



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

FILOGEOGRAFÍA DE *Neotoma leucodon* (RODENTIA, CRICETIDAE).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. YIRE ANTONIO GÓMEZ JIMÉNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Livia Socorro León Paniagua
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Joaquín Arrollo Cabrales
Instituto Nacional de Antropología e Historia, INAH
Dra. Ella Vázquez Domínguez
Instituto de Ecología, UNAM

CD.MX. ABRIL, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

FILOGEOGRAFÍA DE *Neotoma leucodon* (RODENTIA, CRICETIDAE).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. YIRE ANTONIO GÓMEZ JIMÉNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Livia Socorro León Paniagua
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Joaquín Arrollo Cabrales
Instituto Nacional de Antropología e Historia, INAH
Dra. Ella Vázquez Domínguez
Instituto de Ecología, UNAM

MÉXICO, CD.MX. ABRIL, 2018



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/348/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de noviembre de 2017**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **GÓMEZ JIMÉNEZ YIRE ANTONIO** con número de cuenta **99105569** con la tesis titulada "**Filogeografía de *Neotoma leucodon* (Rodentia: Cricetidae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA**:

Presidente: DR. LUIS ANTONIO SÁNCHEZ GONZÁLEZ
Vocal: DRA. ROXANA ACOSTA GUTIÉRREZ
Secretario: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Suplente: DRA. SUSETTE SAMI CASTAÑEDA RICO
Suplente: DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de abril de 2018

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MVA/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con él numero de registro 245560.

Al apoyo financiero del proyecto “Filogeografía de la rata magueyera *Neotoma leucodon* (Rodentia: Cricetidae), en el Altiplano Mexicano: Una re-evaluación de su distribución geográfica” PAPIIT-UNAM No. IB-200611 a cargo de la Dra. Livia León Paniagua.

A mi tutora, la Dra. Livia León Paniagua, por todo su apoyo.

Al Dr. Joaquín Arrollo Cabrales y la Dra. Ella Vázquez Domínguez por sus valiosas recomendaciones para mejorar mi tesis.

A la Dra. Roxana Acosta Gutiérrez, Al Dr. Luis Antonio Sánchez González y la Dra. Susette Castañeda Rico por sus comentarios y recomendaciones para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Celia López González y al Dr. Sergio Ticul Álvarez por su ayuda al brindarme muestras para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Luis Gómez y María Antonieta Jiménez, por su amor, apoyo y comprensión que siempre me han brindado. Los amo.

A mis hermanos Jonathan y Alejandro, por su apoyo, por estar en todo momento a mi lado, pero sobre todo por ser mis amigos. Los quiero.

A mi sobrino Santiago por llenar de felicidad mi vida.

A la Dra. Livia León, gracias por su apoyo, cariño, comprensión e infinita paciencia que me ha brindado.

A Giovani Hernández por sus consejos y apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Museo de Zoología por tantos momentos inolvidables.

A mis amigos de siempre por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido estos años. Gracias por su tiempo.

A todos los que me apoyaron en el trabajo de campo: Adrián, Anahí, David, Deborah, Giovani, Héctor, Pablo Colunga, Pablo Cruz y Rosario. Gracias por sufrir y gozar a mi lado durante las salidas.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

Filogeografía.....	1
<i>Neotoma</i>	3
<i>Neotoma leucodon</i>	4
Antecedentes en el conocimiento de <i>Neotoma leucodon</i>	6

OBJETIVOS

General.....	9
Particulares.....	9

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras.....	10
Extracción de DNA y obtención de las secuencias.....	10
Análisis Filogenéticos.....	12
Estructura Filogeográfica.....	13
Diversidad Genética.....	14

RESULTADOS

Análisis de los datos.....	15
Relaciones Filogenéticas.....	16
Estructura Filogeográfica.....	18

Diversidad Genética e Historia Demográfica.....	21
DISCUSIÓN	
Monofilia de <i>Neotoma leucodon</i>	24
Relaciones intraespecíficas.....	24
Estructura Filogeográfica y Diversidad Genética.....	25
Barrera-Filtro del Sur de Coahuila.....	27
Aspectos Biogeográficos.....	28
CONCLUSIONES.....	30
LITERATURA CITADA.....	31
APÉNDICES.....	42

RESUMEN

Neotoma leucodon es una especie que en México se distribuye al sur del Río Bravo y al este del Río Conchos, desde Chihuahua hasta el centro del Altiplano en Aguascalientes. Hasta hace algunos años ésta especie fue considerada como parte de la especie *Neotoma albigula* distintos estudios con marcadores moleculares permitieron separarlas en distintas taxa. Con el fin de conocer más acerca de *N. leucodon* se analizaron sus relaciones filogeográficas en México con base en la variación nucleotídica de 57 secuencias mitocondriales de los genes ND3, RNA-Arginina, ND4L y un fragmento de ND4 (1302pb) generadas durante el estudio. Se llevaron a cabo análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud (MV) y de Inferencia Bayesiana (IB), con los que se confirmó la monofilia de la especie. La red de haplotipos y la SAMOVA no recuperaron estructura geográfica. Se obtuvo una diversidad haplotípica alta y una diversidad nucleotídica baja en *N. leucodon*. Los estadísticos demográficos dieron indicios de expansiones poblacionales recientes.

ABSTRAC

Neotoma leucodon is a species which distribution in Mexico comprises from the South of Rio Grande to the East of the Rio Conchos, from Chihuahua to the Center of the Altiplano in Aguascalientes. Until a few years ago, this species was considered as a subspecies of the *Neotoma albigula*, but now, molecular studies allowed their separation in two different species. In order to evaluate the role of geographic barriers into the genetic structure of *N. leucodon* populations, a phylogeographic analysis including 57 mitochondrial sequences of the ND3, tRNA-Arginine, ND4L and a fragment of ND4 (1302bp) were generated. For these, phylogenetic analyzes of Maximum likelihood and Bayesian Inference were performed to confirm the monophyly of the species. The haplotype network and SAMOVA did not show geographically structured groups. *Neotoma leucodon* shows a high haplotype diversity and low nucleotide diversity. Demographic statistics gave evidence of recent population expansion.

INTRODUCCIÓN

Filogeografía

El estudio de las diferencias fenotípicas y/o genotípicas en poblaciones de una misma especie a lo largo de su área de distribución es conocido como variación geográfica (Futuyma, 1998). A partir de esta se puede identificar patrones espaciales de diferenciación, examinar la concordancia o discordancia entre patrones de variación de diferentes tipos de caracteres, determinar el grado de subdivisión entre poblaciones y generar hipótesis de mecanismos y procesos que expliquen su evolución (Zink, 1986; Futuyma, 2005). La variación geográfica puede originarse por la acción de la selección natural, debido a que este mecanismo aumenta el grado al cual las poblaciones están adaptadas a las condiciones locales. Por lo tanto, presiones selectivas que varíen espacialmente pueden generar respuestas adaptativas que resulten en un patrón de diferenciación geográfica. Sin embargo, mecanismos aleatorios como la deriva génica o patrones diferenciales de flujo genético también pueden causar la aparición de variabilidad (Zink, 1986). Los caracteres morfológicos y los patrones de variación de estos han sido protagonistas en el análisis de la variación geográfica, aunque en algunos casos esta variación puede ser difícil de percibir o simplemente no existir. Es por ello que se ha intensificado el uso de técnicas o métodos moleculares que pueden demostrar la asociación entre la geografía y la variación genética. Con los patrones de variación genética se pueden hacer inferencias sobre diversos procesos evolutivos como la fragmentación de poblaciones o el papel de flujo génico en poblaciones estructuradas (Zink, 1994).

La filogeografía es el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas, teniendo como ejes principales el tiempo y el espacio (Avice, 2000). Es considerada una subdisciplina de la biogeografía (Avice, 1998, 2000), y de la ecología molecular (Vázquez-Domínguez, 2007) e integra conceptos y

técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise, 1994, 2000), permitiendo inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, tamaño poblacional efectivo, secuencias de colonización, cuellos de botella y también para determinar límites entre especies e identificar unidades de conservación (Avise et al., 1987; Avise, 2000, 2008; Freeland, 2005; Vázquez-Domínguez, 2002, 2007). Además, ha permitido hacer propuestas de nuevas especies y grupos intraespecíficos (subespecies, poblaciones, ecotipos), estimar tiempos de divergencia, eventos de vicarianza y dispersión en un contexto histórico (geológicos y evolutivos). Por ejemplo, destacan algunos trabajos en el grupo de los roedores en los cuales se han descubierto al menos 15 nuevas especies en los últimos años. Por otro lado, algunos mostraron resultados interesantes en cuanto a la designación de límites de especies en entidades taxonómicas supuestamente conocidas (Engstrom *et al.*, 1981; Arellano, 1999; Harris y Rogers, 1999; Harris *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2000; Edwards y Bradley, 2002; Arellano *et al.*, 2003; Amman y Bradley, 2004; Bradley *et al.*, 2004; Arellano, 2005; Bradley y Mauldin, 2016).

Parte de la historia del surgimiento de la filogeografía está entrelazada no sólo con el desarrollo de técnicas moleculares, sino del conocimiento de la molécula de DNA mitocondrial (mtDNA), a mediados de la década de los 70. En su trabajo de 1987, Avise y colaboradores describen las características que idealmente debería tener una molécula para análisis filogenéticos, y reconocen que las propiedades moleculares del DNA mitocondrial de los animales se acercan bastante a la molécula ideal (Avise *et al.*, 1987).

El mtDNA es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño (*ca.* 16-20 kilobases), conformada por un total de 37 genes (13 RNA mensajeros, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia), además de una región conocida, en vertebrados y equinodermos, como región control, que controla la replicación y transcripción en la molécula. El mtDNA se ha utilizado como base en la mayoría de los estudios filogeográficos ya que en animales tiene una rápida tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos y usualmente es transmitido de forma materna sin

recombinación (Avise, 1998), lo que permite hallar una gran variación intraespecífica y realizar reconstrucciones filogenéticas.

Dentro del mtDNA se encuentran genes que codifican para diversos complejos y que intervienen en la fosforilación oxidativa. Uno de los más importantes es el complejo I donde se encuentran los genes que codifican para la nicoatinamida adenina dinucleótido de hidrógeno (NADH). Estos genes (ND1-ND6) son considerados genes poco cambiantes, lo que permite, en cierta medida, hacer comparaciones entre organismos del mismo género. Una de las regiones más estudiadas dentro de este complejo I es la comprendida por los genes ND3, RNAt-Arginina, ND4L y ND4, los cuales han sido utilizados en diversos estudios sobre relaciones filogenéticas de un gran número de vertebrados a nivel específico o de género (Dutton *et al.*, 1996; Sites *et al.*, 1996; Hogan *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1998; Tiemann-Boege *et al.*, 2000; León-Paniagua *et al.*, 2007; Ávila-Valle *et al.*, 2012).

