

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS

BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Estructura y diversidad genética de

Oryzomys palustris cozumeale de la Isla de Cozumel

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

PRESENTA

RODRIGO RAFAEL VEGA BERNAL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO GRACIAS AL APOYO DE LA BECA DE MAESTRÍA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (181844-CONACYT), DE LA BECA COMPLEMENTARIA DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA UNAM (DGEP) Y DEL PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, ASÍ COMO DE LOS PROYECTOS CONACYT: ECOLOGÍA Y MANEJO PARA LA CONSERVACIÓN DE UNA BIOTA ENDÉMICA INSULAR CRÍTICAMENTE AMENAZADA, Y PAPIIT 243202: HISTORIA Y DINÁMICA DE LAS ÁREAS DE DISTRIBUCIÓN Y DIVERSIDAD DE MAMIFEROS DE AMÉRICA DEL NORTE.

EL COMITÉ TUTORAL QUEDÓ INTEGRADO POR LOS SIGUIENTES MIEMBROS:

Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez
Dr. Daniel Piñero Dalmau
Dr. David Valenzuela Galván
Dr. Alfredo Cuarón Orozco (Tutor Invitado)

A mis amigos

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora... Ella... por haberme aceptado en su laboratorio de buenas a primeras, por su amistad y por estar siempre tan dispuesta a ayudarme con mis dudas académicas o de cualquier tipo.

No se me puede olvidar un gran agradecimiento a los integrantes del Laboratorio de Macroecología. Sin Angélica, Paulina, Anahí, Anahid, Aliet, Susette, Tania, Tania, Rebeca, Irma, Ana, Ana, Gaby, Pilar, Andrés, Fabricio, Héctor y Jorge no hubiera sido tan ameno y agradable realizar este proyecto. Va igual para las personas del Laboratorio de Dinámica de Poblaciones e Historias de Vida, Melly, Mariana, Israel, Eric, Laura, Gisela, Cynthia, Violeta, Nico, Alejandra, Alejandra, Ruth, Belinda, Jordan, Yup...

Por supuesto, agradezco la ayuda siempre incondicional de Gerardo Rodríguez Tapia, nuestro querido técnico del laboratorio, que siempre me sacó de aprietos con la computadora, los programas, trabajo de campo y muchas cosas más de las que ahora ya no me puedo acordar.

Debo agradecer a mis tutores del Posgrado en Ciencias Biológicas Daniel Piñero y David Valenzuela que semestre tras semestre tenían que aguantarse una plática de mis adelantos y que siempre hicieron comentarios constructivos y relevantes para el proyecto. También agradezco a Alfredo Cuarón, nuestro tutor invitado y responsable del proyecto de Cozumel, que siempre estuvo interesado en saber qué sucedía con la genética de *Oryzomys* en la isla así como en el trabajo de campo.

No puedo olvidarme de César, Elisa, Pavka, Héctor, Chucho, Ana Laura, Ivu, Gaby, Pia, Adriana, Sandra e Iris, con quienes pasé momentos inigualables en Isla Cozumel haciendo el trabajo de campo o de puro desmadre. También quiero agradecer a Christopher González-Baca por su gran ayuda en el trabajo de campo. Gracias al Lazy Lizard, no por las averías sino por toda la diversión en el coche más amolado y a la vez más carismático en el que he viajado.

Un Agradecimiento especial a la Comisión de Agua Potable y Alcantarillado del Municipio de Cozumel por permitirnos trabajar libremente en la zona de captación de agua.

Una parte del trabajo se realizó gracias a la ayuda de Fernando A. Cervantes Reza, Julieta Vargas Cuenca, Yolanda Hortelano Moncada y Martha Esteva de la Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM. Ellos me proporcionaron muestras de museo para la parte filogeográfica, me dejaron usar su laboratorio y reactivos y, en particular, Martha dedicó muchas horas de su doctorado enseñándome a extraer ADN de muestras de museo y a hacer la secuenciación de cyt b. También agradezco al Colegio de la Frontera Sur (EcoSur) por proporcionarnos desinteresadamente muestras de Chiapas.

Mis más sinceros agradecimientos a Joseph Cook por recibirme en su laboratorio para hacer una estancia de investigación en la Universidad de Nuevo México. También agradezco a Nella, Lucia, Felipe, Tomás y Cosmo Cook por haberme recibido y mantenido en su casa tanto tiempo. Agradezco también a Fernando, Sarah y a los cuates que conocí en Albuquerque por enseñarme tanto y hacerme pasar un gran momento que a la mera hora resultó ser demasiado corto.

