. Pedrosa Lima.** 2007. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biological conservation* 139: 37-46.
- Primmack, R.B.** 1993. Essentials of conservation biology. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Primmack, R., R.Rozzi, P.Feinsinger, R.Dirzo y F. Massardo.** 2001. Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas Latinoamericanas. FCE. México. Pp. 797.
- Prusak, B. y T. Grzybowski.** 2004. non-random base composition in codons of mitochondrial cytochrome b gene in vertebrates. *Acta Biochimica Polonica* 51(4): 897-905.
- Radespiel, U., R. Rakotondravony y L. Chikhi.** 2008. Natural and Anthropogenic Determinants of Genetic Structure in the Largest Remaining Population of the Endangered Golden-Brown Mouse Lemur, *Microcebus ravelobensis*. *American Journal of Primatology* 70: 860-870.
- Ramírez-Pulido, J., R. Lopez-Vilchis, C.Müdespacher e I. Lira.** 1982. Catálogo de los mamíferos terrestres nativos de México. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Trillas. México.
- Ramírez-Pulido, J. y A.Castro-C.** 1994. Bibliografía reciente de los Mamíferos de México. 1989-1993. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 216 pp.
- Romero-Almaraz, M. L., Sánchez-Hernández, C., García-Estrada C. & Owen, R. D.** 2000. Mamíferos pequeños: Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. Primera Edición. Facultad de Ciencias UNAM, Instituto de Biología UNAM. Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM. México.
- Rozas, J. y P., Librado.** 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Rzedowski, J. y M. equihua.** 1987. atlas Cultural de México (Flora). Grupo Editorial Planeta, México, D.F.

- Rogers, D. S.** 1990. Genetic evolution, historical biogeography, and systematic relationships among spiny pocket mice (subfamily Heteromyinae). *Journal of Mammalogy* 71:668-685.
- Rhodes, A.** 2005. Estructura y diversidad espacio temporal de la comunidad de murciélagos con relación a gradientes ambientales en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela de Ciencias, Universidad de Las Américas-Puebla. Puebla, México.
- Rousset, F.**, 1997 Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219-1228
- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius, and I. Hanski.** 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392:491-493.
- Sánchez, H. C. y Romero, M de L.** 1995. Mastofauna silvestre del área de reserva Sierra de Huautla. (con énfasis en la región noreste). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas. México.
- Sánchez-Cordero, V. y Fleming, T. H.** 1993. Ecology of tropical heteromyids (capítulo 8:596-617). *En* Genoways, H. H. & Brown, J. H. (eds). *Biology of the Heteromyidae*. American Society of Mammalogists special publication #10. 719pp.
- Selkoe, K.A. y R.J., Toonen.** 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Schlötterer, C.** 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schmidly, D.J., K.T. Wilkins y J.N. Derr.** 1993. Biogeography. Pp. 319-356. *En*: H.H. Genoways y J.H. Brown (editores). *Biology of the Heteromyidae*. Spec. Publ. 10 Amer. Soc. Mamm. 719 pp.
- Schneider, S., D. Roessli y L.Excoffier.** 2000. Arlequin ver 2.0.0: A software for populations genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.
- Sharma, R. H. Stuckas, R. Bhaskar, S.Rajput, I. Khan, S. Prakash Goyal y R. Tiedemann.** 2008. mtDNA indicates profound populations structure in Indian tiger (*Panthera tigris tigris*). *Conserv. Gen.* 10(4): 1566-1572.
- Slatkin M.** 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264–279.
- Spradling, T., M. Hafner and J. Demastes.** 2001 Differences in rate of cytochrome-b evolution among species of rodents. *J. Mammal.* 82: 65–80.
- Storfer, A., M.A. Murphy, J.S. Evans, C.S. Goldberg, S. Robinson, S.F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling y L.P. Waits.** 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98: 128-142.
- Tajima F.** 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105. 437-460.
- Tajima F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar.** 2007. MEGA4: molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Templeton, R.A., E. Routman y C.A. Phillips.** 1995. Separating population sturcutre from populations history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- The Association for the Study of Animal Behaviour.** 2000. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Animal Behaviour* 59: 253-257.
- Trénel, P., M.M. Hansen, S. Normand y F. Borschsenius.** 2008. Landscape genetics, historical isolation and cross-Andeangene flow in the wax palm, *Ceroxylon echinulatum* (Arecaceae). *Molecular Ecology* 17: 3528-3540.

- Van de Zande, L., Van Apeldoorn, R.C., Blijdenstein, A.F. y De Jong.** 2000. Microsatellite análisis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Neerdelands. *Mol. Ecol.* 9: 1651-1656.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Piñero, G. Ceballos.** 1999. Linking heterozygosity, demography, and fitness of tropical populations of *Liomys pictus*. *Journal of Mammalogy*, 80(3): 810-822.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Piñero, G. Ceballos.** 1998. Heterozygosity patterning and its relation to fitness components in experimental populations of *Liomys pictus* from tropical forests in western Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65(4): 501-514.
- Vázquez-Domínguez, E., G. Ceballos, D. Piñero.** 2002. Exploring the relation between genetic structure and habitat heterogeneity in the rodent *Liomys pictus* from Chamela, Jalisco. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 86: 17-29.
- Vega Bernal, R.R.** 2006. Estructura y diversidad genética de *Oryzomys palustris cozumelae* de la Isla de Cozumel. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Villa, B. y Cervantes, F.** 2003. Los mamíferos de México. Grupo Editorial Iberoamericana, Instituto de Biología, UNAM. México.
- Vignieri, S.N.** 2005. Streams over mountains: influence of riparian connectivity on gene flow in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*). *Mol. Ecol.* 14:1925-1937.
- Wenink, K., A.J. Kaker, H. Roser y M.G.J. Tilanus.** 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic inbreeding (*Callosalpinx*). *Evolution* 50(1): 318-330.
- Widger, W.R., W.A. Cramer, R.G. Herrman y A. Trebst.** 1984. Sequence homology and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b₆-f complex: position of the cytochrome b hemes in the membrane. *Proc. Natl. Academic Sciences USA* 81:674-678.
- Willi, Y., Van Buskirk, J., Schmid B., et al.** 2007. Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift and selection. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 534-542.
- Williams, D. F., H. H. Genoways, y J. K. Braun.** 1993. Taxonomy and systematic. Pp. 38–190 en *Biology of the Heteromyidae* (H. H. Genoways and J. H. Brown, eds). *Special Publication, American Society of Mammalogists* 10:1–719
- Wilson, D. E. y D. M. Reeder** (editores). 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press, 2,142 pp
- Wright, S.** 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright, S.** 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-366.

Anexo 2

Muestras de falanges de roedores de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla utilizadas en este estudio (Sitios: VIR: La Virgen; XNP: Xantiopan no perturbado; Ap: Axuchitlàn; XP: Xantiopan perturbado).

Id Muestra	Sitio	Sexo	Fecha
1	VIR	Hembra	02/07/2002
2	VIR	Hembra	02/07/2002
3	VIR	Hembra	02/07/2002
4	VIR	Hembra	03/07/2002
5	VIR	Hembra	03/07/2002
6	VIR	Hembra	03/07/2002
7	VIR	Hembra	03/07/2002
8	VIR	Hembra	06/08/2002
9	VIR	Hembra	06/08/2002
10	VIR	Hembra	06/08/2002
11	VIR	Macho	06/08/2002
12	VIR	Macho	06/08/2002
13	VIR	Macho	07/08/2002
14	VIR	Macho	04/09/2002
15	VIR	Macho	04/09/2002
16	VIR	Macho	04/09/2002
17	VIR	Macho	06/10/2002
18	VIR	Macho	06/10/2002
19	VIR	Macho	06/10/2002
20	VIR	Macho	07/10/2002
21	XNP	Hembra	09/08/2002
22	XNP	Hembra	09/08/2002
23	XNP	Hembra	09/08/2002
24	XNP	Hembra	09/08/2002
25	XNP	Hembra	09/08/2002
26	XNP	Hembra	10/08/2002
27	XNP	Hembra	06/09/2002
28	XNP	Hembra	06/09/2002
29	XNP	Hembra	06/09/2002
30	XNP	Hembra	07/09/2002
31	XNP	Macho	07/09/2002
32	XNP	Macho	07/09/2002
33	XNP	Macho	07/09/2002
34	XNP	Macho	07/09/2002
35	XNP	Macho	09/10/2002
36	XNP	Macho	09/10/2002
37	XNP	Macho	09/10/2002
38	XNP	Macho	09/10/2002
39	XNP	Macho	09/10/2002
40	XNP	Hembra	09/10/2002
41	XP	Hembra	06/09/2002
42	XP	Hembra	07/09/2002

43	XP	Hembra	08/09/2002
44	XP	Hembra	09/10/2002
45	XP	Hembra	09/10/2002
46	XP	Hembra	09/10/2002
47	XP	Hembra	09/10/2002
48	XP	Hembra	10/10/2002
49	XP	Hembra	11/10/2002
50	XP	Macho	06/12/2002
51	XP	Macho	07/12/2002
52	XP	Macho	07/12/2002
53	XP	Macho	06/12/2002
54	XP	Macho	07/12/2002
55	XP	Macho	07/12/2002
56	XP	Macho	02/12/2003
57	XP	Macho	20/07/2004
58	XP	Macho	13/09/2004
59	XP	Macho	19/07/2004
60	AP	Hembra	01/07/2002
61	AP	Hembra	02/07/2002
62	AP	Hembra	04/09/2002
63	AP	Hembra	06/10/2002
64	AP	Hembra	07/10/2002
65	AP	Hembra	07/10/2002
66	AP	Hembra	05/01/2003
67	AP	Hembra	05/01/2003
68	AP	Hembra	05/01/2003
69	AP	Hembra	06/01/2003
70	AP	Macho	07/01/2003
71	AP	Macho	11/03/2003
72	AP	Macho	31/03/2003
73	AP	Macho	30/07/2003
74	AP	Macho	29/09/2003
75	AP	Macho	29/09/2003
76	AP	Macho	29/09/2003
77	AP	Macho	30/09/2003
78	AP	Macho	30/11/2003
79	AP	Macho	30/11/2003