Neotoma

Entre la gran diversidad de formas de vida que habitan sobre la Tierra se encuentran los roedores, los cuales han sido foco de atención debido a que prácticamente se distribuyen en todo el mundo y que presentan una gran variedad de formas (Ceballos y Oliva, 2005). Una de las familias pertenecientes a los roedores es la de los Cricétidos, la cual es la más diversa de los mamíferos mexicanos, así como la de mayor distribución geográfica dentro de los roedores. Esta familia está formada por 16 géneros (Musser y Carleton, 2005), dentro de los cuales está el género *Neotoma*, el cual está representado por roedores de tamaño medio los que se distribuyen en partes del sur de Canadá, la mayor parte del territorio continental de Estados Unidos, México y el norte de América Central (Hall, 1981).

El género *Neotoma* fue compuesto por Say y Ord (1825) con una revisión preliminar de Merriam (1894). En 1910 Goldman publicó la revisión más amplia de este género hasta la fecha, donde analizó más de 70 especies y subespecies y propuso tres subgéneros (*Neotoma*, seis grupos de especies; *Homodontomys* y *Teonoma* monotípicos).

Además, colocó a *Neotoma alleni* en un género separado (*Hodomys*), sin embargo, Burt y Barkalow (1942) relegaron a *Hodomys alleni* a un subgénero dentro de *Neotoma*. Carleton (1980) recomendó que *Hodomys* debía ser elevado a su estado anterior genérico y sugirió que está más relacionado con *Xenomys nelsoni*. Hall (1981) propuso que el género *Neotoma* estaba conformado por 22 especies divididas en cuatro subgéneros (*Hodomys Neotoma*, *Teonoma* y *Teonopus*). Posteriormente Musser y Carleton (1993) realizan un trabajo en el que los subgéneros *Neotoma*, *Teonoma*, *Teonopus* y *Hodomys* fueron reconocidos como géneros separados. La propuesta más reciente del género *Neotoma*, es de Edwards y Bradley (2001, 2002) los cuales utilizaron secuencias de DNA mitocondrial (*Cit b*) para evaluar las relaciones filogenéticas dentro del género, obteniendo como resultado el reconocimiento de 24 especies, además de que elevaron cuatro subespecies (*N. albigula leucodon*, *N. floridana magister*, *N. mexicana isthmica* y *N. picta mexicana*) a una posición específica.

***Neotoma leucodon* (Rata magueyera)**

Dentro del género *Neotoma* se incluye a la rata magueyera (*Neotoma leucodon*) la cual es una rata de tamaño grande de color café grisáceo, con tonalidades cafés claras y anaranjadas. Los pelos de su garganta son blancos en su base, la cola es bicolor y con pelo escaso. Las patas son blancas y están cubiertas de pelo con excepción de las plantas que son desnudas. (Hall 1981; Villa-R y Cervantes 2003; Ceballos y Mellink 2005). La especie no se encuentra bajo protección legal en México, y no fue considerada como una especie bajo protección de la NOM- 059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010).

N. leucodon se distribuye en el sureste de Estados Unidos y norte de México (Fig. 2). En la República Mexicana se distribuye al sur del Río Bravo y al este del Río Conchos, desde Chihuahua hasta el centro del Altiplano en Aguascalientes (Ceballos y Mellink 2005; Ceballos y Oliva, 2005). Esta especie se ha registrado en altitudes de 1 000 a 2 700 msnm, en gran parte de la provincia florística de la Altiplanicie, cuya vegetación predominante consiste en matorral xerófilo (Rzedowski, 2006).

En general su distribución se asocia gran parte del Altiplano de México, el cual se extiende entre la Sierra Madre Occidental y Oriental, el límite físico al sur del altiplano lo constituye el Eje Neovolcánico y al norte el punto donde concluye la cadena de las montañas Rocallosas (Sánchez, 1974). Aproximadamente a la altura del Trópico de Cáncer, la planicie de la meseta es interrumpida por un sistema de pequeñas cadenas montañosas que se llaman *Sierras Transversales* porque recorren el altiplano de este a oeste dividiendo la meseta en dos secciones (norte y sur). La porción norte se caracteriza por tener una mayor aridez y uniformidad del relieve. Además de las sierras en el altiplano también se encuentra algunas barreras fisiográficas como el Río Bravo y el Río Conchos, pero la que es de gran interés en este caso es la denominada Barrera-filtro del sur de Coahuila (BFSC), la cual es una barrera física que ha ejercido influencia diferencial en especies variadamente adaptadas a sustratos rocosos contra arenosos o a situaciones áridas frente a ribereñas.

La BFSC consta de tres partes (Fig.1), una parte occidental donde el Río Nazas y el Río Aguanaval se aproximan uno al otro desde el oeste y el sur respectivamente; otra parte que corresponde a la cuenca central de Mayrán, la cual alterna temporalmente entre planicies alcalinas y una laguna superficial alimentada por aguas periódicas de los dos ríos y la tercera parte formada por las cadenas montañosas orientales que se rompen intermitentemente por pasos bajos (Backer, 1956; Baker y Greer, 1962; Peterson, 1976; Schmidly, 1977).

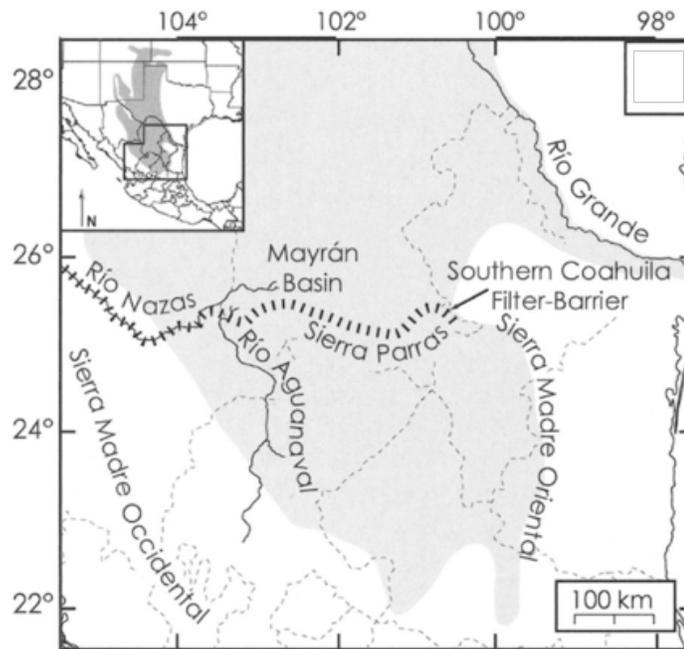


Figura 1. Componentes de la Barrera-Filtro del Sur de Coahuila (Tomado de Hafner *et al.*, 2008)

Antecedentes en el conocimiento de *N. leucodon*

Es importante señalar que hasta hace algunos años *N. leucodon* se consideraba como una subespecie de *N. albigula*, sin embargo, en 2001 Edwards y Bradley confirmaron que se trata de taxones diferentes a nivel específico, los cuales divergieron debido probablemente a la presencia de los ríos Bravo y Conchos (Fig. 2).

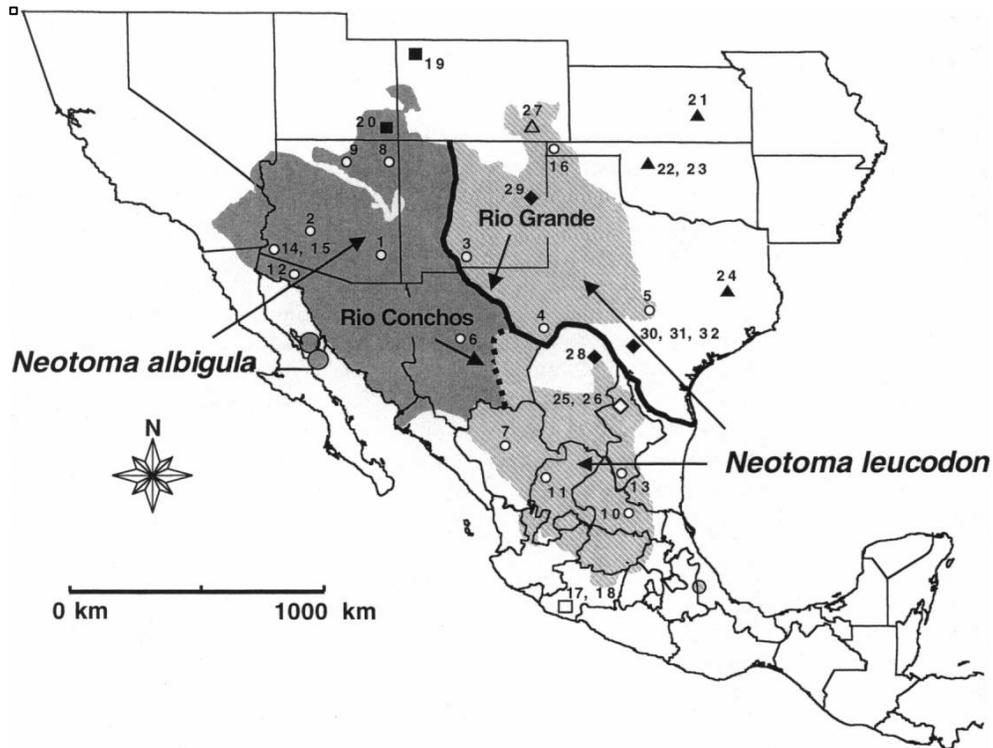


Figura 2. Distribución de *Neotoma albigula* y *N. leucodon*. Se muestran los ríos que sirvieron como barrera para la separación de las especies (Tomado de Edwards y Bradley, 2001). Las figuras indican las localidades de las muestras que usaron para ese estudio.

En la actualidad se reconocen ocho subespecies, de las cuales *Neotoma leucodon mearnsi*, *N. l. melas*, *N. l. robusta* y *N. l. warreni* se encuentran distribuidas en Estados Unidos, mientras que *N. l. durangae*, *N. l. latifrons*, *N. l. leucodon* y *N. l. subsolana* se distribuyen en México (Ceballos y Oliva, 2005; Wilson y Reeder, 2005). Estas subespecies fueron separadas por pequeñas diferencias en medidas craneales y coloración del pelaje y labios (Merriam, 1894, 1908; Allen, 1903; Goldman, 1905; Dice, 1929; Blair, 1939 y Álvarez, 1962).

Esta especie tiene una gran importancia ecológica, debido a las condiciones que generan las madrigueras de las ratas del género *Neotoma* en los ambientes donde se distribuyen son de gran importancia, ya que existe un incremento de materia orgánica y nitrógeno en el suelo en las áreas contiguas a las madrigueras y proporciona refugio a otras

especies (Whitford y Steinberger, 2010). Además de su importancia ecológica, la rata magueyera es considerada un manjar en algunos lugares, siendo un aporte importante de proteína para los habitantes locales y una fuente de ingreso para comerciantes locales (Mellink *et al.*, 1986).