Agradezco a mis papás, a mis hermanos, a mis tíos, a mis sobrinos, a mis primos y a mi abuelita por su cariño incondicional, así como por sus preguntas, dudas y comentarios sobre tantos fenómenos biológicos absolutamente inexplicables.

Una vez más agradezco a mis cuates de toda la vida (sin orden de importancia) Ariel, Beto, Ana, Andrés, Giuseppe, Yoshi, Julieta, Adriana, Ximena, Florencia, Irene, Marcos, Rodrigo, Andrés, Lily, Maia, Tom, Constantino, Gaby, Anahí, Juan Pablo, Alfredo y Larry por apoyarme en las buenas y en las malas con lo que fuera y cuando fuera... ¡¡¡Que aguante, gracias!!!

Índice

	Página
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	
1.1 <i>Islas: aspectos ecológicos y fragmentación de hábitat</i>	3
II. Antecedentes	
2.1 <i>Marcadores moleculares, estructura genética y filogeografía de mamíferos pequeños y medianos</i>	4
2.2 <i>Filogenia y paleobiogeografía de la subfamilia Sigmodontinae</i>	7
2.3 <i>Geología de la isla de Cozumel</i>	8
III. Objetivos	9
IV. Hipótesis	9
V. Métodos	
5.1 <i>Área de estudio: descripción de Isla Cozumel</i>	9
5.2 <i>Sujeto de estudio: características ecológicas de <i>Oryzomys couesi</i></i>	11
5.3 <i>Trabajo de campo y muestras</i>	12
5.4 <i>Extracción de ADN</i>	14
5.5 <i>Microsatélites y electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	14
5.6 <i>Diversidad genética</i>	15
5.7 <i>Estructura genética</i>	16
5.8 <i>Secuenciación de Citocromo b</i>	18
5.9 <i>Análisis filogeográfico</i>	19
VI. Resultados	
6.1 <i>Diversidad y estructura genética</i>	20
6.2 <i>Filogeografía de <i>Oryzomys couesi</i></i>	27
VII. Discusión	30
VIII. Conclusión	37
IX. Bibliografía	38
Anexos	44

Resumen

Las poblaciones de vertebrados en islas se caracterizan, entre otras cosas, por presentar pérdida de diversidad genética, incremento de la endogamia, susceptibilidad a enfermedades y flujo génico reducido. Esto se debe a que en islas se presentan condiciones particulares de limitación de área, bajo número de especies, fragmentación del hábitat y poblaciones, extinciones locales, y eventos de dispersión y colonización. En este trabajo se analizó la diversidad y estructura genética de *Oryzomys couesi cozumelae* (sin. *Oryzomys palustris cozumelae*), una subespecie endémica de la isla de Cozumel clasificada como amenazada, por medio de 5 loci de microsatélites. También, se comparó filogeográficamente a la población isleña respecto a las poblaciones en la península de Yucatán y de Chiapas por medio de la secuenciación de una porción del gene mitocondrial citocromo b. Las muestras de ADN se obtuvieron de 228 individuos capturados en 8 sitios en el centro y 4 sitios ubicados en el N, NW, E y S de la isla de Cozumel. Además, se obtuvieron muestras de ADN de 5 individuos provenientes de Campeche y 5 de Chiapas. Se presentaron altos valores de diversidad genética por locus y en todos los sitios de la isla ($H_{Nei} = 0.689$). La mayor parte de la variación se encontró distribuida dentro de los sitios (97.12%) según un análisis de varianza molecular, aunque un menor porcentaje, pero significativo, se encontró entre las subpoblaciones (2.88%, $P < 0.001$). El flujo génico estimado entre sitios fue alto, pero algunos de ellos presentaron diferenciación genética significativa. Incluso, se presentó una correlación significativa entre distancias genéticas y geográficas. Sin embargo, un análisis de agrupamiento bayesiano indicó que los individuos no pueden asignarse a una u otra población por su composición de alelos. A pesar de que Cozumel puede verse afectado por huracanes, introducción de especies exóticas, perturbación y fragmentación de hábitat, las subpoblaciones de *O. c. cozumelae* no se han visto genéticamente afectadas según lo esperado para especies isleñas. Por otro lado, el análisis filogeográfico mostró que la población de Cozumel presenta varios haplotipos y se encuentra más cercana genéticamente a las de Campeche, pero no forman un grupo monofilético, lo que puede indicar múltiples colonizaciones. Las muestras de Chiapas se separaron en dos grupos más distanciados: un grupo apareció más cercano a las muestras de Campeche y Cozumel, y otro grupo quedó más distante genéticamente y corresponde a las muestras más alejadas geográficamente en la costa del Pacífico e istmo de Tehuantepec. El origen de la población isleña se encuentra en la península de Yucatán, pero es necesario ampliar la muestra continental para dar una explicación más detallada. Finalmente, es indispensable considerar la información sobre la estructura y diversidad genética de esta especie en los esfuerzos de conservación de la biota de Cozumel.