Anexo 3

Protocolo de extracción para tejido animal (cola de ratón, falanges) con el kit PROMEGA

1. Para cada muestra a procesar, se agrega en un tubo 120 μ l de EDTA a 0.5 M (pH 8.0) y 500 μ l de solución de lisis nuclear. Enfriar en hielo (la solución se pone turbia al enfriarse)
2. Deshacer 0.5-1 cm de tejido en un mortero y ponerlo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml
3. Agregar 600 μ l de la solución de EDTA/solución de lisis nuclear al tubo del paso 2
4. Agregar 5 μ l de Proteinasa K (20mg/ml)
5. Incubar toda la noche a 55°C. Asegurarse de que el tejido esté completamente digerido
6. Agregar 3 μ l de la solución de RNasa y mezclar la solución invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla durante 15-30 minutos a 37°C. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de continuar
7. Cuando la muestra esté a temperatura ambiente, agregar 200 μ l de solución de precipitación de proteínas. Vórtex durante 20 segundos. Enfriar en hielo durante 5 minutos
8. Centrifugar durante 4 minutos a 10, 000 rpm. Las proteínas precipitadas formarán un pellet blanco
9. Con cuidado remover el sobrenadante que contiene el ADN (dejar el pellet de proteínas) y pasarlo a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml con 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente
10. Mezclar cuidadosamente la solución invirtiendo el tubo hasta que las hebras blancas de ADN sean visibles
11. Centrifugar durante 1 minuto a 10, 000 rpm a temperatura ambiente. El ADN será visible en forma de un pellet blanco. Con cuidado eliminar el sobrenadante
12. Agregar 600 μ l de etanol al 70% al pellet del paso 11. Invertir con cuidado el tubo varias veces para lavar el DNA. Centrifugar durante 1 minuto a 10, 000 rpm a temperatura ambiente
13. Aspirar con cuidado el etanol usando una pipeta Pasteur. El pellet de ADN está muy suelto en este punto por lo que se debe tener cuidado para no aspirarlo con la pipeta
14. Invertir el tubo en papel absorbente para secarlo durante 10-15 minutos
15. Agregar 50 μ l de la solución de rehidratación de ADN, incubar el ADN durante 1 hora a 65°C. Periódicamente mezclar la solución.
16. Guardar el ADN a 2-8° C.

Anexo 4

Elaboración de geles de agarosa al 1 y 1.5% para visualización de extracción de DNA y producto de PCR

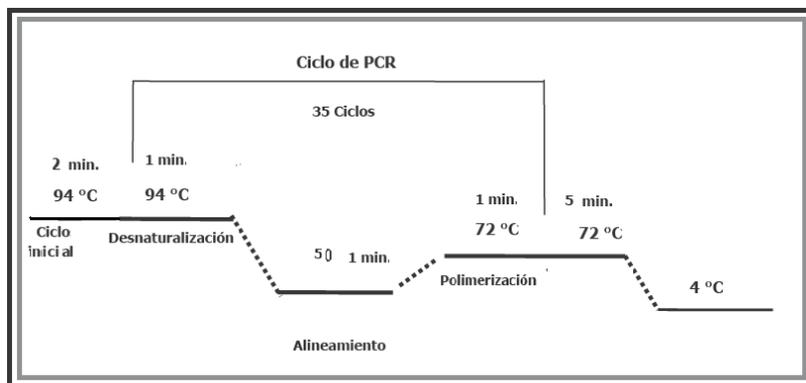
1. Pesar 0.45g (gel al 1%) o 0.64g (gel al 1.5%) de agarosa grado biología molecular y agregar en 45mL de buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5X, pH 8.0, en matraz Erlenmeyer
2. Calentar en microondas por periodos de 20s a potencia media, hasta que se disuelva por completo. Tener cuidado de que la agarosa no entre en ebullición y de que no se derrame o se evapore el buffer
3. Dejar enfriar la mezcla hasta que se tolere tocarla con la mano
4. Verterla sobre la charola de gel previamente limpia y nivelada, meter los peines para la formación de pozos después de vaciar la mezcla. Dejar que solidifique
5. Preparar mezcla de DNA/buffer de carga de un frente, sobre papel parafilm de la siguiente manera:
 - 3 μ L de loading de un frente (agua30%, glicerol30%, azul bromofenol 0.025%)
 - 2 μ L de DNA, ya sea extracción o producto de PCR, esto por individuo o por muestra
6. Cargar cuidadosamente cada mezcla de muestra sobre c/u de los pozos, cargar en un pozo de cada fila 2 μ L de marcador de peso molecular en el caso de producto de PCR, o marcador "lambda" para extracción
7. Correr a 100V durante 45 minutos. Tener cuidado de que el buffer con el que se realizo el gel, tenga la misma concentración que el presenta la cámara de electroforesis
8. Una vez terminada la electroforesis, se tiñe el gel en una solución de bromuro de etidio al 5%, dejándola en la misma por 20min
9. Cuidadosamente, sumergir el gel en agua destilada para enjuagar el exceso de bromuro durante 10 minutos
10. Visualizar bajo luz ultravioleta de alta intensidad (480nm), para tomar la fotografía correspondiente

Anexo 5 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A continuación se muestran las condiciones de PCR así como las temperaturas y número de ciclos de amplificación utilizadas.

<i>Reactivos</i>	<i>μL</i>
MgCl ₂ (50mM)	1.72
Buffer 10X	2
dNTP's (2mM)	2
PR (MVZ45,10μM)	2
PF (MVZ16,10μM)	2
BSA	1
Taq (5U/μL)	0.2
H ₂ O	8.08
ADN	1
Volumen final	20

<i>Paso</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min)</i>
Ciclo inicial	94	2
Desnaturalización	94	1
Alineación	50	1
Extensión(polimerización)	72	1
	35 veces	
Extensión final	72	5
Final	4	hold



ANEXO 6

Haplotipos compartidos

h1

AGTGTTGGGGTTTTTCGCGGTGCCTCAGGGGTATGTTTCCTTCTTTCCCCATTCCCCTGGGAGCGAT
GTCTCCCGGGCTCCTTAGGTTTTAAATTAGGGAAATATCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGT
GGGGTTTTGGGGGAAACGTTGGGCCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGTCTCCAAGAATATGGAA
AGAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAACAAAATCCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTA
GGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAA
TAGGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGG
CCTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGATA
GTTATTTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTCCACTACTCAAATATATTCTGTGATCACGTTGTAGGAC
ATAACCTACGT

h2

AGAGCTGTGAGGCATTCGGAAGTTGTGGAAAAACATGTCAGGATCCTCGGGCCCCAAGGTAATTAA
GGGGGAGATTTGGGTGTCCTTTTAAATAGGAATAGGTCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGG
TGATTCTTGAGTGGGTCATTGCAGCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGTCTCCAAGAATATGGAAA
GAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAATGATAACCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTAG
GGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGGGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAAT
AGGATTCGAGACTATAGCTAGGGCCATGAGAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGGC
TTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGGTAGT
TAATTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTTCTCCTACTCAAATATATTTGATCAGTCACGGGGTAGGACAT
AACCTACGT

h3

ACAATTCAGAGGAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGACCC
CCGACAATCATACCCCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACATCCTA
TTAATTAAGCACTTCTTCGGCGTATCGTGTGAGAACTACAGACGGAGGGAGAGAAAACCTTAACAATG
TGTGCCGCAAGCCCTAACTCACTACTCAACACATATTTGATGTGAGGACTGGGACTATGACAAATCG
AT

h4

ATCATTTTGGAGGAGCAACTGTAATTACAAATCTTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAGT
TGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTTCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAAAGGGTTCTAACA

ACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TGGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACTTAGGGACC
CCGACATTAACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGATTGATTCTTTCCA
CTAATTTAAAAGACCTTGTGATCTACCGCCAGCGAGCTGTACTAGATAGCTGCGTAAGTCTTACTGAC
CTTATTACTGATCGTGACTGGATGAATCCATGCGTCCTACGGGACAAGCGTAGCGCTTTGCCGCATG
CAC

h5

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACCTTGGACCC
CCGACAATTACGCTCCCCTCAAACACCCCACCACACAACCACACATCAAACCAGAGTGATATATTCTA
TTATTAAGTCACTGTCTGTGTCATTCTGGGAGGAAGGCTCGCCAGGATAAGGGATTATTTAGTAATG
GGATTTGAAAAAGCTTCTTCACTATCATGGCAACAACCCAGGCCAATGCGGAATCTCTCAAAAAAC
GT

h6

ACATTTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACCTTGGACCC
CCGACAATTACATCCCTCTAAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATCTATCCCA
CTAATAAAAGTCCCCCCTGGTGGCAGCAGAGAGAAATATAGACGGAGGGAGAGAAAAATTTAAAAAT
ATTTTTTACACACACCTACTTCACTATCAGCGCGGCAACCCTGACGAAATGTTGTGGTTTTATATATAT
GT

h7

ACATATTAGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAGT
TGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAACA
ACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTTTTTTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATTTTAGACCGAT
GAGAATTACACACCTCTAGACCCACTCAACACCCCACCACAAATGAAACCAGAGTGATACATTCCACT
ATTTAATGAGCCCCCCCCGACTAATCTCGCGGGGGAAATCAACCACTCAGGGGAGACTTTACTCACAC
AGGGGGGGGAGGCCTATTACACTATCAAAAACTATTCTGTCCTTAAATTTTTTTTTATACACATTCCGT