Pese a esto, los trabajos realizados sobre esta especie son mínimos; entre estos se encuentran: el de Mellink *et al.* (1986), sobre el uso de la fauna silvestre en el Altiplano Potosino-Zacatecano; el de Márquez-Olivas (2003), sobre el peso de neonatos en cautiverio y el de Martínez-Calderas *et al.* (2015), sobre su distribución potencial y la densidad de madrigueras en el sur del desierto chihuahuense. En lo que respecta a análisis moleculares *N. leucodon* se ha incluido en trabajos que intentan esclarecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Neotoma* (Edwards y Bradley, 2002; Longhofer y Bradley, 2006), utilizando secuencias de genes mitocondriales como el citocromo b (*Cit b*) y secuencias del gen nuclear alcohol deshidrogenasa (*Adh1-12*). Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que traten particularmente sobre las poblaciones de *N. leucodon*, por lo que la información sobre esta especie continúa siendo escasa. Esta razón aunada al conocimiento de posibles barreras físicas que subdividen efectivamente algunas especies de mamíferos en el Altiplano, son los motivos por los cuales se realiza el presente trabajo, con la intención de colaborar en el conocimiento evolutivo de esta especie y de los posibles patrones y procesos que actúan en el área geográfica donde se distribuye.

OBJETIVOS

General

Analizar la variación genética y geográfica, de *Neotoma leucodon* en México empleando los genes mitocondriales ND3, tRNA-Arginina, ND4 y parcialmente ND4.

Particulares

- Corroborar la monofilia y estatus específico de *Neotoma leucodon*.
- Determinar la estructura genética en las poblaciones de *Neotoma leucodon*.
- Analizar los procesos involucrados en la historia evolutiva de esta especie

MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras (tejido y piel) se obtuvieron de material depositado en la colección de mamíferos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias UNAM. (MZFC-M), del Laboratorio de Vida Silvestre del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, unidad Durango, IPN. (CIIDIR-D) y del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR). De igual forma se realizaron tres salidas a campo (15 días cada salida) para obtener muestras de *Neotoma leucodon* en localidades de los estados de Chihuahua, Durango, Guanajuato, Michoacán y San Luis Potosí. El material fue colectado con trampas tipo Sherman, se taxidermizó y se extrajeron muestras de tejido (hígado, riñón y corazón). Todo el material fue depositado en la colección de Mamíferos del Museo de Zoología (MZFC-M) de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Extracción de ADN y obtención de secuencias

La extracción de DNA genómico de tejido fresco se realizó utilizando el protocolo modificado de extracción basado en la técnica de NaCl Cloroformo: alcohol isoamílico (Mülenbanch, *et al.*, 1989; Apéndice A) y para las pieles se utilizó el kit comercial DNeasy Blood & Tissue, siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante.

La amplificación de los genes ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4 se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrito en detalle por Palumbi (1996), utilizando los oligos propuestos por Engel *et al.* (1998) y Castañeda-Rico *et al.* (2014) (Cuadro 1). La amplificación se realizó en un volumen total de reacción de 12.5 µl (Cuadro 2), para cada PCR siempre se usó un control negativo para descartar

contaminaciones. El programa para la amplificación se muestra en el cuadro 3. Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa preparados con solución TAE 1x y bromuro de etidio, posteriormente los productos amplificados fueron enviados a High-Troughput Genomics Center, Department of Genome Science- University of Washington en donde fueron purificados con Exo-Sap y posteriormente preparados para ser leídos por un secuenciador automático ABI 3730xl.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificar los genes ND3, tRNA-Arginina ND4L y parcialmente ND4.

Primer	Secuencia	Referencia
GLY	5'-TAACTAGTACAAGTGA CTTC-3'	Engel <i>et al.</i> , 1998
ND4L	5'-GCATGCGAAGCAGCCATCGG-3'	Engel <i>et al.</i> , 1998
ND4Lrev	5'-TAGCAGGTTTAAGTTTTGTACATAGTC-3'	Engel <i>et al.</i> , 1998
1Pmlp_F	5'- CAGCTTTCATCCTAGTYTCAGTCC -3'	Castañeda-Rico <i>et al.</i> , 2014
9Pmlp_F	5'- GAAGCAGCCATTGGATTAGC -3'	Castañeda-Rico <i>et al.</i> , 2014
NAP2	5'-TGGAGCTTCTACGTGGGCTTT-3'	Engel <i>et al.</i> , 1998

Cuadro 2. Condiciones utilizadas por reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	7.325 µl
Buffer A	1.25 µl
MgCl ₂ [25mM]	0.75 µl
Primer Forward [10 µl]	0.625 µl
Primer Revers [10 µl]	0.625 µl
dNTPs [2mM]	1.5 µl
Polimerasa taq [5u/µl]	0.1 µl
ADN genómico	1.0 µl
Total	12.5 µl

Cuadro 3. Programa para la amplificación de los genes ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4.

	Ciclos	Temperatura	tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°	1:00
Desnaturalización		94°	1:00
Alineamiento	40	48° ó 53°	1:00
Extensión		72°	1:00
Extensión final	1	72°	7:00

Para la edición y alineamiento de las secuencias obtenidas, se utilizó el programa Bioedit. 7.0.9.0 (Hall, 1999) mediante una revisión visual de estas, además los alineamientos se corroboraron mediante su conversión a aminoácidos con el software Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011)

Análisis Filogenéticos

Se utilizó el programa JModelTest 0.1.1 (Posada 2008) para determinar el modelo evolutivo que mejor se acopla a los resultados, utilizando el Criterio de Información Bayesiano.

Para analizar las relaciones filogenéticas se emplearon métodos de Máxima Verosimilitud (MV) y de inferencia Bayesiana (IB). El análisis de MV se llevó a cabo con 5,000 replicas rápidas de *bootstrap* y una búsqueda minuciosa posterior de la topología con la mayor verosimilitud utilizando el modelo GTR+I+G mediante el software RaxML 8 (Stamatakis, 2014). El análisis de IB se realizó en el programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012) en el cual se emplearon tres cadenas calientes y una fría en el análisis de Monte Carlo Markov Metrópolis (MCMC) en dos corridas de 10,000,000 generaciones,

muestreando arboles cada 1,000 generaciones, el 25% de los árboles iniciales fue tomado como *burn-in*; para obtener la topología final se hizo un consenso de mayoría de 50%. El soporte de los nodos fue determinado por la probabilidad posterior. Adicionalmente se construyó una matriz de distancias genéticas en el Software Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) con 1,000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985) empleando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parametros (Kimura, 1980).

Estructura filogeográfica

Para explorar la estructura filogeográfica de *N. leucodon* se construyó una red de haplotipos utilizando el algoritmo Median-Joining implementado en el software Network 4.6.1.1. (Bandelt *et al.*, 1999).

Para identificar posibles unidades poblacionales o subpoblaciones se implementó el algoritmo SAMOVA (Análisis Espacial de Varianza Molecular) en el Software SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002). El método implementado en este programa detecta indirectamente barreras genéticas y define grupos de poblaciones geográficamente adyacentes y genéticamente homogéneas. Para esto se usaron valores de K desde 2 a 10 con 100 permutaciones. Para probar la existencia de estructura filogeográfica, se calcularon los valores de diferenciación genética (G_{ST}), así como los valores de diferenciación considerando la distancia genética (N_{ST}) con una prueba tipo Pons y Petit, para lo cual se utilizó el programa Permut CpSSR v.2.0 (Pons y Petit, 1996) con 10,000 permutaciones. Los valores de N_{ST} significativamente mayores que los valores de G_{ST} fueron tomados para corroborar una estructura filogeográfica.

Para saber cómo se divide la variación genética entre grupos de poblaciones, entre poblaciones y entre individuos dentro de las poblaciones se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) en el programa ARLEQUIN versión 3.5.1.3 (Schneider *et al.*, 2000).

Diversidad genética

Para realizar los análisis de diversidad genética se empleó el Software DNASP 5.10 (Librado y Rozas, 2009) en el cual se calcularon valores de número de haplotipos (h), diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotídica (H_d), sitios invariables (S_i), sitios segregantes (S_s), sitios segregantes únicos (S_{su}), sitios parsimoniosamente informativos (S_{pi}) y mutaciones totales (M), así como los estadísticos F_s de Fu (Fu, 1997) y R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) para detectar fluctuaciones demográficas en la especie, y en las subespecies reconocidas. Se realizó la prueba de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) para cada uno de los grupos conformados, donde valores negativos estadísticamente significativo indican una señal de expansión poblacional reciente. Con ayuda del programa ARLEQUIN versión 3.5.1.3 (Schneider *et al.*, 2000), se implementó un análisis de las diferencias pareadas de las secuencias (*Mismatch*) de todos los individuos de *Neotoma leucodon*, así como de las tres subespecies analizadas. Estas distribuciones permiten hacer inferencias de eventos demográficos antiguos (Rogers y Harpending, 1992). También se calculó el índice de *raggedness* (Harpending, 1994), el cual toma altos valores cuando las poblaciones son constantes con distribuciones multimodales. Cabe mencionar que aunque existen cuatro subespecies en México, *N. l. latrifons* no se incluyó en los análisis, debido a que no se obtuvo ninguna muestra.

RESULTADOS

Análisis de los datos

Se obtuvieron 28 muestras de *N. leucodon* depositados en colecciones científicas, de los cuales 21 están en el Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (MZFC), UNAM; cuatro en el Centro de Investigaciones Biológicas del Norte (CIBNOR); y tres en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, (CIIDIR), IPN. Las 29 muestras restantes se obtuvieron en salidas de campo (Apéndice B), realizadas en los estados de Chihuahua, Durango, Guanajuato y San Luis Potosí. Cabe señalar que no se encontraron ejemplares de *N. leucodon* en Michoacán.

El número de muestras analizadas por estados es el siguiente: Chihuahua (10), Coahuila (9), Durango (12), Guanajuato (3), Querétaro (1) San Luis Potosí (13) y Zacatecas (9) (Apéndice B, Fig. 3). De estos nueve pertenecen a la subespecie *N. l. subsolana*; 22 a *N. l. durangae* y 26 a *N. l. leucodon*. A pesar de que se intentó tener representadas a las cuatro subespecies en México, no fue posible encontrar muestras de *N. l. latifrons*.

Se generaron 68 secuencias (1302 pb) de los genes mitocondriales ND3, tRNA-Arginina, ND4L y un fragmento de ND4, de las cuales 57 corresponden a ejemplares de *Neotoma leucodon* y 11 de *Neotoma albigula*. Estas últimas, se añadieron a dos más obtenidas del portal GenBank, una de *Neotoma floridana* y otra más de *Neotoma lepida* (Apéndice c) para utilizarlas como grupo externo en los análisis filogenéticos.