Palabras clave: *Oryzomys couesi cozumelae*, Cozumel, diversidad genética, estructura genética, filogeografía, microsatélites, Citocromo b.

Abstract

Island populations are characterized, among other things, by genetic diversity loss, inbreeding, susceptibility to diseases and reduced gene flow. This is related to area limitation, low number of species, habitat and population fragmentation, local extinctions, and events of dispersal and colonization. Here, the genetic diversity and population genetic structure of a threatened endemic subspecies from Cozumel Island, *Oryzomys couesi cozumelae* (sin. *Oryzomys palustris cozumelae*), were analyzed by 5 microsatellite loci. Also, a phylogeographical analysis of the island-continent populations was carried out by the sequencing of a portion of the mitochondrial gene cytochrome b. DNA was obtained from 228 individuals captured in 8 sites in central Cozumel Island, as well as in 4 sites at the N, NW, E and S of the island. DNA was also obtained from another 5 individuals from Campeche and Chiapas. High genetic diversity was found in every locus as well as in every sampling site in Cozumel Island ($H_{Nei} = 0.689$). According to an analysis of molecular variance, most of the genetic variation (97.12%) was distributed within sites, although a smaller but significant percentage (2.88%, $P < 0.001$) was found among populations. Gene flow was high among sites, but some of them presented significant genetic differentiation, and there was a significant correlation between genetic and geographic distances. However, a Bayesian clustering analysis showed that individuals can not be assigned to the site where they were sampled using the allelic composition. Although Cozumel Island can be affected by hurricanes, introduction of exotic species, habitat perturbation and fragmentation, the subpopulations of *O. c. cozumelae* have not been genetically affected as expected for island species. The phylogeographical analysis showed that the island population has several haplotypes and is genetically closer to the samples from Campeche, but do not form a monophyletic group which can indicate several colonization events. The samples from Chiapas formed two separated groups, one closer to the samples from Campeche and Cozumel, and a more differentiated one that corresponds to the more geographically remote samples from the Pacific coast and Isthmus of Tehuantepec. The origin of the island population can be found in Yucatan peninsula, but more samples from the continent are needed in order to give a more precise explanation. Finally, it is indispensable to consider the information about the genetic structure and diversity of *O. c. cozumelae* in the efforts for the conservation of the biota of Cozumel Island.

Key words: *Oryzomys couesi cozumelae*, Cozumel Island, genetic diversity, genetic structure, phylogeography, microsatellites, Cytochrome b.

I. Introducción

1.1 Islas: aspectos ecológicos y fragmentación del hábitat

El estudio de especies de flora y fauna en islas ha sido importante para evaluar teorías evolutivas sobre los patrones y procesos relacionados con la diversidad genética en poblaciones naturales (Carlquist, 1974; Williamson, 1981). Asimismo, las poblaciones en islas se consideran modelos adecuados para estudiar problemas de conservación dadas las condiciones particulares de limitación de área, aislamiento, bajo número de especies, extinciones locales, dispersión y colonización (Carlquist, 1974; Avise, 1992).