h8

CATACTACGAAGCGAACGGTTCGGTGGGTCTCAACCAGCGGGTTCCTTCCCTTTTTACAACTGG
GCTCCTGTTTCCTGGGGGAAAAAAGAAGAGGTGGTCCCAAGGACAAAAAGGGGGGCATTTAC
TTTGTTCCTCCCCCATCACTGCTGCTCTTGGTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAAACCT
AACAACCCACTTTTTATATTATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATC
TATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGAC
CCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTC
CACTATTTGCCAATACAGGAGGGCCGGCTTTGGAAGGAAAAAACAAGGGGGTTTCCCTTTAAATT
AAAAAGAGGGGAGGGCCCTTTAACTACTTGGGGGAAATTTGAAAAAAGGAGGGGGTCCCTTTTT
GAAGT

h9

ACATCTCCGAGGAGAAAGGGCTCGTGGGGAATCACCAGAGAGGGTCCCTTCCCTTTTTAAAAACGG
GGCCCGCTGCCGCTTGGGGGAACAAAAAGAGAAATTTTCTCAAAAAAAAAAAGGGGGGGTTTCTT
TGGGGTAAACCACCCAAAACCTTTTTCTTTTTATAAAAAAGGCCGATTTCTTCTGAAACAAAAACA
AAAAACCTTTTTTTTTTTTTAAAAAACTGGGGCCTGTTCTGTGGACCCCAAAAAAATTTCTAAGAT
CTATTAGGGGATATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGGGTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGG
ACCCCTGACAATTACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTT
TCCACTATTTACCAATCCGGGGGGTCTTTTTGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAACCGGTATTTTCGTTAAT
GTAAAAAAAAAGGAGGACGACTTTACTACTGCGGAGAACTTTGAAAAAAAAAGAATAAGTCATGTTT
TAATGT

h10

ACCAAACGTAGCGACCGGGCTTGGTGGGGATAAACCAAAGGGTTCCTTTCTTTTTAAAAAAGG
GGCCCCCTTTTTGGGATCCAAACAAAAGTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAATGCTTTGC-
TTTCACTTCATTCTTCCATTCATCACTGCAGCTTTTTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAG
GTTCTAACACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCA
AAGATCTATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAA
TTGGACCCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGAT
ACTTTCCACTATTTACAAATATAGGAGGTCCGCTCTGGTTAATGATCCCACCCACGCGCCGGCTTTT
TAATTGGGGAACCCGGATGGTTGGTCTACTACATCAACAACCCGCCCGCCTCTCTCCTCTCCCTA
TCCCATCTTG

h11

ACCAATTCGAGGCGACCCGTTTCGGTTGGTCTCACCCCAAATATACCCTTCCCTTTTTTCAAACCTTAG
GGCCCTTTCTGAGGGGAACTCCCAGGAGACAAGTTTTTTTTTAACAAAAAGCTGTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGACCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGATCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACCC

CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCCA
CTATATCCCAATCTATAGCCcCCGGCTTTGGAAAGGAATACAACAAAAAGAGGAGTCCTTTAATGTAA
AAAAAAAAGAGGGCCCCCCTTACTACTCGGGGGAACCTTTGAACCCCCAACAGGTTTTTTGTGTTTTA
TT

h12

ATCCTTAACTGGCGAACCGTTCGGTTGGTCTCAACCCCCGGGGTTCCTTTCTTTTTTAAAACTTAG
GGCGCCTTTTCCTTGAGGGGTACCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTGCTGTGCGTTTTCACTT
CATTCTTCCATTTCATCACTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC
CCTGACAATTACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACGTCCC
ACTATTTACCAATCCCCCCCCCAGAATCTGGGAAGGAATTCACCCAGGGCCGGCGGGTGTAAAAT
TAAAAAATTGTAGGGGCGAACCTACTACCACAGAGATATTTGACTCTAGCAGCGAGGGGGTGGCGTT
AAAGT

h13

TCATTTTCTCAGTAAATGTAAAAATTAAGTCCTCCAACATAAACCCACACAATAGACAAAATGAAGT
TAAAGAACGGCTGGGGAGAACCTCGAAAAAGGAGCCCCCCTTAATACCCATTCTCGTAATTAACCATT
ACTTTCCATAAATTACTACAACCATAGCTATAAGGAACATCGTATTTTTTTACAAAAGGGGTAAAACC
CCCCGAAGAGAAATCCCTATTGTGGTAACAAAATTCGCTTAAACGCCTAATATTTTCTAAAAATTTTT
TGGGGGGAGATTTTTCCGCAGTGTTGTATCCCCCTTATTTTTATTTTCTCCTAACTCACTTAGAGGG
CGCGGCAAAGATTCACACACTAATGTCTTTGAATTACAATCACACATCAAACCAGAGTGATACATCCT
ATTAATTAAGCACTTCTTCGGCGTATCGTGTGAGAACTAATGGGATAGCTGAGAGGTAGTTAATTTG
TAATTACAGTAGCTGCTCCTTTCCTACTCAAATATATTTGATCAGTCACGGGGTAGGACATAACCTAC
GT

h14

ATTTTTTATGGGAGGAACGAGGGGCGTGTTAGTTTGTATGCGGCGTGCGGTGGGTGCATAATAAAG
GACACTAGTGCGGGGATCCATTATTTTTTTGCGGTAGCAATGGAACCACGTTTCATGGTGATGATATT
CGATGTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAAACCTCCTCGTTGACATGTTTAGAA
GAGAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATT
GTGCGGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAACGACGAGTCGTATCAGGTAAGGATAAATTT
GATGCTTTGTCCAAAATGATCGTGTAGATTGGCTCACTGTTTAAAGGGGAACAAAATTTTTTTTTTTGG
GTGGCGAGACCCCCCTTTTTTTTTCCGTATCCCGGAAAAACAAAATTTTTTTTTTTGGGGGGGATTAA
CCCCCCTTGCCTTAGGCTCTCCCTACTACCTCGGAAGATGTTGTATGTAAGCGGGGGGGAAAAACA
ATCGATGT

h15

ATGGGCTGCGACAGGATCGAAGCGGGTGTAGTTTTTTCTTTTATTTTCTATTGCTTTTTACAAAAAA

AACAAGCACTATATCATTAAATTTTTGATAGTAGGAGCGATGCCACACCCTATGGTGATGATATTCGA
TGTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAAGAG
AGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGTG
CGGAAACGTAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAAAGTCGAGTCGTATGATGTAAGGATAAATTTGATG
CTTTGTCCAAGAGGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGTGGGAATGTGGTGAAAGTTTC
TCAGATAATCCCCAATAATGAGACTATTCCCGAATAAATAAAAAATTTAATTTGGAGGGGATTAAACCC
CCCATGTTTGAGGTCTCCCTAACTACCTCAGAAAATTTTTGTGTAAGGTTTGGTGGGGAAGCAACGA
TGT

h16

GGAGACTATTAAGTATGTTGAAGGATAGTCTTTTTTCATAAAAGCTCTAATCGTTGAGAAGTACTTGTG
ATTGAGAATCTGAGGGTAAAATTAGCAGGTCATTGGTATATTGGCACTATCGCATTTGATTCAATTCCG
GATTCGTATATATCCCTGCAAGAATCCTTCCGTTTACATTTATACCCCTCGTTCACATATTTATAAATCA
GTTAACAGGTCCTTAGCCTGGGCCAAACCTACTTCCCTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGTGC
GGGGTCGCAATTTTTTTAACAAGTATTTGTAGCGTCGAGCCCTATCGTCTAAGTTTACTTTTAATGCT
TTGTCCAAGATTCTTGTGTCCGTGTACTIONTACTGTTTTAATTATTATGGGGAAGTTGTGAAAATTTCTCA
TTAAGTCCCCCGTAATGGGGTAAGTCCCGGATATATGAGCGACCCGACGTACAGAAAGTTAATCCCA
AAGGACATCAGGGGTCTATCAACTACTCCGCATAAATATTTTATATCGGGTGGGGGGAAACCCAACG
ATT

h17

ACATCTTTTCATGTAGCCCATCATTAAATGAGCTATCCTATGCCAACTTTCTTTTCTCGGTGAATCCCTC
CTTTTGGACTGTTTGAGCGACGTCGTCGAGCGGTTCCGGCGGAAATCTACCCTTGTGCGTTGGTCTA
GAAGTCTATACCAATTCAATAAGGATGGACGAGCTCCAGTTGTAAGTCTTCGGGGACAAAGTTAGCT
GGGGGTTATAAGGCATTTCTCCACGTCTTGTGCGATACCTTCGGCCCTTTGAAGGCCTTGCGCCCA
AGGGCGGAGGGTTGCGGTTCAACTCGCTCCCGGTTACAGCGAGTTGCCGTAGTCCGGGGGTCTT
ATGAGCCCGGTTACACGCAAGCTTGTAAGTCGTTAAGTGGAATAACGAACTTTGTCCAGAAGTTCT
GGGGTCTATTGGTCTCTAGGCAGTCTGTTTAAAGTGGGACGAAGGGAAATTTCAAGGTTATCCCC
CTTAGATCGGAACCAGCCAGGGTAGTATCCCCACTTATTACGCCCCCAAAAAATTGTGTGTTTTACC
AAGCAATGAGT

h18

AGTCTCGTGAGGTTAAGGGGTTTTTGAAAAAATTTTCTTCGAACACATACCCCGCGCCCCGGAATC
CCCCCGACCCCGAGGGATTTTAAAATGGGAAGACCTCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGTG
TTGAGCTGGGGGTACGTTATGTACGGGTCGGTTGTAATTGTCCGGGGTCTCCAAGAATATGAAAG
AATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAATAATAACCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTAGG
GGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAATA
GGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAAGAAGAAGTAAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGGCC
TTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGAGAGTT

ATTTTGTAATTACAGTACTGCTCCTCCCCTACTCAAATATATTCTGTCGCTCACGTCGTAGGACATA
ACCTACGT

h19

AGAGCTGTGAGGCATTGGAAGTTGTGGAAAAACATGTCAGGATCCTCGGGCCCCAAGGTAATTAA
GGGGGGAGATTTGGGTGTCCTTTAAATAGGAATAGGTCCTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGG
TGATTCTTGAGTGGGTCATTGCAGCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGGTCTCCAAGAATATGGAAA
GAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAATGATAACCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTAG
GGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGGGGGTGTAGACCTTTTCGTGTATAAAT
AGGATTCGAGACTATAGCTAGGGCCATGAGAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGGC
TTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGGTAGT
TAATTTGTAATTACAGTACTGCTCCTTCTCCTACTCAAATATATTTGATCAGTCACGGGGTAGGACAT
AACCTACGT

h20

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACCTTGGACCC
CCGACAATTACGCTCCCCTCAAACACCCCACCACACAACCACACATCAAACCAGAGTGATATATTCTA
TTATTAAGTCACTGTCTGTGTCATTCTGGGAGGAAGGCTCGCCAGGATAAGGGATTATTTAGTAATG
GGATTTGAAAAAGCTTCTTCACTATCATGGCAACAACCCAGGCCCAATGCGGAATCTCTCAAAAAAC
GT

h21

ACATTTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACCTTGGACCC
CCGACAATTACATCCCTCTAAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATCTATCCCA
CTAATAAAAGTCCCCCCTGGTGGCAGCAGAGAGAAATATAGACGGAGGGAGAGAAAAATTAATAAAT
ATTTTTTACACACACCTACTTCACTATCAGCGCGGCAACCCTGACGAAATGTTGTGGTTTTATATATAT
GT

h22

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC

AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGACCC
CAGACAATTCGCCACCTCTAACCCAGCTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATATTTCA
CTATTTAAAGACTAGTCTTGATGGCCGTTGGGGGGTCCCAGGGGGGGGGGGGGGCAAATTA
TTATGTCTACGAAGACACCCTCCACTATCACTGCCACAACCCAGCTAGCAAGTATGTTGTGTATATAA
ACGT

h23

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGCTACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTCCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTTTACACGAAACAGGCTGTAATA
ACCCCTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TAGGGGTTATCATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACCTTGGACCC
CCGACAATTACACCTCGCTAACCCACTCAACACGCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATATTTCCA
CTATTTGAAGGGCGGCGCTAGCGTATCGTGTGAGAGTTAAAAACATCTTCTCAAAGACTTTATGCACA
CCCCCTGAGACCTACCCCCACTATCAAAAAACAACCCATGCTTAAATTTGTGTTATATAAGATATG
T

h24

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAACTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCCTATATCTCACTTGGGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGACC
CCCGACAATTACTTACCCGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAATGATACATTCC
ACTATTTGAAAGTTCCCCCGGCTGGCTCTGGGGCGATATAAAACCCTGTCCGAGGGGAGGTTACTA
TCCGAGCGGGGCCCTATGTTTCACTATCAATAAAACAACCCAGAAAAAAATTTTTTTGAGCACCCAT
GAGT

h25

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCCTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTGGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGATCC
CCGACAAGTTTTCATTCTTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACATTCCA
CTATTAGAAAGTTGAACCAGGTGGCcACTCGCGTGATATAAAACCCTGTGGACGTGCGAGTTAGGGT
GCTTGTGAGAAGAACCGACGGGACTATCAATGCAACAACCCAGTAAAAAGACGTGAGCATGCTGATGT
AAGT

h26

ACATTTCCGAGGCGAACCGTTCGGTGGGTCTCCTCCCCCGGTGGTCCCTTTCTTTTTTTAAAACCTAG
GTCCCTGTTCCCTGAGGGGGATTCCCAGTAGACAAGGCCTCTTAAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTGGACCC
CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCAACACACATCAAACCAGAGTGATACATTCCG
ATATTTGCCAATATAGGGGGCCTGCCTTCGGTTGGGAATACAACCAAAAAAGTATTTTTTTATTTAAA
AAAAAAGCAGCCCGCCCGCACTATCGGGGGAACCCGATAAAAAGAAAGAATTTCTTTTTTTTTAAG
T

h27

ACCTTTACGAGGGCCCCGTTCTTTGGGTCTCCTCCCCAGATGTCCCCTTCTTTTTTCCAGACTTAG
GTGCTGTTTCCTGAGGGGAAAACCTCAGTAGACAAGGTTACTTTAACAAGCTTCTGTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTGGACCC
CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCAACACACATCAAACCAGAGTGATACATTCCG
ATATTTACAAATCAATAGCCTCCGCTTTCGGATGGGGATACAACCACAGAGGGATTCTCCTCTTTTAT
AAAAAAGGAGGGGACCCCTTTCTATCGGGGGGGCAACACACCAAAGGGAGTATTTCTTTTTTTTAT
GT

h28

ACTTTTACACGGCGCCCGGCTCGGTGTGGTATAACCAAAGGGGATCCCTCCCCCTTAAAAAAGGG
GCCGCGGTTTGCTGGGGGAGAAAAAAGAAATTCCCAAACAACAAAAAGGGGGGGTTCCCT
GGGGGATTCCCCTCAAGACTTTTTTTTTTTTTATATAAAAGGGCGATTTCTTCGGGGAATAAAACAAA
AAAGGTCTTCTTTTTTATAAAAAAGGGGACCTCAATTCCTTTTTAACCACAAAAAACTGTCTTTGATTT
TTTAGGGGAAATGATGCTCCTAGGCTTATATCTCACATAAGATTTATTCTTTCCAGACATAACTTGGAC
CCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCAACACACAACAAACCAGAGTGATACATTC
CGATATTATCCAATGCGGGGCGTTCGCTCGGGGGTGGAAAAAACC GAATGTTTTTTTTTTTTATTAT
ATAAAAGGGGGAGCACTCCTGGCACTATGTTAAGGACCCTCCCGAAGAGAACAAGGGGCCCCCGC
AAAAGT

h29

ACATTAGCGTGGCGAACGGTTTGGTAGATCTCCTCTCCCTATGCCCCCATCCCTCTTAACAAACTTAG
TTTGACGATCCTGAGGGGGACCTCAAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTGGACCC

CTGACAATTACACACCTGCTAACCCTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATATCCCG
ATATTTTACAACCCTTGGCCCCCGGCTTCGGGTGGGATAAAAACCAGGGGGGGGTCTTTTATCTTT
TTTTTTTACAAGGGCCCCCCCCCCCCCGGGGGGGGCCTCCCAAAGGGGGGGGGTTCGGAAAAA
AAAAGT

h30

ATCTTAAATGGAGGGCTGGGACCTACATTGCAATTGAAATGGAATGAATGACCGTTACTTATATTTTT
ATTTAGTAAACCAATCATTAAATCTTCGGCCTTCCCGTCCGAACCACACTTCACAATGATGATAATCGA
TGTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAGGAG
AGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGTG
CGGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAACGTCGGGTCTGATCAGGTAAGGATAAATTTGAT
GCTTTGTCCAAGATGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGTGGGGATGATGTGAAAGTTT
CTCAGATAATCCCAATAATAAGATCGCTCCCGAATAAAAAAAAAAATTATTTGGGGAGGATTATACA
AAAAATTCTTTAGGCTCTCCACCTACTCTGAAGAACCGATATTTGTACGGTTGGCAAACCCCTGT
AAGT

h31

ATCGTTGCCCGTACCTCCCTCTTGTCCGTCCGTCTTCACTGGACTTGTTGGTAGAGTCTTGAAATTTA
AATTCAGGGCGCGCCCGCACTAGTTGGTCTCGCCAGGGAGGGCACcACACTTCACCATGATGTTATT
CGGTGTGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAG
GAGAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGGTATT
GTGCGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTTACGTCGAGTCGTATCAGGTAAGGTTAAATTT
GATGCGTTGTCCAAGATTATCGTGTACATTGACTCACTGTTTTAAGGATGATTAATTTTTGTTTTTTT
TTTACCCCCCCCCCAATTTTGTCCCCGGCTCTGGAAGAAAAAATTTTTTTTTTGGGGGGGATTATA
CCCCCATAAGTTAGGGTCTCCTTCACTACTCAAAGAAAAGATGAATACGGGGTAGGGACCACCCC
TGTAAGT

h32

GATTTCTTTCTTTGGCGTTGTGGGGGCATCCTCTTTCCTAAAGAACCTGGTGATCTATACGAATTCAA
GATCGCGAATCTGAGGGTAAGGATGACTAGGCTCCAGTATGTAAGCACTCTTCGATGGGATGATATT
CGCATTTCGGATACCTCCCTGCAGGCATCCTTCCGTCTGCGTTTCTACCTCTCGCACACATATATTTAG
GTCAGGTATCAGGTCCGCAGCCTGGGCCAAATTTACTCCGTTAGTTATCACACTGTCAATGTGGGGA
TGGAGAGGGTCGCAGTTTTTTGTCTCTAGTATTTGTTGCGTTGAGCTGAAACGTGTAAGTTTAAATTT
GATACGTAGTCCTAGATGCTTGCCTCCCTGCACTCGATGTTTCTATTATTATGGGGTAGTTGAAAGAA
GTTTTCATAACTCCGCCGTAAAGGGTCTCCAGATCCAAGAATAACCCGCCGCAGAGAAAGTT
ATTGAAATGGAGTCCATGTTGGTGCACACTACTCCGCGTATATATTGTTTATATCGGTGGGGGGGA
GCACCCATG