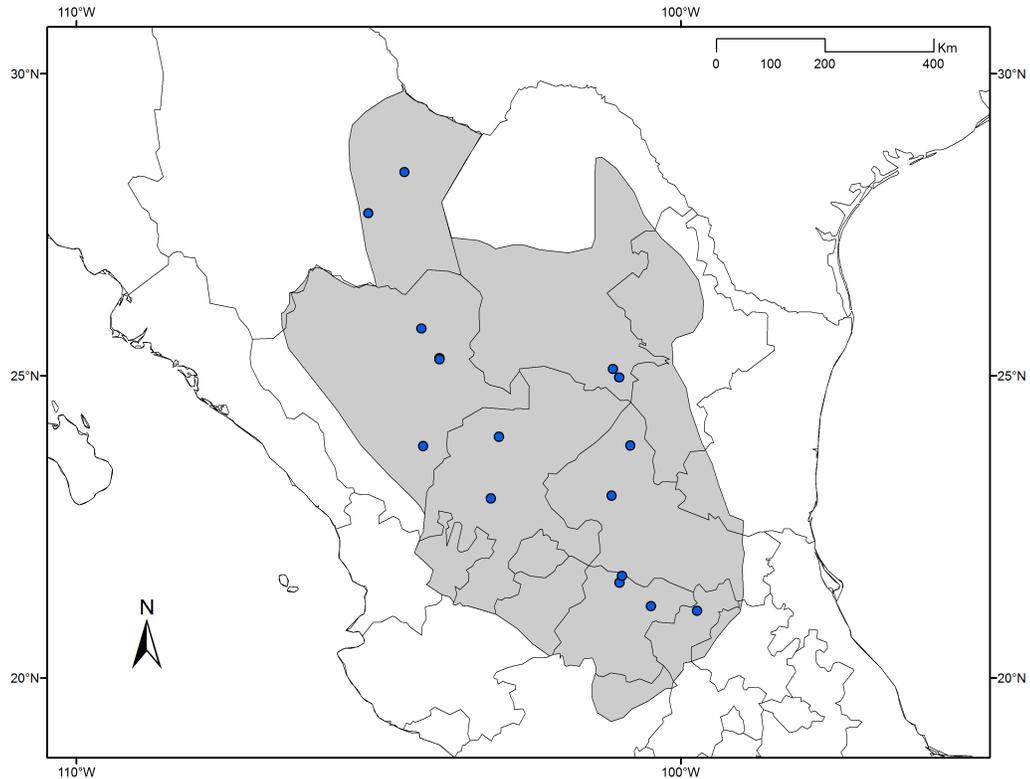


Figura 3. Localización geográfica de las muestras utilizadas para los estudios y área de distribución de *N. leucodon* en México.

Relaciones Filogenéticas

Siguiendo el Criterio de Información Bayesiano, el modelo de sustitución nucleotídica HYK+G fue el que más se ajustó a la evolución de las secuencias (Hasegawa *et al.*, 1985), con una forma de distribución gamma de 0.3030; una tasa de transiciones/transversiones de 3.6685 y una frecuencia nucleotídica de A=0.3508, C=0.2743, G=0.0969 y T=0.2780. Los resultados obtenidos con los métodos de MV e IB muestran topologías muy similares, pero con distintos soportes de rama, siendo los de la Inferencia Bayesiana los más altos (Fig. 4). Ambos métodos apoyan la monofilia de *N. leucodon*, ya que en ambos casos se recupera un solo clado con altos valores de soporte para todas las muestras incluidas. Las ramas de los

árboles muestran poca resolución, debido a que los clados que se forman pueden o no contener secuencias de diferentes localidades, por lo cual estos grupos no reflejan estructura geográfica. Por otra parte, las relaciones filogenéticas señalan que las subespecies representan entidades polifiléticas.

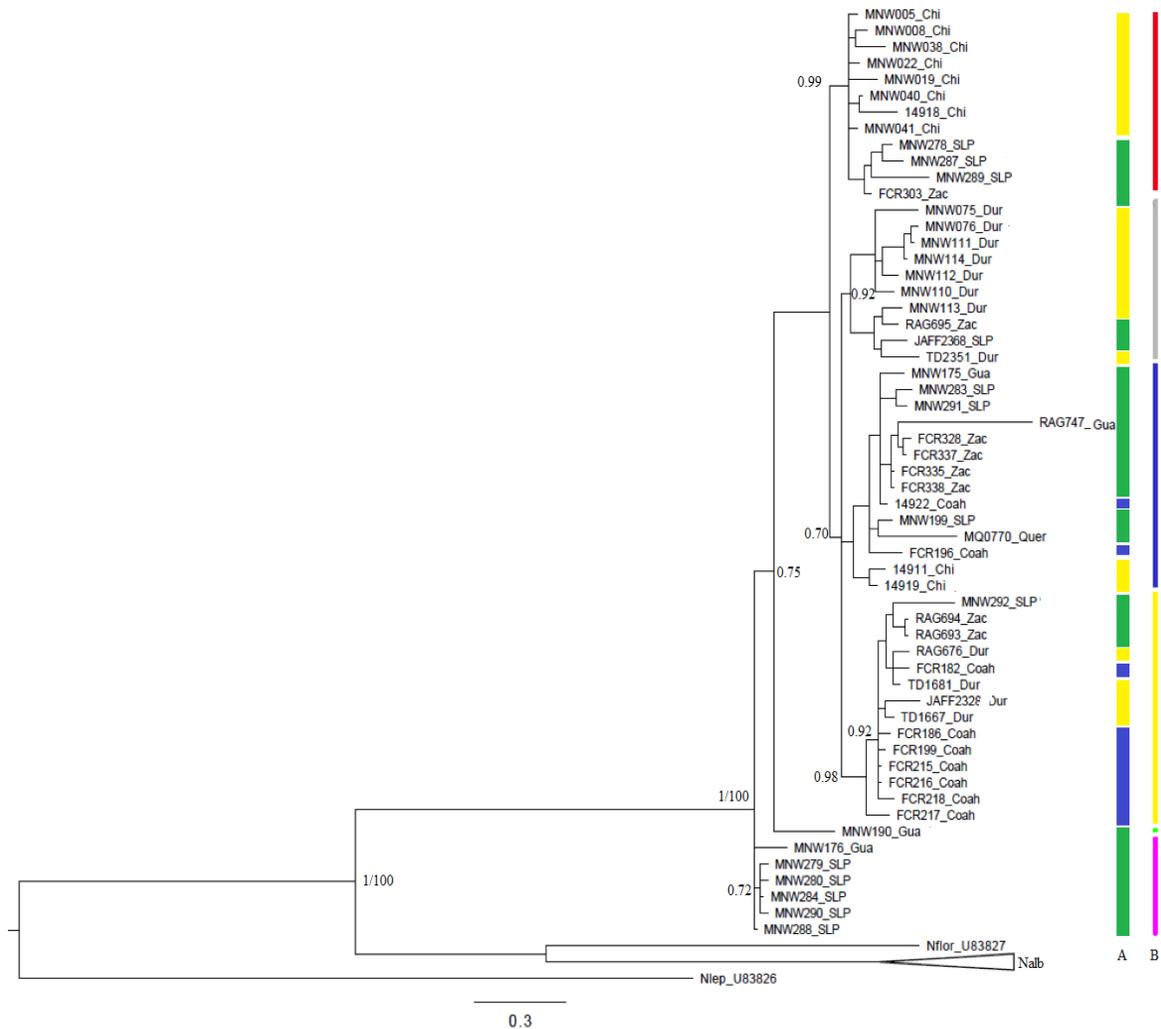


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre haplotipos de *N. leucodon* de los genes ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4. Se muestra el consenso de mayoría (50%) obtenido mediante IB, similar a la topología de MV. Los soportes de los clados están indicados por la probabilidad posterior (IB > 70) y en caso de que el valor bootstrap (MV >70%) se muestra después de la diagonal. Los colores de la barra A representan a la subespecie a la que la muestra corresponde (amarillo= *N. l. durangae*; azules= *N. l. subsolana* y verdes= *N. l. leucodon*) y en la barra B se muestran los clados formados.

También cabe destacar que se obtuvieron pequeños valores de distancia genética entre las subespecies así como entre los grupos formados (Apéndice d), las cuales podrían sugerir que ha pasado poco tiempo desde que se llevó a cabo su diversificación, esto se debe a que los valores de distancias genéticas en ocasiones se van incrementando con el tiempo (Baker y Bradley, 2006).

Estructura Filogeográfica

Las redes de haplotipos de *Neotoma leucodon* obtenidas con los genes ND3, tRNA-Arginina, ND4L y un fragmento de ND4 (1302 pb) se muestra en la figura 5. Se identificaron 57 haplotipos de los cuales 54 son únicos y 3 son compartidos. La estructura que se obtuvo muestra una relación compleja de los haplotipos, en el caso “A” se observa como todas las subespecies comparten haplotipos entre sí, por lo que no existe una segregación clara de los haplotipos entre las tres subespecies analizadas de México. En el caso “B” ocurre algo similar, ya que tampoco existe una segregación en la distribución de los haplotipos cuando en la red se usan a los haplogrupos formados con los clados obtenidos en las filogenias. En cuanto a los pasos mutacionales estos son muy variables ya que pueden observarse haplotipos que van desde un paso mutacional hasta 29.

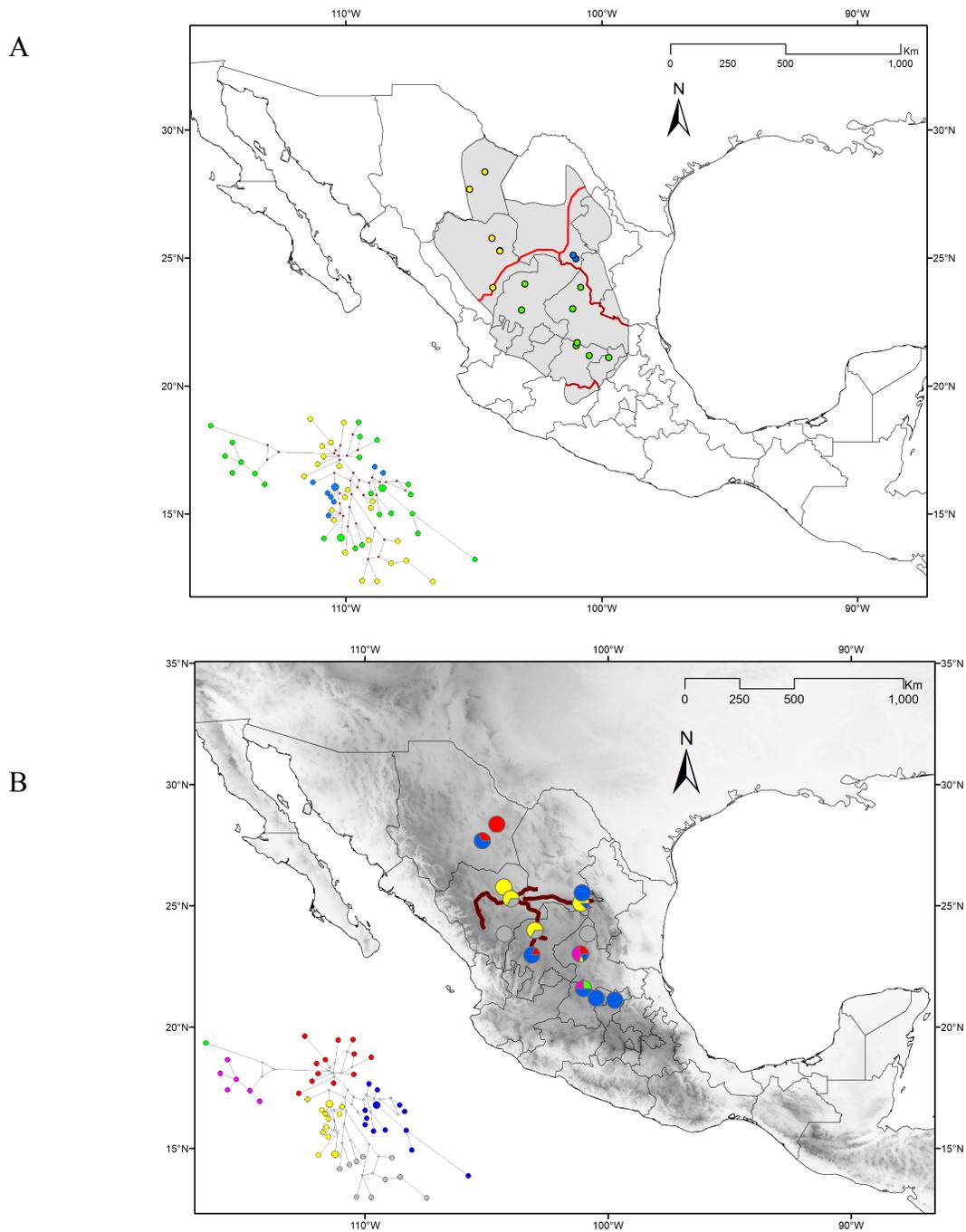


Figura 5. Red de haplotipos: “A” para las subespecies de *Neotoma*. La línea roja muestra los límites entre las subespecies. En verde se muestran los haplotipos correspondientes a *N. l. leucodon*; en azul los pertenecientes a *N. l. subsolana* y en amarillo a *N. l. durangae*; “B” para los clados formados con las relaciones filogenéticas, la línea roja representa la Barrera-filtro del sur de Coahuila.