Las islas se caracterizan por altos niveles de endemismo de flora y fauna (Grant, 1998), resultado de la diferenciación genética de las poblaciones después de su establecimiento a partir de un número reducido de fundadores provenientes del continente (Mayr, 1954). A su vez, presentan altas tasas de extinción en comparación con las contrapartes continentales por diversas características, tales como tamaño poblacional pequeño, pérdida de variabilidad genética, incremento de la endogamia, susceptibilidad a enfermedades, poca o nula migración, perturbación del hábitat, e introducción de especies exóticas (Coblentz, 1990; Frankham, 1995; 1996; Alcover *et al.*, 1998; Burbidge and Manly, 2002; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2004). Por supuesto, la magnitud de estos efectos puede variar dependiendo del tamaño de las islas (Hinten *et al.*, 2003); en islas pequeñas se esperan valores menores de variabilidad genética y mayores niveles de endogamia que en islas de mayor tamaño o poblaciones continentales, dado que en general las islas pequeñas no pueden sostener tamaños poblacionales grandes y son más propensas a eventos de extinción o cuellos de botella (Frankham, 1997; 1998).

Los parches o fragmentos de hábitat también suelen considerarse como “islas” en términos de flujo génico y diversidad genética (Kim *et al.*, 1998). El estudio de las consecuencias genéticas en especies que habitan hábitat fragmentados es importante para la conservación. La reducción de la dispersión por barreras físicas y el aislamiento por distancia entre poblaciones reducen el flujo génico entre éstas, lo que puede resultar en un incremento de la endogamia y la deriva génica. En particular, la fragmentación del hábitat por la construcción de carreteras puede limitar el potencial de movimiento de las especies, disminuyendo la dispersión y colonización (Primack, 1993). La vagilidad de las especies también afecta la estructura genética de las poblaciones, ya que las especies con mayor capacidad de dispersión pueden ser menos afectadas genéticamente que especies con menor vagilidad (McDonald y St. Clair, 2004).

A su vez, las islas pueden verse como sitios de protección a corto plazo para muchas especies endémicas y continentales debido a su parcial aislamiento. De hecho, sin esta protección muchas especies estarían extintas. Es por esto que se ha incrementado el uso de islas para la protección de

especies en peligro o amenazadas, y se ha utilizado a las poblaciones isleñas para iniciativas de conservación (Burbidge and Morris, 2002; Eldridge *et al.*, 2004).

Se esperaría que las especies de pequeños mamíferos que habitan la Isla Cozumel estuvieran sujetas a procesos ecológicos similares a los determinados en otras especies de islas y hábitat fragmentados, por lo cual el estudio sobre su estructura y diversidad genética, así como su relación filogeográfica con su contraparte continental, es esencial para conocer su estado actual y para establecer medidas de protección para asegurar su permanencia en la isla.

II. Antecedentes

2.1 Marcadores moleculares, estructura genética y filogeografía de mamíferos pequeños y medianos

En genética de poblaciones y estudios filogeográficos, la detección de diferencias genéticas entre individuos es esencial para conocer la estructura y diversidad de las poblaciones. Los patrones de estructura genética poblacional reflejan los niveles pasados y actuales de flujo génico. La estructura genética de una población se ve afectada por diferentes factores, entre ellos la presencia de barreras físicas para la dispersión, fluctuaciones en la densidad poblacional o variación en los patrones de dispersión y sistemas de apareamiento. El uso de marcadores moleculares ha permitido, entre muchos otros aspectos, evaluar la variabilidad genética de poblaciones y especies, conocer las relaciones filogenéticas e inferir su posible origen (Crozier, 1997; Loxterman *et al.*, 1998; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2001; Vázquez-Domínguez y Vega, 2006), reconstruir la historia evolutiva (Avice, 1994; 2000), así como determinar poblaciones y especies prioritarias para la conservación (Ryder, 1986; Moritz, 1994; Smith y Wayne, 1996). Los microsatélites y la secuenciación de regiones particulares del genoma son algunos de los marcadores moleculares más populares por las ventajas que presentan frente a otras técnicas (Hillis *et al.*, 1996).