h33

CTTTTTGATCGTAGTCAGCTTAGAGTCTGTTTAATTAATTAAGTCGTTGCTTACTATTGGAGGTACCGC

ACTCAGAATCTGAGGGTTAACCTTACGAAGGTCGAGTACTCCAACACGCTTGGCAATGATGATATTCG
GAGTCGTAAATATCCCTGTAAGCATCCTTCCGTTTACGGTTCTACTCCTCGCACACATGTTTTTAGGT
CAGGTAACAGGTCCTTAGTCTGGGTCAAACCTACTTCGTTATTCCCCGCACTGTCACGGTGGTATTGG
AGGGGGTCGTAGTGTTTTTTCACTAGTATTTGTTGGGTGGGGCTCTATTGGGGAAGTTTAAATTTAAT
ATGTTGTTGTAGATTCTCGTGTCCGTGTACTIONACTGTTTTAATTATAATGGGGTAGTTGAAAAAGTTT
TCAGAACTCCGCCGTAAGGGCCGGCTTCAGAAACAAGAATAAACCGCCCTAGAGAAAGTTATTC
CCAAAAACTCGAGGGTTTTATTTGACTACTCCAAATTTATTTTTTTATTGTGTAAAAGAACCCCCCA
TGGT

h34

GATCGTGTGCGGTGTTTGGATAATCATCTTATTTATGTTTCGTACGACCTTTAAATTTTGGCTTCTTTTA
AGCTGAATCAAGTTAGCAATTGTTCTTCCCGTGAGTATAATCACACGCTTCTCCATGATGATATTCGG
AGTCGTAAACATCCCTGCAGGAAGGCATCCGTTTATGGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTTTAGGAG
AGTCGATAGGTCCGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTAAAATTGTG
CGGGTTCGTAAAGTGTGTAAGAGGTAGTAGTAACGTCGGGTTGTATCGGGTAAGGTTAAATTTGAT
GCTTTGTCCTAGATGATCGTGTACGTGGACTCACTGTTTTAATTAAAGTGGGGTAGTTGAGAAAGTTT
TTCAGAAAATCCCCATAAATAGGTGCTCCAGTCGAAAGAATAACCCGCCTTTGAGGAAGTTATTC
CAAAAAAAGTCAGGGGATCTTACACTATCACAAGTCGCCGGGGTTAGTCGGGTGGCGGGAACCCC
TGTAAGT

h35

GGGCGCTAGTAAGGCTCATATCGGAGGACGTCGCGCCAACGATGTGCGCTTACTGGAAGAAAACCC
GCCCCATCGACTCTCGTGAAGTCCCCCGTCTGGCAGAACTCCTTTGGCACGAGTCCITGGGGTCTAG
TCGGGGGCCGACGTCAAATCCCGGCCCTGACTATTACTATTTTTTTGTCCGTAGGGGGACAGGGTT
CTCGCGTTCCTTTAAGCACCTACCCTAACTGTGGCAAGGACGAGTTGGTGCCCTATTTTCTTTTAGGA
GCCCCCAGAAGTAGCTGCGGGCCGGGGCCCAAGAATTCCTTCTCTTTGGACAACAAAGGGGGG
TTTCTAGGGGGGGGGGAAAATTTTTTTGTTGAAACAAAAAAGGGGGTTGGGGGGGGGAAAATTAT
TTCTTTTTTTGGGGGAACAAAAAAGGTTTTCCCCCCCCGGGGAAAAAATTTTTTTTTTTGTGGAAA
ATTATTCAAAAAAAGGTATGGTCCCCCCTACTCAATGCAAATTTGATCAGTCGGGGGAAAAA
ATTTTTTTTGGT

h36

AGTGTGGGGTTTTTCGCGGTGCCTCAGGGGTATGTTTCCTTCTTTCCCCATTCCCCTGGGAGCGAT
GTCTCCCGGGCTCCTTAGGTTTTAAATTAGGGAAATATCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGT
GGGGTTTTGGGGAAACGTTGGGCCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGTCTCCAAGAATATGGAA
AGAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAACAAAATCCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTA
GGGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACTTTTCTGTATAAA
TAGGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAGAAGAAGTAAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGG
CCTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGATA

GTTATTTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTCCCACTACTCAAATATATTCTGTGTCGATCACGTTGTAGGAC
ATAACCTACGT

h37

ATCATTTTGTAGGAGCAACTGTAATTACAAATCTTCTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAGT
TGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTTCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAAAGGGTTCTAACA
ACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TGGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACTTAGGGACC
CCGACATTAACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGATTGATTCTTTCCA
CTAATTTAAAAGACCTTGTGATCTACCGCCAGCGAGCTGTACTAGATAGCTGCGTAAGTCTTACTGAC
CTTATTACTGATCGTGACTGGATGAATCCATGCGTCCTACGGGACAAGCGTAGCGCTTTGCCGCATG
CAC

h38

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGACCC
CAGACAATTCGCCACCTCTAACCCAGCTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATATTTCA
CTATTTAAAGACTAGTCTTGTATGGCCGTTGGGGGGTCCCAGGGGGGGGGGGGGGCAAATTAATAA
TTATGTCTACGAAGACACCCTCCACTATCACTGCCACAACCCAGCTAGCAAGTATGTTGTGTATATAA
ACGT

h39

ACATATTAGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAGT
TGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAACA
ACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTTTTTTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTATTTTAGACCGAT
GAGAATTACACACCTCTAGACCCACTCAACACCCACCACAAATGAAACCAGAGTGATACATTCCACT
ATTTAATGAGCCCCCCCCGACTAATCTCGCGGGGGAAATCAACCACTCAGGGGAGACTTTACTCACAC
AGGGGGGGGAGGCCTATTACACTATCAAAAACTATTCTGTCTTAAATTTTTTTTATACACATTCCGT

h40

ATTACTTCGAGGCGAACCGTTTCGGTGGATCTCCTCTCGCGATGCCCCCTTCCCTCTTAACAACTTAG
GCCCTGTTCTGAGGGGGACTCTCAGTAGACAAGGTCTTATTACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA

TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACCC
CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCCG
ATATTTGCCAATCTAGGGCGCCCCCTTTGGATGGGAAATCAACACAAGCGGTATTTTTTTACTTTTTT
AAAAAAGGAGGCCCGCCTTAACTACTGGGGGGAAGTAAACAAAAGAAGTCTCTCTTTTTATTAG
T

h41

ACTTTTACGAGGCGAACCGTTCGGCGGGTCTCCTCCAGCGGGGTCCCTTCTTCTTTACAACTTA
GGCTGCTGTTCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTT
CATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC
CCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCC
GATATTTACCAATATAGGGCGCCCGCCTTCGGATGGGGATACAACCAAAGGGGGACTCCCTTACTAT
AAAAAAAAGGAGGGGGCCCCCTTCTACGGGGGGGAAGTAAACCAAAGAGGGGTTTCCCCTA
TAAAGT

h42

ATCTTTCCGTGGGACACGGTTCGGTGGGTCTCAACCCAGGTGTTCCCTTCTTTTTTTAAACTTAG
GGCCTGGTTCCTGAGGGGGAAACTCAGTAGACAAGGTTACTTTAACTCGCTTCTGTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACCC
CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCCG
ATATTTGCCAATCTAGGGCGCCCGCCTTTGGATGGGGATCCAACCGAAGGGGGGTTCCCTTATTTTA
AAAAAGGGGGAGGCCCCCTCTCTCTACTCGGGGGAAACAAAAAAAAAAGGGGGGTTATCTTTAAT
AAGT

h43

AATACTTCGAGGcAACGGTTCGGTGGGTCTCCTCAAGGGGGGACCCCGTCCCCCTTTCCAACTGAG
GCGGGTGGGCCTGGGGGAAAAAACGGAAGAGTGGGTTCCCAACTCACCCGGCGGGGCCTTTTAC
TTCGTTCTTCCCTTCACTGCAGCCCTAGTCTTAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAAGCCCT
AACAACCCACTAGTTATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACAACACTTTCAAAGAT
CTATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGA
CCCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTT
CCGATATATGCAAATATAGGGCTCCTGCCTTTGGATGGGAAACAACCAAAGAGAATCCCTTTACTT
TAAACAAGAAAGAGGTCGGGTTTAACTACCTGAAAGCACTAGAAGCGATGCCAGTGTTTCCCTTACT
AAAGT

h44

CATATCCGAGGCGCACGGCTCGGTGGGTCTCCCCCGCGGGGTTCCCTTCCCTTTTTACAACTTG
GGCGCCCGTTCCTGAGGGGGAAACTCAGGAGATAGGTCCACTAAATTACACTTCTGTGCATTTCACT
TCATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGTTATAGACCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGACCTA
ACAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATC
TATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGAC
CCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTC
CGATATTATCCAATCCAGGGGCCCGCCTTTGGATGGGAAAAACACAGAAAGGGAGCCTCCTTACAA
AAAAAAAAAAGAGGGGGCGGGCTTTCTACGGGGGGGACTAGAGCACCCCCCGGTGTGTTTTTTTT
TTAAGT