Los resultados que se obtuvieron mediante el algoritmo SAMOVA (57 secuencias, 1302 pb), indican que el valor más alto de Φ_{CT} se obtiene con K=2 (Cuadro 4) en el cual se forman dos grupos uno con la muestras de la localidad denominada como Gto 2 y el segundo con el resto de las muestras, a pesar de esto en ninguno de los casos (K=2 a K=9) se pudo observar una asociación entre las poblaciones.

Por el contrario, y de acuerdo con los resultados de la prueba Pons y Petit, el valor de N_{ST} (0.321) fue significativamente mayor que el valor de G_{ST} (0.052), lo que indica diferenciación en la estructura geográfica entre las poblaciones de *N. leucodon*.

Cuadro 4. Resultados obtenidos mediante el SAMOVA. La localidad correspondiente a cada población se muestra en el apéndice b.

K	F_{CT}	Poblaciones
2	0.51071	(Chih1, Chih2, Coah1, Coah2, Dur1, Dur2, Dur3, Gto1, Quer, SLP1, SLP2, SLP3, Zac1, Zac2) + (Gto2)
3	0.43599	(Chih1, Chih2, Coah1, Coah2, Dur1, Dur2, Dur3, Gto1, SLP1, SLP2, SLP3, Zac1, Zac2) + (Gto2) + (Quer)
4	0.35498	(Chih1, Chih2, Coah1, Coah2, Dur1, Dur2, Dur3, Gto1, SLP2, SLP3, Zac1, Zac2) + (Gto2) + (Quer) + (SLP1)
5	0.27928	(Chih1, Chih2, Coah1, Coah2, Dur1, Dur2, Dur3, Gto1, SLP3, Zac1, Zac2) + (Gto2) + (Quer) + (SLP1) + (SLP2)
6	0.32677	(Chih1, Chih2) + (Dur2, SLP1) + (Coah1, Quer, SLP2, Zac1) + (Gto2) + (Gto1, SLP3) + (Coah2, Dur1, Dur3, Zac2)
7	0.35494	(Chih1, Chih2) + (Quer) + (Coah2, Dur1, Dur3, SLP1, Zac2) + (Coah1, SLP2, Zac1) + (Gto2) + (Gto1, SLP3) + (Dur2)
8	0.37878	(Chih1, Chih2) + (Quer) + (Coah2, Dur1, Dur3, Zac2) + (Coah1, SLP2, Zac1) + (Gto2) + (Gto1, SLP3) + (Dur2) + (SLP1)
9	0.40583	(Chih1) + (Chih2) + (Quer) + (Coah2, Dur1, Dur3, Zac2) + (Coah1, SLP2, Zac1) + (Gto2) + (Gto1, SLP3) + (Dur2) + (SLP1)

Los valores de Φ_{CT} fueron significativos ($p < 0.05$)

Los resultados del AMOVA se observan en el cuadro 5. La parte superior del cuadro fue realizado con las 3 subespecies en México (*N. l. durangae*, *N. l. leucodon* y *N. l. subsolana*), en este caso se puede observar que el mayor porcentaje de variación está

presente dentro de las poblaciones, lo que indica que las subespecies de *N. leucodon* reconocidas actualmente en México no son genéticamente distintas.

El mismo caso se da cuando se realizó el AMOVA utilizando grupos formados con los análisis filogenéticos (grupo amarillo y gris vs otros), ya que nuevamente el porcentaje más elevado de variación ocurre dentro de las poblaciones y el más bajo entre las agrupaciones.

Cuadro 5. Valores obtenidos por el AMOVA.

Componentes de variación	Porcentaje de variación	Índice de fijación
Subespecies de <i>N. leucodon</i>		
Entre Agrupaciones	-1.15	Φ_{sc} : 0.38107
Entre poblaciones de las agrupaciones	38.54	Φ_{ST} : 0.37398
Dentro de las poblaciones	62.60	* Φ_{CT} : -0.01146
Grupos amarillo y gris vs otros		
Entre Agrupaciones	12.38	Φ_{sc} : 0.32796
Entre poblaciones de las agrupaciones	28.73	Φ_{ST} : 0.41117
Dentro de las poblaciones	58.88	Φ_{CT} : 0.12384

Todos los de valores fueron significativos ($p < 0.05$), excepto *

Diversidad Genética e Historia Demográfica

Los análisis de diversidad genética se corrieron con todas las muestras y con los grupos antes definidos que corresponden a 3 de las 4 subespecies presentes en México (cuadro 6). Para *N. leucodon* se observa que las posiciones nucleotídicas se han conservado en su mayoría y solo 203 pb son sitios segregantes, de los cuales 119 son sustituciones únicas y

84 son sitios parsimoniosamente informativos, registrándose 214 mutaciones. Estos valores de diversidad genética son similares dentro de cada subespecie. En todos los casos, se mostraron niveles altos de diversidad haplotídica y bajos valores de diversidad nucleotídica, los cuales sugieren expansiones demográficas. En lo que respecta a los estadísticos F_s de Fu y R_2 , estos dieron valores negativos y valores positivos pequeños respectivamente, aunque para la F_s de Fu solo fueron significativos para *N. l. durangae* y para las muestras en su totalidad (*N. leucodon*),

Cuadro 6. Valores de diversidad genética y fluctuaciones demográficas de los genes mitocondriales ND3, tRNA-Arginina, ND4y parcialmente ND4 obtenidos para *N. leucodon* y las subespecies en México.

	n	h	Si	Ss	Ssu	Spi	M	dH	π	F_s	R_2
<i>N. l. durangae</i>	22	22	1209	93	52	41	94	1.000	0.01344	-9.750*	0.0730*
<i>N. l. leucodon</i>	26	24	1161	141	83	58	149	0.993	0.01901	-5.514	0.0743*
<i>N. l. subsolana</i>	9	8	1266	36	26	10	36	0.972	0.00760	-1.066	0.0855*
<i>N. leucodon</i>	57	54	1099	203	119	84	214	0.998	0.01637	-33.309*	0.0454*

n= tamaño poblacional, h= número de haplotipos, Si= sitios invariables, Ss=sitios segregantes, Ssu= sitios segregantes únicos, Spi= sitios parsimoniosamente informativos, M= mutaciones totales, Hd= diversidad haplotídica, π = diversidad nucleotídica. * muestra los valores de F_s y R_2 que son significativos.

El análisis de distribución *Mismatch* (Fig. 6) para *Neotoma leucodon* reveló una distribución unimodal con una D de Tajima negativa y estadísticamente significativa, como se espera en poblaciones que tuvieron una expansión poblacional reciente. Por otro lado las pruebas *Mismatch* por subespecies presentaron distribuciones multimodales además de que todas presentan D de Tajima negativas y estadísticamente no significativas, lo que podría concordar con una estabilidad demográfica, sin embargo, todos los grupos mostraron valores estadísticamente no significativos para el índice de *raggedness* indicando que la hipótesis de expansión poblacional no puede rechazarse.

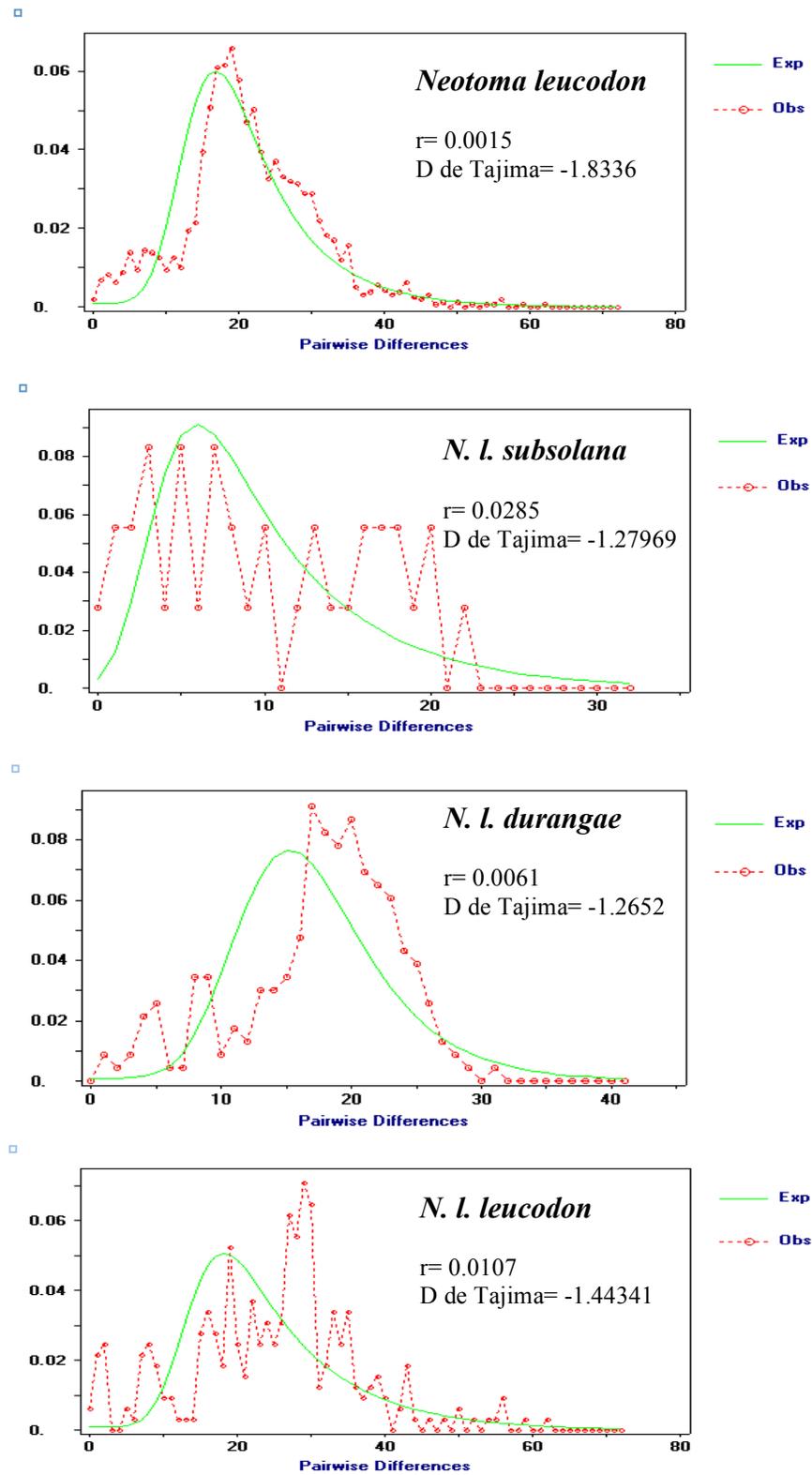


Figura 6. Distribución de *Mismatch* entre los haplotipos de *N. leucodon* y las subespecies, sobre un modelo de crecimiento poblacional. Se muestra también el resultado de la D de Tajima y del índice de raggedness (r).