La complejidad de los procesos que han dado origen a la estructura y diversidad genética actual de mamíferos pequeños y medianos se refleja en la amplia variación de resultados que se han obtenido en diferentes estudios, algunos de los cuales se mencionan a continuación. En un estudio comparativo realizado por Loxterman y colaboradores (1998), *Oryzomys palustris* presentó mayores niveles de flujo génico y menor diferenciación genética entre subpoblaciones de islas que *Peromyscus leucopus*. Considerando la mayor densidad poblacional de *O. palustris* y su comportamiento semiacuático, los autores sugieren que su presencia en diferentes islas y su menor diferenciación genética entre islas respecto a lo encontrado para *P. leucopus* fue resultado del movimiento de individuos entre islas cercanas por fluctuaciones de la marea e inundaciones en las islas de la barrera de Virginia y en la región sur de la península Delmarva (Loxterman *et al.*, 1998). En un estudio utilizando la técnica de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) como marcador molecular, *P. maniculatus* presentó una alta diferenciación genética entre islas del lago Duparquet, Québec y una diversidad genética significativamente mayor relacionada con la mayor accesibilidad a éstas desde el continente (Landry y Lapointe, 1999). En este caso, la distancia a la costa fue el factor más importante que afectó la diversidad genética dentro de las poblaciones, dado que entre más accesible fuera una isla recibiría más individuos. Hinten y colaboradores (2003) realizaron un estudio utilizando microsatélites y ADN mitocondrial (ADNmt) para evaluar la variación genética de *Rattus fuscipes greyii* en varias islas y regiones continentales de Australia. Encontraron que las islas de menor tamaño presentaron valores bajos de diversidad en comparación con las poblaciones continentales, mientras que la isla de mayor tamaño (400,000

ha), mostró valores de diversidad similares a los continentales. Eldridge y colaboradores (1999) encontraron que el wallaby *Petrogale lateralis* presenta bajos niveles de diversidad genética en la población de la isla Barrow en Australia en comparación con sus contrapartes continentales, mostrando depresión endogámica por entrecruzamiento. También observaron valores de variabilidad bajos para otras islas, por lo que sugieren que es un fenómeno recurrente en la zona, cuya contribución a la extinción de poblaciones pequeñas aisladas debe tomarse en cuenta.

Estudios en hábitat fragmentados y con especies que tienen poca vagilidad sugieren que el flujo génico debe ser bajo entre parches, lo que tiene como consecuencia una menor diversidad genética y mayor diferenciación entre éstos (Van de Zande *et al.*, 2000; Mossman y Waser, 2001). Sin embargo, esto depende de las características de conducta y uso de hábitat de la especie en consideración. Las consecuencias de la fragmentación pueden variar dependiendo de ciertos factores como área remanente, distancia al siguiente hábitat continuo y grado de conectividad entre parches (Goosem y Marsh, 1997; Goosem, 2001; McDonald y St. Clair, 2004). Los movimientos de individuos determinan la escala en la que la fragmentación y heterogeneidad espacial afectan la dinámica poblacional. Por ejemplo, en un estudio con poblaciones de *P. leucopus* en parches de vegetación rodeadas por matrices de agricultura, pastizales y carreteras (Mossman y Waser, 2001), no se encontró evidencia de que el aislamiento estuviera asociado con un decremento de la diversidad genética. Sin embargo, a escalas menores se encontró una estructuración genética significativa de las poblaciones relacionada con efectos de distancia, mientras que a escalas mayores ésta estuvo relacionada con deriva génica y mutación.

Diversos factores antropogénicos pueden provocar la reducción y fragmentación del hábitat y consecuentemente el aislamiento y decremento de las poblaciones, lo que aumenta el riesgo de su extinción. Por ejemplo, la musaraña *Microtus oeconomus* en Holanda se encuentra distribuida en varias poblaciones fragmentadas y localmente amenazadas por factores antropogénicos (Van de Zande *et al.*, 2000). El uso de microsatélites reveló que cada población cuenta con niveles relativamente altos de variabilidad y baja diferenciación genética. Sin embargo, la baja diferenciación entre poblaciones puede ser resultado de su reciente fragmentación, por lo que la continua destrucción del hábitat puede aislarlas completamente. De manera similar, el archipiélago Alexander en el sudeste de Alaska ha experimentado una intensa perturbación humana por la tala y construcción de carreteras, por lo que alrededor del 46% de los bosques originales han desaparecido. La ardilla voladora *Glaucomys sabrinus* está presente en 15 islas de este archipiélago. En un estudio con microsatélites se analizó su diversidad y diferenciación genética (Bidlack y Cook, 2002), y se demostró que las poblaciones isleñas presentan niveles promedio de variabilidad menores que las continentales y diferenciación genética significativa entre algunas de ellas. También se observó cierto patrón de aislamiento por distancia entre poblaciones isleñas, por lo que los autores concluyen que su origen no es reciente y hay poco flujo génico a larga distancia entre estas poblaciones.