h45

CCTACTACTGGCGAAACCGCTCGGTGGGTCTCCACCAGCGGGATTCCCTTCCCTCTTAAAAACTGG
GGCGGGGGTGCCTGGGGGGGAAACTCAGTAGAGTTGGTTACCAAATTACGCTTCTGTGCATTTCACT
TCGTTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGTTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGATCTA
ACAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATC
TATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGAC
CCCTGACAATTACACACCTGCAAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTC
CGATATTTGCCAATACAGGGCGCCCGCCTTTGGATGGGAATAAAACCAGAGGGGTACCTCCTTACTT
TATAAACCAAGAAGGGCCCCCCTCCTACCGGGGGGACTAGAACCCCCGAGGGGGTTTTTTTTTTT
TTTAGT

h46

ACTTATACTAGCcGAAGGGCTCCCTTGGGTAAAACCAGGGGGAGTCCCTTCCCTTTTTACAACTGG
GCCCGGGCTCCCTGGGGGGGAAAAAAAAAAGAAATTTTCCCTTTTTAATAAAAAGCCGCGCCCCCTC
GGGGGGTAAACCAAAAAAGTTTTCTTTTTTAAAAAAGGGGCCGCTCTCTTGGGGAAACAAACCA
AAACAACCCTTTTTTATTCTATCTAACCGCCCCCCCTTCCTTTTACCCCAACAACACTTTCAAAGA
TCTTTTAGGGGTGATCATCCTCCTAGGCTTATAACTCACAAAAGATTTATTCTTTCCAGACAAAACCTGG
GACCCCTGACGATTACACACCTGCAAACCCACTCTACTCTATCACACATCAAACCAGAGTGATATT
TTCCGAAATTAGCAAATCCCACGCCCCCCCTTCTGAATGAGAAAAAAACGATTTGTTTTTTTTTTACT
TAAAAAAAAAAGAAGATCTTTTTTAACTACTTTGATAAACTAGAAAAAAAAGGCGCGTTTTTTTTTTGTT
GAGT

h47

ACCTATCCGGGGCGAAACGGCTCGTGGGGGTTAACCAAGGGGGGTCCCTCCCTTTTTAAAACTGG
GGCCGCTCCCTCTGGGGGGGAAAAAAGGGGGGGTTTTTCTCATATAAAAAAAGGGCGGGCCTCC
TTGGGTCTTCCAACCAGAGGGGCCCTcTTTTTAGTAAAGGGGGCCGTTTTCTTCGGGAAAAAAA
CAAAAAACCCTTTTTTTTTTAAAAAAGGGGACCATAATTCCTTTTACCCCAACAACACTTTCAATGA
TCTTTTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTAGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTG

ACCCCTGACAATTACACACCTGCAAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGACTT
TCCGATATTTACCAATCCAGGGCGCCCGCCCCGGATGGAAAAAAAAACGGGAGGGTTTCCTTTAC
TTAAAAAAAAAAAAACGACCCTTTAACTACTTTGGAAAAGTAGAAAAGAAGAGGGGTTTTTTCTTTTA
AAAGT

h48

ATCCCCGCGACGCGAAGGGTCTGTGGGGGAAAACCAAAGGGGGCCTCCCCCCCCAAAAAATTT
GGGCCCCCTTTTTAGGATCCAAAACAAGGGGTTTTTTTTTTTTAACTGCTTTCCTTTCACTT
CATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC
CCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAATGATACTTTCC
GATATTAACACATATAGGAAGTCCACTCTGGTTTGGTGATACCACCCAAGGGGTTTTTTTTTACTTAAT
AAAATTGGGACTTTCCCCTCACTACTTCGAGATTCTGAATCCCCCTATCCTTCTCGTTTGTGATATTG
T

h49

ATATTACCGTGGCGCACCGCTCGGTGGGTCTCCTCCCCGATGCTCTTTTCTTTTTTACAACTTAG
GTTGTGCGTCTGAGGGGGACCTCAAGTAGACAAGGTTCCTTAACACGCTTCTGTGCGTTTCACTT
CATTCTTCCATTCATCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC
CCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATTTCCC
GATATTTGCCAATCTAGAGCCCCCGTTCTGGATGGGATAAAACAGGGGGGCGGGAGTCTTTACTAT
AAACAAACAAAAGGCCCCCCCCCCCCCCCGTGGGAGGTGTGGGCAAAAAGAAAGGGTGTGTTTATA
TAATGT

h50

ATCTTCCCTGGTCGGCCTCGCTCTTCTCCCCCGCCGCCCCCTCCCTCCCCCGCCACATATT
TTCTTTCGTGGGCGCCCCACTATAGTATGGTCTCCCATCAAGGACCACTCTTACAATGATGATATT
CGTAGTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAG
GAGAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATT
GTGCGGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAACGTCGGGTCGTATCAGGTAAGGATAAATTT
GATGCTTTGTCCAAGATGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGTGGGGATGATGTGAAAG
TTTCTCAGACAATCCCCAATAATAATCTTATTCCCGGGTAAAGAAAATTTTTTTTTTGTGGGGGATTAC
CCACCCAATGCGTTAGGGTCTCTCTAACTACCTTGGAGATATAGAATGCATTCGGTGGGGAAACCC
GAATATTT

h51

AGGAACTTGTACGTGTACCGGGGGAAATTTCTCTATTGTTTCGTTTTCTTtTCGTTTATGGATACGCTTG

GTTTCGTTGATGTGGGCATAGGTCGCAGgTAAAAGCCTAACGACACTCTTCAACATGATGGTATTCCG
GAGTCGTATACATCCCTGCAAGAAGGCTTCCGTTTACGTTTATATTCCTCGTTGACATGTTTATAGAAC
AGTTAATAGGTCCGTAGCCTGGGTTAAATCTACTTCCTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGTG
CGGGTTCGTAGTGTGTTTGTAAACAGGTATTAGTAGCGTGGGGTCCATCAGGTAAGTTTAAATTTAATG
CTTTGTCCAAGATGATCGTGTACGTGGACTCACTGTTTTAATTAAGTGGGGAAGTTGTGAAAGTTTC
TCAGAAAATCCCCCGTAAAAGGTTATTCCCAGATATAGGAGTAACCCGAACTAGAGAAAGTTACTCT
GAAAGGACCTCAGGGGGTGTCAACTACTTCGCGTATGTGGGTTTTATAAGGAGGGGGGAAACCTAA
TAAGT

h52

AGACGTCACGTAAGGTATACTGTATAACAAAATATCTAATGGTATAGTATTAATTTCCTAACCCTCTTTT
GACTGAATCTATAACAAGCAAGGTTAATCCTCGGGGGGGGCTCACACGCTTCTAAATGATGATATTCCG
GTGTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAGGA
GAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGT
GCGGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAACGTCCGGTTCGTATCAGGTAAGGATAAATTTGA
TGCTTTGTCCAAGATGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGTGGGGATGATGTGAAAGTT
TCTCAGAAATCCCCAATAAGTAATTATTCTCCATGTCGAAAAGCATCCCGCACGTTGTTGGGTACTT
CCCAATGTATGTGAGGGGGTGGCGCACTATCATAAGCTATTTTTATTCTAATAAATTTTAGTAATACACA
TACCT

h53

ATCTTTACACGGCGCCCGGCTCGGTGTGGTATAACCAAAGGGGATCCCTCCCCCTTAAAAAAGGG
GTTGAATGAATCCCGCGGTATTGTTTGGCAGGAGGACTTCCTTTTTGACACAAAGTTGTTTTAGGCG
GGGTTTACTGTTCTCCACAGCTAAGTTGGGGGGGAAGAAGGGCGTCCATCCAAATTATGGGTGATCA
AACGCCAAGGTAAGCTCGCGGCAAGGAAAAACAACGGTTCCTTATGCCTTTTTTTTCGACGGAGGCG
GCGCGTCTGCGCCCTTCACTATGCATAAGAAAAGCCAAAGCACCTTCTATTCAATCAGCACCCACGG
AAAGGGTTCGGGTGATAAATAGACGGAACCTTCAACTGAGAACCGATTCCATTTAGGGTTCTGAAGT
GCCCTTGCGAAAAACGGCATTCTTACGGCCATAATTGGTTTTAAAGATATGTTTGTAAATGGTTAA
TAGCCTTTCCAGAATTAATACCTTACTTTCCCCTACTCGTTTTTTGGACTTGGTCGCCGGCTTGATG
ACCAATCAGT

h54

ATCTTTACACGGCGCCCGGCTCGGTGTGGTATAACCAAAGGGGATCCCTCCCCCTTAAAAAAGGG
GCCGCGGGATACCCCAAAGGCGTGAAAAGAAAAACCCCTTGAACACCAAACGGATTTTAATT
CCCTTTTAAAGAAGGGGGCTGCCCCCCCCCCCTAAACAACCCCTATTTTTTTTTTAAATTTTTTTAA
ATTTTTTTTTATAACCCCCCCCTGAAAACCGTTTTTTTTTTTTTAAATGGGTTTTATCAGCGGGAGTAT
ACCTGAGCTCATCATTATTATAAGAAAAATTAATCCGCTTCCCTCTATTATTACCATCATTAGGAT
TTTATTTTTCAATAGAATGAAGCATCATTTTATCTCAGATAGAATTTAGGGCTCCCGTAACTTTTTTTGT