DISCUSIÓN

Monofilia de *Neotoma leucodon*

Se realizaron análisis para comprobar si las muestras que se obtuvieron de *Neotoma leucodon* corresponden a una sola entidad taxonómica en México. Las filogenias que se obtuvieron con muestras de mtDNA presentaron topologías similares, en donde se confirmó que todas las muestras obtenidas en este estudio conformaron un grupo monofilético en relación con el grupo externo incluido (*N. albigula*, *N. floridana* y *N. lepida*). Sin embargo al tener solo muestras de México, es necesario que se lleve a cabo una corroboración definitiva de la monofilia de *N. leucodon* con análisis que incluyan muestras del resto de la distribución de la especie (sur de los Estados Unidos). Cabe señalar que estos resultados coinciden con lo encontrado por Edwards *et al.* 2001; Edwards y Bradley, 2001; Edwards y Bradley, 2002; Longhofer y Bradley, 2006 y Bradley y Mauldini, 2016, los cuales realizaron filogenias del género *Neotoma*.

Relaciones intraespecíficas

Las relaciones filogenéticas obtenidas en este trabajo mostraron árboles filogenéticos poco resueltos, en donde los clados que se forman y los grupos dentro de estos muestran poca concordancia geográfica ya que en las terminales se presentan secuencias de distintas localidades. Además de que éstas tampoco corresponden geográficamente a la distribución de las diferentes subespecies que habitan en México. Algo similar a esto se puede observar en algunas otras especies de roedores, tal es el caso de *Peromyscus melanophrys*, donde Castañeda-Rico *et al.* (2014) analizan las relaciones filogenéticas entre las especies del grupo *Melanophrys*, para el caso específico de las muestras de *P. Melanophrys* dentro del Altiplano Mexicano, encuentran que no existe una estructuración geográfica de esta región, salvo una diferenciación en la parte de Durango. De igual forma concluyen que las subespecies descritas no corresponden a los linaje genéticos encontrados.

Otro punto que se puede observar, es que a pesar de que *N. leucodon* y *N. albigula* formaban parte de una sola entidad taxonómica hasta hace poco tiempo, éstas no se presentaron como especies hermanas en las filogenias, ya que las topologías obtenidas tanto con MV como con IB el grupo hermano de *N. albigula* es *N. floridana* y no *N. leucodon*, este resultado concuerda con lo encontrado previamente (Edwards *et al.*, 2001; Edwards y Bradley, 2002 y Longhofer y Bradley, 2006). Por otro lado en los trabajos mencionados se incluye a la especie *N. micropus* y está siempre aparece como la especie hermana de *N. leucodon* con la cual tiene una distancia genética de 9.18%.

Un parámetro importante que permite entender, a grandes rasgos, la diferencia entre géneros y especies son las distancias genéticas. En nuestro caso, con los genes ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4 encontramos una distancia genética de 15 % entre *N. leucodon* y *N. albigula*, mismo porcentaje que se presenta entre *N. leucodon* y *N. floridana*, por el contrario, el porcentaje más bajo está entre *N. albigula* y *N. floridana* con un 13 % (Apéndice d). Estos resultados son similares a los que se han publicado en otros estudios (Edwards *et al.*, 2001; Edwards y Bradley, 2002; Longhofer y Bradley, 2006; Bradley y Mauldin, 2016) en los cuales han utilizando el gen mitocondrial Citocromo b. En estos trabajos se reportan distancias genéticas de 11.9 % entre las especies *N. albigula* y *N. leucodon*, un 11.7 % entre *N. leucodon* y *N. floridana* y un 10 % entre *N. floridana* y *N. albigula*. Los valores de distancias genéticas entre las subespecies (1.0 %) y entre los clados (2.0 %) de *N. leucodon* son similares a lo documentado para otros roedores dentro del género, como es el caso de *N. albigula* (2.7 %; Bradley y Mauldin, 2016), lo que muestra que a nivel intraespecífico la divergencia genética es similar a la ya descrita.

Estructura filogeográfica y diversidad genética

Al realizar la red de haplotipos se esperaba encontrar una similitud entre la distribución geográfica a la que pertenecían los haplotipos y los grupos que se formarían en la red o que hubiera una concordancia entre éstos y la distribución geográfica de las subespecies de *N. leucodon*. Sin embargo en ninguno de los casos la red definió grupos geográficamente

estructurados con respecto a la distribución geográfica de las muestras o de las subespecies, solo se obtuvieron redes en donde los grupos se conformaron por haplotipos pertenecientes a distintas áreas de colecta o a distintas subespecies, la misma situación se observó con los árboles filogenéticos. Además esta falta de estructura también se observó cuando se intentaron definir los grupos utilizando el algoritmo SAMOVA, ya que en ninguno de los casos probados ($K = 2 - 9$), se llevó a cabo alguna posible asociación de las poblaciones. En cambio la prueba de Pons y Petit mostro un valor de N_{st} significativamente mayor que G_{st} , indicando que existe estructura filogeográfica a lo largo de la distribución de *N. leucodon*.

En todos los casos analizados con los genes mitocondrial ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4 se mostraron niveles altos de diversidad haplotípica y bajos valores de diversidad nucleotídica, es decir que la posibilidad de que dos haplotipos escogidos al azar sean diferentes es alta, con lo cual la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar sean distintos es muy baja, esto da un indicio de que probablemente se pudo producir un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral pequeña. Esta etapa de crecimiento demográfico tal vez fue suficientemente larga para recuperar la variación haplotípica vía mutación, pero demasiado breve como para acumular grandes divergencias en las secuencias (Avice, 2000).

La teoría de una expansión poblacional también se ve apoyada con los resultados estadísticamente significativos de los estadísticos F_s de Fu el cual muestra valores negativos cuando hay mutaciones recientes en exceso (Fu, 1997) y el estadístico R_2 que bajo un escenario de crecimiento poblacional da como resultado pequeños valores (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Además de los resultados de la D de Tajima, las distribuciones *Mismatch* y el índice de *raggedness* que también concuerdan con los resultados anteriores.

Es importante mencionar que no existe una revisión reciente sobre las diferencias morfológicas y la distribución geográfica de las subespecies de *N. leucodon*. Merriam (1894), Allen (1903) y Álvarez (1962), describieron las subespecies mencionadas en este estudio, basados en morfometría y patrones de coloración. Sin embargo estas descripciones

se realizaron cuando *N. leucodon* representaba una subespecie de *N. albigula*, por lo que en algunos casos las comparaciones que se hicieron para la diferenciación de las subespecies se realizaron con ejemplares pertenecientes a subespecies que hoy pertenecen a *N. leucodon* y en otros a *N. albigula*. Es por lo anterior que resulta indispensable una revisión actual sobre las diferencias morfológicas entre las subespecies de *N. leucodon*, ya que la información genética recabada en este estudio descartaría su existencia, además se ha observado que por lo menos en las muestras de las subespecies que se registraron en este estudio, las diferencias morfológicas y de coloración son poco evidentes (obs. pers.). Además de que es posible que las diferencias en la coloración descritas entre estas subespecies se relacionen con adaptaciones locales a los ambientes donde viven las ratas, por ejemplo se ha observado que en ambientes como campos de lava éstas pueden llegar a ser más oscuras que en otros ambientes (Hall, 1981; Hoffmeister, 1986).

Barrera-filtro del sur de Coahuila (BFSC)

La BFSC ha sido reconocida durante mucho tiempo como una importante discontinuidad dentro del Desierto Chihuahuense. La importancia de la BFSC ha sido enfatizada en los trabajos de Baker (1956), Baker y Greer (1962), Peterson (1976) y Schmidly (1977), ya que ha influido en la distribución de mamíferos en el Desierto Chihuahuense. Un ejemplo de esto es el trabajo de Haffner *et al.* (2008) en donde se reconocen de manera informal como dos especies distintas a las tuzas del género *Crateogeomys* al norte (*C. castanops*) y al sur (*C. goldmani*) de esta barrera. Además se sabe que al menos 14 especies de roedores se encuentran en las proximidades de la BFSC (Hall, 1981). De estas cuatro especies están generalmente al norte (*Amospermophilus interpres*, *Dipodomys nelsoni*) o al sur (*D. spectabilis* y *D. phillipsi*) de esta barrera. Otra especie *Neotoma goldmani* tiene una distribución continua a través del borde de la BFSC, sin diferenciación subespecífica reconocida (especie monotípica). Las ocho especies restantes (*Chaetodipus eremicus*, *C. hispidus*, *C. nelsoni*, *D. merriami*, *D. ordii*, *Perognathus flavus*, *Onychomys arenicola* y *Peromyscus arenicola*) son politípicas y se distribuyen de manera continua a través de la BFSC, así como ocurre con *N. leucodon*, ya que al igual que las especies anteriormente mencionadas presenta una distribución continua por el Altiplano.

Andersen y Ligth (2012), investigaron la estructura filogeográfica de *Chaetodipus hispidus* con mtDNA encontrando 4 nuevos clados que no correspondían con las subespecies reconocidas en ese entonces, pero cuyos límites geográficos coincidían con grandes rasgos geográficos entre los cuales está la BFSC. Cabe mencionar que además de *C. hispidus* las otras especies que se distribuyen de manera continua por la BFSC con excepción de *C. eremicus* tienen subespecies cuyos límites de distribución coinciden con la BFSC (Hafner *et al.*, 2008). En cuanto a *N. leucodon* la BFSC sería el límite de distribución entre las subespecies *N. l. leucodon* y *N. l. durangae* pero con la evidencia genética recabada en este estudio no solo no se pudo reconocer esta barrera como el límite entre estas subespecies sino que como ya se mencionó con anterioridad los resultados indican que las subespecies reconocidas actualmente en México no son genéticamente distintas.

Por otro lado hay que mencionar que la presencia de los Ríos Conchos y Bravo funcionaron como barreras para que *N. albigula* y *N. leucodon* divergieran de forma individual como dos entidades taxonómicas separadas, ante esta premisa se creía que podría pasar lo mismo con las poblaciones de *N. leucodon* al sur y norte de la BFSC, sin embargo se pudo observar con nuestros resultados que la presencia de la BFSC en el área de distribución de la ésta especie no implica una barrera fisiográfica que interrumpa el flujo genético entre poblaciones de la especie al sur y norte de la misma.

Aspectos biogeográficos

En América hay cinco subfamilias, de acuerdo con el registro fósil y de diversos trabajos de ADN se ha podido estimar que la formación de estas subfamilias fue a finales del Mioceno, en un intervalo de entre 4.5 a 15 millones de años (Smith y Paton, 1999). Hibard (1967) sugirió que "la población que dio origen al género *Neotoma* debió separarse de la subfamilia cricetinae en el Mioceno Superior" y Edwards y Bradley (2002), han calculado que el linaje del género *Neotoma* tiene alrededor de 3.9 millones de años, fecha estimada

con base en material fósil durante el Pleistoceno Medio, en lo que hoy es el Desierto Chihuahuense.

Los restos de bosques fosilizados en los depósitos de las cuevas desde el Pleistoceno Medio hasta el Tardío (Harris, 1984) revelan que *N. albigula*, *N. floridana*, *N. goldmani* y *N. micropus* eran constituyentes faunales de lo que hoy es el Desierto de Chihuahua, ya que en por lo menos dos localidades, una al suroeste de Nuevo México y otra en el sureste del estado de Chihuahua contenían restos de estas especies (Harris, 1984), ocupando un área que incluía al menos el centro y el sur de Nuevo México y gran parte de Chihuahua, México. La expansión de algunas de estas especies en lo que hoy es un hábitat inadecuado fue probablemente el resultado de la expansión de las comunidades de plantas forestales en gran parte del Desierto del Suroeste, incluido el Desierto de Chihuahua, durante el período glacial tardío de Wisconsin (Van Devender *et al* , 1987), permitiendo que las poblaciones fueron capaces de expandir su rango desde el Bolsón de Mapimí, que probablemente sirvió de refugio durante los avances glaciales, al suroeste del desierto a través de corredores de bosques del Pleistoceno entre la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental.

Los tiempos de divergencia basados en datos bioquímicos sitúan la divergencia de *N. albigula* de la forma parental en aproximadamente 155000 años B.P., durante el interglacial tardío de Sangamon y la glaciación temprana de Wisconsin (Zimmerman y Nejtek, 1977). La especiación puede haber ocurrido en respuesta a los cambios de vegetación durante la glaciación de Wisconsin.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las filogenias con los marcadores mitocondriales ND3, tRNA-Arginina, ND4L y parcialmente ND4, se corrobora que las poblaciones mexicanas de *N. leucodon* forman un grupo monofilético.

No se encontró estructura genética en las poblaciones de *N. leucodon* en México.

Los resultados de los datos moleculares utilizados en este trabajo indican que no existe congruencia genética y geográfica entre las subespecies de *N. leucodon* en México.

Se propone realizar un estudio mas detallado de las poblaciones de *N. leucodon* incluyendo muestras de subespecies distribuidas en Estados Unidos.

LITERATURA CITADA

- Allen, J. A. 1903. List of mammals collected by Mr. J. H. Batty in New Mexico and Durango, with descriptions of new species and subspecies. *Bulletin American Museum of Natural History*, 19:587-612.
- Álvarez, T. 1962. A new subspecies of wood rat (*Neotoma*) from northeastern Mexico. *University of Kansas. Publications, Museum of Natural History*, 14:139-143.
- Amman, B. R., y R. D. Bradley. 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for a genetic subdivision in *B. musculus*. *Journal of Mammalogy* 85:162–166.
- Andersen, J. J., y J. E. Light. 2012. Phylogeography and subspecies revision of the hispid pocket mouse, *Chaetodipus hispidus* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy*, 93:1195–1215.
- Arellano, E. 1999. Molecular phylogeny of the genus *Reithrodontomys* (Rodentia: Muridae). Ph.D. dissertation, Brigham Young University, Provo, Utah.
- Arellano, E., Rogers, D. S., & Cervantes, F. A. 2003. Genic differentiation and phylogenetic relationships among tropical harvest mice (*Reithrodontomys*: subgenus *Aporodon*). *Journal of Mammalogy*, 84(1), 129-143.
- Arellano, E., F. X. González-Cózatl, and D. S. Rogers. 2005. Phylogenetic relationships of Middle American harvest mice (Genus *Reithrodontomys*), estimated from mitochondrial Cytochrome *b* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37:529-540.
- Ávila-Valle Z.A., A. Castro-Campillo, L. León-Paniagua, I.H. Salgado-Ugalde, A.G. Navarro-Sigüenza, B.E. Hernández-Baños. Geographic variation and molecular

evidence of the Blackish Deer Mouse complex *Peromyscus fuvvus* (Rodentia: Muridae) *Mammalian Biology*, 77 (2012), pp. 166–177.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, L. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review in Ecology and Systematics*, 18: 489–522.

Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York, 511 pp.

Avise J.C. 1998 The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371–379.

Avise, J. C. 2000. *Phylogeography*. Harvard Univ. Press, Cambridge. 447 pp.

Avise J.C. 2008. The history, purview, and future of conservation genetics. In: Carroll SP, Fox CW (eds) *Conservation biology: evolution in action*. Oxford University Press, Oxford, pp 5–15

Bandelt, H-J., Fordter, P., Röhl, A. 1999. Median Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

Baker, R. H. 1956. *Mammals of Coahuila, México*. University of Kansas Publications, Museum of Natural History, 9:125-335.

Baker, R. H. y J. K. Greer. 1962. *Mammals of the Mexican state of Durango*. Publications of the Museum, Michigan State University Biological Series, 2:25-154.

Baker, R. J., Bradley, R. D. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*, 87, 643-662.

- Blair, F. W. 1939. New mammals from Texas and Oklahoma, with remarks on the status of *Thomomys texensis* Bailey. Occas. Papers Mus. Zool., University of Michigan, 403:1-7
- Bradley, R. D., D. S. Carroll, M. L. Haynie, R. M. Martinez, M. J. Hamilton, and C. W. Kilpatrick. 2004. A new species of *Peromyscus* from western Mexico. Journal of Mammalogy, 85:1184–1193.
- Bradley, R. D., M. R. Mauldin. 2016. Molecular data indicate a cryptic species in *Neotoma albigula* (Cricetidae: Neotominae) from northwestern México. Journal of Mammalogy. 97 (1): 187-199.
- Burt W. H., Barkalow F. S., Jr. 1942. A comparative study of the baculum of woodrats (subfamily Neotominae) Journal of Mammalogy, 23:287–297.
- Castañeda-Rico, S., L. León-Paniagua, E. Vázquez-Domínguez, A.G. Navarro-Sigüenza. 2014. Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: the *Peromyscus melanophrys* species group. Molecular Phylogenetics and Evolution, 70(1): 454-463.
- Carleton M. D. 1980. Phylogenetic relationships in neotomine–peromyscine rodents (Muroidea) and a reappraisal of the dichotomy within New World Cricetinae. Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan. 157:1–140.
- Ceballos, G. y G. Oliva (Coords), 2005. Los mamíferos silvestres de México, Conabio/Fondo de Cultura Económica, México D. F., p. 988.
- Ceballos, G. y E. Mellink. 2005. *Neotoma leucodon*. en: Los Mamíferos Silvestres de México (Ceballos, G. y G. Oliva). Editorial Fondo de Cultura Económica. México D.F. Pp 690-691

- Dice, L. R. 1929. Description of two new pocket mice a new woodrat from New Mexico. Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan 203: 1-4.
- Dupanloup I, Schneider S y Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571–2581.
- Dutton, P. H., S. K. Davis T. Guerra y D. Owens. 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5:511-521.
- Edwards C. W., Fulhorst C. F., Bradley R. D., 2001. Molecular phylogenetics of the *Neotoma albigula* species group: further evidence of a paraphyletic assemblage. *Journal of Mammalogy*, 82:267–279.
- Edwards C. W. y Bradley R. D., 2001. Molecular phylogenetics of the *Neotoma floridana* species group. *Journal of Mammalogy*, 82:791–798.
- Edwards C.W., Bradley R.D., 2002. Molecular systematics of the genus *Neotoma*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25:489–500.
- Engel, S. R., K. M. Hogan, J. F. Taylor y S. K. Davis. 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American Sigmodontine Rodents. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 35-49.
- Engstrom, M. D., R. C. Dowler, D. S. Rogers, D. J. Schmidly y J. W. Bickham. 1981. Chromosomal variation within four species of harvest mice (*Reithrodontomys*). *Journal of Mammalogy*, 62: 159-162.
- Excoffier, L., Smouse P. E. y Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.

- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester, 400 pp.
- Fu, Y. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147: 915-925.v
- Futuyma D. J. 1998. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Inc. 751 pp.
- Futuyma, D.J. 2005. *Evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Goldman, E. A. 1905. Twelve new wood rats of the genus *Neotoma*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 18:27-34.
- Goldman E. A. 1910. Revision of the wood rats of the genus *Neotoma*. *North American Fauna*. 31:1-124.
- Hall, E.R. 1981. *The Mammals of North America*. The Ronald Press Co. Nueva York., Vol. 1:XXX+546+79, Vol. 2:VI+601-1181+90.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- Hafner, D. J., M. S. Hafner, G. L. Hasty, T. A. Spredling y J. W. Demastes. 2008. Evolutionary relationships of pocket gophers (*Cratogeomys castanops* species group) of the Mexican Altiplano. *Journal of Mammalogy*, 89:190-208.

- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Harris A. H. 1984. *Neotoma* in the late Pleistocene of New Mexico and Chihuahua. *Special Publications, Carnegie Museum of Natural History*, 8:164–178.
- Harris, D. y D. S. Rogers. 1999. Species limits and phylogenetic relationships among populations of *Peromyscus fuvvus*. *Journal of Mammalogy*, 80:530-544.
- Harris, D., D. S. Rogers y J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus fuvvus* (Rodentia: Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology*, 9:2129-2135.
- Hibard, C. W. 1967. New rodents from the late Cenozoic of Kansas. *Papers Michigan Acad.Sci., Arts, Letters*, 52:115-131.
- Hogan, K. M., S. K. Davis y I. E. Greenbaum. 1997. Mitochondrial-DNA analysis of the systematic relationships within the *Peromyscus maniculatus* species group. *Journal of Mammalogy*, 78:733-743.
- Hoffmeister, D. F. 1986. *Mammals of Arizona*. The University of Arizona Press y The Arizona Game and Fish Department, Tucson, Arizona.
- Kimura, M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111-120.
- León-Paniagua, L., A.G. Navarro-Sigüenza, B.E. Hernández-Baños, J.C. Morales. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 653–664

- Longhofer, L. K., and R. D. Bradley. 2006. Molecular systematics of the genus *Neotoma* based on DNA sequences from intron 2 of the alcohol dehydrogenase gene. *Journal of Mammalogy*, 87:961–970.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Márquez-Olivas, M. 2003. Peso de neonatos de rata magueyera (*Neotoma albigula leucodon*) en cautiverio, del nacimiento a los 40 días de edad, en México. In *Captivity, I., To, F. B., Old, D., y México- Agrociencia*, 37(3), 232.
- Martínez-Calderas, J. M., Palacio-Núñez, J., Clemente-Sánchez, F., Martínez-Montoya, J. F., Sánchez-Rojas, G., & Olmos-Oropeza, G. 2015. Distribución potencial de la rata magueyera (*Neotoma leucodon* Merriam, 1984) y densidad de madrigueras en el sur del desierto chihuahuense. *Therya*, 6(2), 421-433.
- Mayr, E. 1968. *Especies animales y evolución*. Publ. Universidad de Chile en coedición con Ediciones Ariel, S.A., Barcelona.
- Mellink, E., J. R. Aguirre, y E. M. García. 1986. *Estudio sobre la utilización de la fauna Silvestre en el Altiplano Potosino-Zacatecano*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Merriam C. H. 1894. Abstract of a study of the American wood rats, with descriptions of fourteen new species and a subspecies of the genus *Neotoma*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 9:117–128.
- Müllenbach, R., Lagoda, P. J. L. y Welter, C. 1989. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trens Genet.* 5, 391.