AGCAACAGGATTTACCGGACGAATTATTGGTTCTACGTTTCTTTACTTTTATATGTTTAATTGAATTATT
AACTACTTAAATCCTTTTTCTCTACTCACATTTTGGATTTGAGCAGTAATATTCCGACCAATGAGT

h55

AGTGTGGGGTTTTTCGCGGTGCCTCAGGGGTATGTTTCCTTCTTTCCCCATTCCCCTTGGGAGCGAT
GTCTCCCGGGCTCCTTAGGTTTTAAATTAGGGAAATATCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGT
GGGGTTTTGGGGGAAACGTTGGGCCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGGTCTCCAAGAATATGGAA
AGAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAACAAAATCCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTA
GGGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAA
TAGGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGG
CCTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGATA
GTTATTTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTCCCACTACTCAAATATATTCTGTGCGATCACGTTGTAGGAC
ATAACCTACGT

h56

AGTGTGGGGTTTTTCGCGGTGCCTCAGGGGTATGTTTCCTTCTTTCCCCATTCCCCTTGGGAGCGAT
GTCTCCCGGGCTCCTTAGGTTTTAAATTAGGGAAATATCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGT
GGGGTTTTGGGGGAAACGTTGGGCCCTTAGCGGTTGTAATTGTCCGGGGTCTCCAAGAATATGGAA
AGAATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAACAAAATCCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTA
GGGGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAA
TAGGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGG
CCTTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGATA
GTTATTTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTCCCACTACTCAAATATATTCTGTGCGATCACGTTGTAGGAC
ATAACCTACGT

h57

AGTCTCGTGAGGTTAAGGGGTTTTTGAATAAAATTTTCTTCGAACACATACCCCGCGCCCCGGAATC
CCCCCGACCCCAAGGATTTTAAATGGGAAGACCTCACTCTGGCACTTTGATGTGTGGTGGGGTG
TTGAGCTGGGGGTACGTTATGTACGGGTCGGTTGTAATTGTCCGGGGTCTCCAAGAATATGGAAAG
AATAAAACAAAAGAGATATAAGCCTAGGAGAATAATAACCCCTAACAGATCCTCTACACTGTAGTAGG
GGTATCAAAGATTTTGTACAGTTAGATGGATGCCTAGTGGGTTGTTAGACCTTTTCGTGTATAAATA
GGATGCGAGACTATAGCTAGAGCCTTGAAAGAAGAAGTGAAATGCAAAGAAGCGTGTTAAAGTGGCC
TTGTCTACTGAGAATCCCCCTCAGATTCTAAGTCTGGTCCGATGTATGGGATAGCTGAGAGAGAGTT
ATTTTGTAAATTACAGTACTGCTCCTCCCACTACTCAAATATATTCTGTGCGCTCACGTCGTAGGACATA
ACCTACGT

h58

ATCATTTTGGAGGAGCAACTGTAATTACAAATCTTCTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAGT
TGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTCA
TTCTTCCATTCATCATTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAAAGGGTTCTAACA

ACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTAT
TGGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTACTTAGGGACC
CCGACATTAACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGATTGATTCTTTCCA
CTAATTTAAAAGACCTTGTGATCTACCGCCAGCGAGCTGTACTAGATAGCTGCGTAAGTCTTACTGAC
CTTATTACTGATCGTGACTGGATGAATCCATGCGTCCTACGGGACAAGCGTAGCGCTTTGCCGCATG
CAC

h59

ACATTTGGGAGCAGCAACTGTAATTACAAATCTACTCTCAGCTATCCCATACATCGGACCAGACTTAG
TTGAATGAATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAGGCCACTTTAACACGCTTCTTTGCATTTCACTTC
ATTCTTCCATTCATCATTGCAGCCCTAACTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCCTATATCTCACTTGGGTTTTATTCTTTCCAGACTTATCTTGGACC
CCCGACAATTACTTACCCGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAATGATACATTCC
ACTATTTGAAAGTTCCCCCGGCTGGCTCTGGGGCGATATAAAACCCTGTGGAGGGGAGGTTACTA
TCCGAGCGGCGGCCCTATGTTTCACTATCAATAAAACAACCAGAAAAAAATTTTTTTGAGCACCCAT
GAGT

h60

ACCCATCTGTAGGGAAAGGCTCGGTGGGGTTAAACCAGGGGGTTCTATTTCTTTTTTAAAAAATAGG
CCCCCCTTCCCGGGGGGGGAAAAAAAGGGGATTTTTTTTTTTAAATAAAAGGGGGGGGCTTTTGG
GGGGTAACCCACACAGGAGTTTCTTTTTTTATAATCCATCTCCTATTTCTACGGGAAACACGCCCTA
ACAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGATC
TATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGAC
CCCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATATTTTC
CACTATTTGACCATCCGGGGCTTTGCGCTCCCAGAGGGAGACGCGGAGAATGTGTTTTTTTTATTAT
AAAAAAGCCCACCCCCCCCCCACTACCGAGGGGACCTTTGAAGAGAGGGTTTGTTTAATTTATAA
ACGT

h61

ACTCAAACGTCCGGAGGGGTTCCGGTGGGTGTAAACCACAGGGGTTCTATTCCCTTTTTAAAAAATTG
GGGCGTGTGTTGCCGAGGGGAAAAAAAGGGAGGTTTTTCTCTAAACAAAAAGCGGGGGGTTTCGTT
TGTTTATACCACACATCACTGCTGCTCTTGATATAGTCCATCTCCGATTTCTACGGGAAACAGGGTCA
AACAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTCACCCCTACTACACTTTCAAAGAT
CTATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGA
CCCCTGACAATTACATACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTT
CCACTATTAACAAATCGGGCCCGCGGGTTTGGGGGAGGGAAAAAAACAGGGGGGGGTTTTTTAA
AATAAAAAAATTGGAGGGCCCCGCGCACTACCGAGGGGGTCCAACAGTAAGGATTTTTTTTTTTTTAA
TAAATGT

h62

ACCAACTAGCGTCCGGGTTTGGTGGGATAAAACCAAAGGGTTCTATTTTTTTTTAAAAAAAAGG
GGCCCCCTTTGTGAGGGGGAAACCACAGGGGTTTTTTTTTTTTTAACAATGCTTTGCCTTCACTTC
ATTCTTCCATTCACTGCAGCTCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACCC
CTGACAATTACACACCCACTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAATGATACATTCCA
CTATTATAACATACAGGAACTTCGCTCTGGTTAGGTGATACCACACCAAGGCTTGGATGTTAATGGGG
GTAAGTGCAAGGCTGCCCCACACTACCGCGCGTCTGCTCCCCTAAATGCACTAGCGAGTTCATAC
TGT

h63

TTCCTTACTAGCcCCCCGGCTCGGTGGGTATCAACCAAAGGGGTTCTATTTCTTTTTTAAAACTTGG
GGCCCCCTTTCTGAGGGGAAAAAAAAAGAGAGTTTTTTTTTTTTAAAAAAATGGGGGGGGTTTCACTTC
ATTCTTCAAACATCACTGCAGCCCTAATTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAAC
AACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCTA
TTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACCC
CTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCCA
CTATTAGCCAATCCCGGGCGCCGCCCTCCGGGAGGGAATACCCCGCGGGGGGGGCCCTTTATTAT
TAAAATTCACCACCCCTCTGCACTATCCCGGGGTCCAACATCACCCCGAAGTGGGGGTTGGTTT
AATGT

h64

ACATTACCCAGGGGAACCGTTCGGTGGGTTTACCCACCGGGTCTATTTCTTTTTTAAAACTTGG
GCCCCCCCTTCTGGGGGAAAAAAAAAGGAGATTTTTTTCTTATAACAAAAAGCTGTGGGTTTCACTTC
ATTCTTCCCCCAGGGCTGCTGCTTTTGTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGCTCAAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC
CCTGACAATTACACACCCACTAACCCACTCAACACCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACATTCC
ACTATTTGCCAATCTAGGGCGTCCGCCTTGGGATAGGGATTCACCCACGGGGGCACCCCTTATAAT
AAAAAATTTCGAGGGACCTCCTCACTACTGGGGGGTCCAACAACCCCAAAGGGGGTTTTTTTTATAT
AAAGT

h65

ACATCTACGTGGCGAACGGTTCGGTGGGTCTCCACACCCGGGGTCTATTCCTTTTTTAAAACTTAG
GGCCCCCTTCTGAGGGGGACCTCAAGTAGACAAGGCCCTTTAACACACTTCTTTGCGTTTTCACTT
CATTCTTCCATTCACTGCAGCCCTAGCTATAGTCCATCTCCTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAA
CAACCCACTAGGCATTCCATCTAACTGTGACAAAATTCCTTTTACCCCTACTACACTTTCAAAGATCT
ATTAGGGGTTATTATTCTCCTAGGCTTATATCTCACTTTTGTTTTATTCTTTCCAGACTTAACTTGGACC

CCTGACAATTACACACCTGCTAACCCACTCAACACCCCACCACACATCAAACCAGAGTGATACTTTCC
ACTATTAGCCAATCTAGGAGGCAGGGCTTTGGAAGGGAGCAAGCCCCGGGGCGAGTTCCTTTATTTT
AGAGAAGTGTGAGATACCTCTGCACTATCCGGGGTGTCTATTGAAAAAGAAGAGGGGTGGCAAAA
AAGGT

h66

ATCTTAGCTCCTTCGCTTTGACTTTAATTTCAAAGGAAATGGAATAACTACCTGTTACTTATAGTATTTA
GTTTCGTCAACTAAATAAATACTCGGTGGTAGTCGGTTAAGGACCACTCTTCTTAAAGATGATATTCGAT
GTCGTAAGCATCCCTACAGGATGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAAGAGA
GTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGTGC
GGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTAACGTGAGTCGTATCAGGTAAGGATAAATTTGATG
CTTTGTCCAAGATGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGAAAGGATTTTGTGAAAGTTTCT
CAGACAACCCCAATATTTTTCTCGCTCCCGAATAAAAAAAAAATTTTTTTTTGGGGGGGATTAACCCCC
CCATGTGTTAGGCTCTCCCGCACTACCCGGGAAATATGATATGAGTGCGGTTGAAAAACCCTCAATA
CTT

h67

ATCCTAGCTTGTGCACGTCATGTCTCCGTCCGTTATCACCGAACTTGTAGGTAGAGTCTTTTCGTCTT
AATCCGGGCCGATTAGTACCAGTTTTGTTTCGACCGGATTAGAACcACACTTCTTTATGTTTATATTCCG
GTGTCGTAAGCATCCCTACAGGACGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTAGAGGA
GAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGT
GCGGAAACGTAAAGTGAAGTAAGAGGTAGTAGTTTCGTCGGGTCGCATCAGGTAAGGTTTAAATTTGA
TGCCTGTATATATATTATAAAAAAGATGGGTTCTCCCCCCCCCGGTAAACAAAAATTTTTTTTTTTGG
GGCAAAAACAACCAGGGGTGGCCCCCGCTCCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTGGGGGGGATTATA
CCACCCATGTGTTAGGCTCTCCTGCACTACTCGGAGAACCAGATGTAAACGTGGTCGGAACCCCCCT
CATACTT

h68

GTTTCCTTTTCAAGCCGCCGGGGGGGGTCCCTTTTCGTAAAGCCTCTAGAAGTCTATATGAATCCA
AACTCCCGAATCCCCCCTGGTGAAGGCTAAGCTGTAGGATCTTAACAGAACCCGATATGATGATATT
CGGATGCTGAAATATCTCTGTAAGAAGGCTTCCGTTTATAGTTATATTCTCGTTCACATGTTTATAAA
ACAGGTAACAGGTCCGTAGTCTGGGTTGAATTTACTTCGTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTG
TGCGGGGTAGTAGTGTGTTTGTAACTGGTATATGTAGCGTGGAATTCTAATAGGTAAGTTTAAATTTAAT
GCTTTGTTGTAGATTCTTGTGTACGTGTACTCACTGTTTTAATTATAATGGGGTAGTTGAGAAAGTTTT
TCATAAAATCCCCGTAATGGGGTTATTCCCAGATAAATGAGTGAACCGAAGTATAGAAAGTTATTCT
GAAAGAATTCGATGGTTTGTACACTACCTCGCATATATAGTGTGTATATCGTTGGGGAAACCCGCATG
CACT

h69

AAGTTGGAAGGTCGTCATGTTGGGGACTGATCCGTCCTCAAGACCCTGTTTAGCGATACAAATTGG

GACCTGGGAATCGTATGTTGAGTTTTTGAAGGGGAGGCTCGGTGACAGGCGTCGAGGTGCTGTCA
TTTGGATTCGTATATATCCCTGCAAGCAGCCTTCCGTTACAGGTTCTACTCCTCGTTGACATGTTTTTA
GGACAGTTATCAGGTCCGTAGCCTGGGCTAAACCTACTTCCTTAGCTCCCACACTGTTCCGGTGGTA
TTGTGCGGGGTAGCAGTGTTTTGTCACTAGTATTTGTTGCGTGGAGCTCTATCGGGTAAGGTTAAATT
TAATACGTTGTTGTAGATTCTCGTGTCCGTGTACTCACTGTTTTAATTATTATGGGGTAGTTGAAAAAA
TTTCTCAGAACTCCCCGTAATGGGGATATCACAGAAACATGAGAGAACCGCAGTAGAGAAAGTTA
TTCTGGAAAGGCCCCAGGGTTTATCCTACTACTCCGCGTGCATTGCGTGAGTGAGGTGTGGCGAACC
TAACCTACT

h70

AGAACGGATAGGAGATGTCTCAAGTGGATTCTCCCGGATGATAGTCGTCAGAGGCTTTTCGAGTGT
GGGACCGGCGTATGAGTGAATGTGACAGATTGCATGGCTACAATTGCAGGCGTTGATCCTCTTcacTT
CTTTAAGGGAAAAAGAAAAAGACCACTACTCACCGGTGCGGGGGTAACACTATCCAGTTCTCAACCG
TGAAAAAGGCCAGGTTCTCAGCTCTGGCTGAACCAAGCAGGGCAGCACTACTACTGGGAAGCCTGC
GTTTCATCTACAGGTGATGCAATTGGAGCCCTGTGTCACGAGCAAGTGGTGGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTACGCCCGCCGCGCTCTCCCCCTTCAAGCGCACACGAAAGACTCAACCAGAGA
GATGTGTTCAAAAAATATTTTTTTATACACACCTTATTCTCACGCGCACCCACACGTGCTGTCTATATA
TTTATTGTATAATTACAGTACTGCTCCTCCCACTACTCCATACTCCAACCAACGAGCTTAATATTCCGA
CCAATCAGAGT

h71

ATTTTTCCCGGAAGGACCGGTGGAGTTCCTTTCTATTCTATTCAAGTCGCCATAAGTATGACTT
CTGCTGAATCGTATGTTAGGGTTTACTAATAACAAGTCGCATAACAGGCGCTCTAATGATGTTATTCG
GTGTCGTAAGCATCCCTACAGGAAGGCATCCGTTTATAGTAAACTCCTCGTTGACATGTTTGAAGA
GAGTCGATAGGTATGTAGCCTGGTCTGAATCAACTTACTTAGCTCCCTCACTGTTCCGGTGAAATTGT
GCGGAAACGTAAAGTATGTAAGAGGTAGTAGTAACGTCGAGTCGTATCAGGTAAGGTTAAATTGGA
TGCTTTGTCCAAGATGATCGTGTAGATTGACTCACTGTTTTAAGGAAAGTGGGGAAGATGTGAAAGTT
TCTCAGATAATCCCCGTAATAAGATTATCCCGGATATATGAGTGAACCGAAAATAAGAAAGTTATTC
TGAAAGAACCTCAGGGTTGTTACACTACTCCGCATATATTGTGTGTAAGGTGTGTTAAAAAACCCCC
TACGT

CONCLUSIÓN GENERAL

En estudios de genética de poblaciones, la utilización del marcador molecular adecuado según el tipo estudio a realizar es un requisito importante para la obtención de resultados que resuelvan de manera precisa la pregunta que se hizo. Así, si se pretende realizar estudios para evaluar las consecuencias que la perturbación de un habitat tienen sobre la variabilidad genética de las poblaciones en un tiempo reciente (<200 años), los microsatélites representan una herramienta óptima. Sin embargo, con el ADN mitocondrial también se pueden evaluar esas consecuencias pero en un tiempo evolutivo mayor. El análisis e interpretación de los resultados con uno u otro marcador debe basarse en el poder de resolución de éstos.

Las librerías de microsatélites, por su reciente auge, aún son caras para realizarlas y los cebadores deben ser específicos para la especie de estudio y se deben de utilizar varios pares de éstos para obtener mejores resultados (>10 pares), lo que limita su uso; aunque actualmente con mayor frecuencia se han estado describiendo librerías de microsatélites para diferentes organismos. Por el contrario, para el ADN mitocondrial existen cebadores universales, lo que permite utilizarlo en diferentes grupos taxonómicos y con un par de primers se pueden obtener buenos resultados, aunque la secuenciación es más delicada que para los microsatélites.

Por la problemática biológica actual, es decir la amenaza de muchas especies del planeta, es necesario hacer estudios dirigidos a resolver de manera rápida y eficaz los problemas actuales de perturbación antropogénica del habitat. Por lo cual, se debieran conjuntar estudios tanto con marcadores mitocondriales como nucleares (*i.e.* microsatélites) para poder tener un panorama más amplio de toda la historia de la población. De esta manera, las acciones de conservación podrían estar dirigidas a proteger los remanentes de aquellas poblaciones que han sido ricas en diversidad genética, para tratar de recuperar esta diversidad o evitar que se pierda; y para las poblaciones genéticamente poco diversas, evitar que la perturbación afecte sus niveles de diversidad, porque podrían disminuirlos a tal nivel que las lleven a la extinción.

Finalmente, hay pocos estudios sobre genética de poblaciones de roedores, por lo que el presente estudio representa una gran contribución pues se realizó en sitios donde la fragmentación del habitat se sabe que ha afectado los niveles de abundancia de la especie. Por

lo que sería de gran interés evaluar el efecto de esta fragmentación en los niveles de diversidad genética actuales

Creemos que debido a que existen varias técnicas moleculares,, aunque ninguna de ellas es ideal (Müeller y Wolfenbarger 1999), es necesario tomar en cuenta la finalidad y la resolución genética deseada, así como los costos, antes de elegir una técnica. Pero esta argumentación sobre la selección de los marcadores moleculares no la has derivado de tu revisión.

BIBLIOGRAFÍA

Achard, F., Eva, H. D., Stibig, H. J., Mayaux, P., Gallego, J., Richards, T. y J.P. Malingreau. 2002. Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forest. *Science* 297: 999-1002.

Ceballos, G. y G. Oliva. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 985 Pp

Dirzo, R. A. Aguirre y J.C. López. 2008. Diversidad florística de las selvas húmedas en paisajes antropizados. *Investigación* 1: 17-22-

Eguiarte, L.E. V. Souza y X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. Secretaría del medio ambiente. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 592 pp.

Fitzpatrick, B.M. y H.B. Shaffer. 2007. Introduction history and habitat variation explain the landscape genetics of hybrid tiger salamanders. *Ecological Applications* 17(2): 598-608.

Hurst, G.D. y F. Jiggins. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society: B.* 272: 1525-1534.

Masera, O.R., M.J. Ordoñez y R. Dirzo. 1997. Carbon emissions from Mexican forests: current situation and long-term scenarios. *Climate Change* 35: 265-295.

Suunucks, P. 2000. Efficient genetics markers for population biology. *TREE* (15): 199-203.

Withmore, T.C. 1991. Invasive woody plants in perhumid tropical climates. In: *Ecology of biological invasions in the tropics*. ed Ramakrishnan, P.S. pp. 35-40. International Publications, New Delhi.