- Musser, G. G. y M. D. Carleton. 1993. Family Muridae. Pp. 501-706, *en*: Mammals species of the world a taxonomic and geographic reference (D. E. Wilson y D. M. Reeder, Eds.). 2ª edición. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Musser, G.M. y M. D. Carleton. 2005. Superfamily Muroidea. In: Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference Third ed. (Eds. Wilson, D.E. & D.M. Reeder). pp 894- 1531. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction, 205-247. *en*: Molecular Systematics (D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds.), Sinauer Associates, Inc.
- Peterson, M. K. 1976. The Rio Nazas as a factor in mammalian distribution in Durango, Mexico. *Southwestern Naturalist*. 20:495-502.
- Pons, O. & Petit, R.J. (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256
- Ramos-Onsins, S. E., and J. Rozas, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Rogers, A., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539–542.

- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 432 pp.
- Sánchez, M. A. 1974. Síntesis geográfica de México. Editorial Trillas, México. 265 pp.
- Say, T y Ord, G. 1825. A new genus of Mammalia proposed, and a description of the species upon which it is founded. Journal of the Academy of Natural Sciences, Philadelphia, 4:345–349.
- Schneider, S. Roessli, D. y Excoffier, L. 2000. ARLEQUIN: A software for population genetics data analysis. University of Geneva, Geneva.
- Schmidly, D.J. 1977. Factors governing the distribution of mammals in the Chihuahuan desert region. Pp. 163-192, en: Transactions of the Symposium on the Biological Resources of the Chihuahuan Desert Region United States and Mexico. Sul Ross State University, Alpine Texas, 17-18 october, 1974 (Wauer, R.H. y D.H. Riskind, eds.). National Park Service Transactions and Proceedings Series No. 3.
- Semarnat. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF), jueves 30 de diciembre de 2010.
- Sites Jr, J. W., Basten, C. J., Assmusen, M. A. 1996. Cytonuclear genetic structure of a hybrid zone in lizards of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae). Molecular Ecology, 5(3): 379-392.
- Smith M.F. y Patton J.L. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: Evidence from cytochrome b. Journal of Mammalian Evolution, 6:89-128.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8. A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*.
- Sullivan, J., E. Arellano y D. S. Rogers. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *American Naturalist*, 155: 755-786.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tamura, K Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011 MEGA5: Molecular Evolucionary Genetics Analysis using Maximun Likelihood, Evolucionary Distance, and Maximun Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tiemann-Boege, I., C. W. Kilpatrick, D. J. Schmidly y R. D. Bradley. 2000. Molecular phylogenetics of the *Peromyscus boylii* species group (Rodentia: Muridae) based in mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16:366-378.
- Van Devender, T. R., G. L. Bradley, and A. H. Harris. 1987. Late Quaternary mammals from the Hueco Mountains, El Paso and Hudspeth counties, Texas. *Southwestern Naturalist*, 32:179-195.
- Vázquez-Domínguez, E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. En: Nelson G, JC Day, LM Sportza, J Loucky & C Vázquez (eds.) *Protected areas and the regional planning imperative in North America*: 369-378. University of Calgary Press, Calgary, Canadá.

- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte L, V Souza & X Aguirre (eds.) La ecología molecular de plantas y animales: 441-466. INE/Conabio, México.
- Villa-Ramírez, B. y F. A. Cervantes. 2003. Los Mamíferos de México. Grupo Editorial Iberoamericana. México.
- Whitford, W. G., y Y. Steinberger. 2010. Pack rats (*Neotoma* spp.): keystone ecological engineers? *Journal of Arid Environments*, 74:1450-1455.
- Wilson D. E. y D. M. Reeder (eds.). 2005. Mammals species of the World. A taxonomic and geographic reference. Third edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Zimmerman, E. G. and M. E. Nejték. 1977. Genetics and speciation of three semispecies of *Neotoma*. *J. Mammal.* 58:391-402.
- Zink, R. M. 1994. The geography of mitochondrial DNA variation, population structure, hybridization, and species limits in the Fox Sparrow (*Passerella iliaca*). *Evolution*, 48:96–111.

APÉNDICES

Apéndice A. Protocolo modificado para la extracción de DNA por el método de NaCl y Cloroformo: alcohol isoamílico.

1. Colocar de 30 a 100 mg de tejido en un microtubo limpio
2. Adicionar 410 μL de Buffer de lisis y 90 μL de SDS 10%
3. Incubar a 65° por 15 minutos
4. Homogenizar el tejido en partículas finas con pistilo
5. Añadir 20 μL de Proteinasa K
6. Vórtex por 10 segundos
7. Incube a 65°C por 30-40 minutos
8. Adicionar 200 μL de NaCl saturado (6M)
9. Agitar vigorosamente, volteando a mano durante 10 minutos
10. Incubar en baño de hielo por 10 minutos
11. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos
12. Transferir 500 μL de sobrenadante en un tubo limpio
13. Adicionar 350 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
14. Agitar vigorosamente, volteando a mano durante 10 minutos
15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos
16. Transferir 400 μL a del sobrenadante a un tubo limpio (2 veces con puntas de 200 μL)
17. Adicionar 800 μL (ó 2 volúmenes de lo colectado) de etanol 100% frío*
18. Mezclar un par de veces por inversión

Si se observa pellet DNA:

19. Tomar DNA con una punta de pipeta y transferir a un microtubo 0.6 mL que contenga agua.

Si no se observa pellet DNA:

20. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos
21. Decantar el etanol
22. Secar las muestras y retirar etanol restante
23. Disolver DNA en agua

*El isopropanol se utiliza para precipitar fragmentos difíciles de DNA que son menores de 500 pb o mayores a 4 Kb, en el rango intermedio no es necesario el isopropanol

Apéndice B. Ejemplares secuenciados durante el presente trabajo.

Muestra	Colección biológica	Localidad	Latitud	Longitud
14911 14918 14919	CIBNOR	Chihuahua: Camargo, Ciudad Camargo (Chih1)	27,69	-105,17
MNW005 MNW008 MNW019 MNW022 MNW038 MNW040 MNW041	MZFC	Chihuahua: Camargo, Rancho de las Mesteñas (Chih2)	28,37	-104,57
14922	CIBNOR	Coahuila: Saltillo, 7 Km SE Gómez Farías (Coah1)	24,97	-101,02
FCR182 FCR186 FCR196 FCR199 FCR215 FCR216 FCR217 FCR218	MZFC	Coahuila: Saltillo, 8 Km E y 1 Km N de Buñuelos (Coah2)	25,11	-101,12
JAFF2328 RAG676		Durango: Durango, 5 de mayo (Dur1)	25,78	-104,29
MNW075 MNW076 MNW110 MNW111 MNW112 MNW113 MNW114		Durango: Durango, Nombre de Dios (Dur2)	23,84	-104,26
TD1667 TD1681	CIIDIR-D	Durango: Nazas, 3.5 Km N 0.5Km W, Ejido Lázaro Cárdenas (Dur3)	25,29	-103,99
TD2351		Durango: Nazas, 0.625Km N 0.2Km W, Ejido Lázaro Cárdenas (Dur3)	25,27	-103,99

MNW175 MNW176 MNW190	MZFC	Guanajuato: San Felipe, La Purísima "El muerto" (Gto1)	21,58	-101,01
RAG747		Guanajuato: San Luis de la Paz, 7 km W Mineral de Pozos (Gto2)	21,19	-100,49
MQ0770		Querétaro: Peñamiller, 500 m NW Camargo (Quer)	21,11	-99,73
JAFF2368		San Luis Potosí: El Cedral, 5 Km El Cedral (SLP1)	23,85	-100,83
MNW199		San Luis Potosí: Villa de Reyes, La Loma (SLP2)	21,69	-100,97
MNW278 MNW279 MNW280 MNW283 MNW284 MNW287 MNW288 MNW289 MNW290 MNW291 MNW292		San Luis Potosí: Venado, Ejido EL Salero (SLP3)	23,02	-101,14
FCR303 FCR328 FCR335 FCR337 FCR338		Zacatecas: Fresnillo, Santa Rosa 6.4Km NO (Zac1)	22,97	-103,14
RAG693 RAG694 RAG695		Zacatecas: Francisco Murguía Nieves, Nieves (Zac2)	23,99	-103,01

Apéndice C. Muestras utilizadas como grupo externo en los análisis filogenéticos. Las muestras de *N. albigula* fueron donadas por el CIBNOR, mientras que, las dos especies se descargaron del GenBank.

Espece	Muestra	No. de acceso	Localidad
<i>Neotoma albigula</i>	14431	-	Chihuahua: 1 Km E de Samalayuca
<i>Neotoma albigula</i>	14432	-	Chihuahua: 1 Km E de Samalayuca
<i>Neotoma albigula</i>	14437	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14438	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14439	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14440	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14441	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14442	-	Chihuahua: Ejido Lázaro Cárdenas 39.3 Km SW, Janos
<i>Neotoma albigula</i>	14445	-	Chihuahua: 2 Km NW de La Huachinera
<i>Neotoma albigula</i>	14457	-	Sonora: La estancia
<i>Neotoma albigula</i>	14458	-	Chihuahua: 11Km NE de El Sueco
<i>Neotoma floridana</i>	-	U83827	Desconocida
<i>Neotoma lepida</i>	-	U83826	Desconocida

Apéndice D. Distancias genéticas calculadas con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros (1302 pb).

Especies				
Taxon	1	2	3	4
N. leucodon	-			
N. albigula	0.1529	-		
N. floridana	0.1554	0.1312	-	
N. lepida	0.1916	0.1894	0.1666	-

Subespecies de <i>N. leucodon</i>			
	1	2	3
N. l. leucodon	-		
N. l. subsolana	0.017	-	
N. l. durangae	0.0182	0.0137	-

Grupos					
	1	2	3	4	5
Azul	-				
Rojo	0.017	-			
Amarillo	0.017	0.017	-		
Gris	0.017	0.017	0.017	-	
Rosa	0.025	0.020	0.022	0.025	-
verde	0.030	0.026	0.026	0.030	0.015