Los cambios ambientales a lo largo del año pueden afectar las densidades poblacionales. Éstas pueden aumentar o disminuir durante las épocas de lluvias y secas, respectivamente, debido a la disponibilidad de alimento, agua y temperatura, entre otros. La disminución de la densidad por eventos naturales o antropogénicos aumenta la consanguinidad de las poblaciones, lo que a su vez afecta los niveles de diversidad genética disminuyendo el número de heterocigotos y aumentando la endogamia (Vázquez-Domínguez *et al.*, 1999). La endogamia es un fenómeno que no puede ser descartado como un factor en la extinción de especies isleñas dado que reduce el éxito reproductivo (Frankham, 1998).

En estudios filogeográficos utilizando ADNmt también se han observado una gran diversidad de resultados para especies isleñas y en hábitat fragmentados. Pope y colaboradores (2000) estudiaron la estructura genética poblacional del marsupial *Bettongia tropica*, el cual presenta una distribución restringida a cuatro poblaciones del trópico húmedo del norte de Queensland, Australia, y encontraron dos clados claramente divergentes al norte y sur de su distribución, atribuido a barreras zoogeográficas, así como una alta diversidad genética de la población del norte. Algunos estudios con roedores han analizado los procesos que dieron origen a la diferenciación entre poblaciones y sus especies hermanas. Por ejemplo, *Peromyscus eremicus* tenía una distribución a lo largo de la franja costera de la península de Baja California, pero hace 3 millones de años (MA), durante la formación del Golfo de Cortés en el Plioceno, su rango de distribución fue fragmentado, con consecuente aislamiento por distancia, dando origen a dos especies hermanas, las cuales recobraron contacto en la región del norte del Golfo por la regresión de las aguas oceánicas hace 1 MA (Riddle *et al.*, 2000). Asimismo, *Peromyscus fuvvus* presenta una distribución alopátrica en tres unidades en la Sierra Madre Oriental aisladas unas de otras por valles, dentro de las cuales su hábitat es relativamente continuo. Existen tres subespecies, *P. f. atirostris* en el norte, *P. f. angustirostris* en el centro y *P. f. fuvvus* en la unidad del sur. Harris y colaboradores (2000) analizaron la filogeografía de este grupo utilizando el gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) y concluyeron que las poblaciones pueden ser agrupadas en cinco unidades evolutivamente significativas (ESU, por sus siglas en inglés) que divergieron en el Pleistoceno temprano.

En este estudio se pretende determinar la estructura y diversidad genética de *O. couesi* de Isla Cozumel por medio de marcadores moleculares, así como la relación genética con su contraparte continental. Los resultados obtenidos serán de relevancia para un proyecto que contempla estimar la estructura genética de algunos vertebrados endémicos de Isla Cozumel, con el fin de proponer recomendaciones y líneas de acción concretas encaminadas hacia su conservación a largo plazo.

2.2 Filogenia y paleobiogeografía de la subfamilia Sigmodintinae

Para comprender cómo y cuándo se originó la población de *Oryzomys couesi* en la Isla Cozumel, es importante conocer el origen y distribución histórica del grupo.

El origen de la diversidad de especies de la subfamilia Sigmodontinae es controversial debido a la falta de registro fósil y al gran número de especies existentes. La mayor diversidad se encuentra en la región andina en el norte de Sudamérica. Engel y colaboradores (1998) describen tres hipótesis que tratan de explicar el origen de la diversidad y paleobiogeografía de los sigmodontinos. Una de éstas, llamada hipótesis de arribo temprano, menciona que éstos se dispersaron hacia Sudamérica antes del Mioceno temprano (hace aproximadamente 20 MA) y antes de la formación del istmo de Panamá (hace 4 MA, aproximadamente), después divergieron en Sudamérica y algunos grupos fueron capaces de regresar a Norteamérica (*e.g. Sigmodon* y *Oryzomys*). Una segunda hipótesis, de arribo tardío, menciona que los sigmodontinos se dispersaron a Sudamérica después de formado el istmo de Panamá, seguido por una rápida diversificación en Sudamérica en el Plioceno-Pleistoceno y un movimiento posterior hacia el norte del continente. Existe una tercera hipótesis intermedia, la cual menciona que los sigmodontinos diversificaron en Norteamérica hace 7 MA y después se establecieron en Sudamérica, donde presentaron radiación adaptativa. Un estudio en el cual se utilizaron varios marcadores nucleares (Steppan *et al.*, 2004) señala que Sigmodontinae se originó hace 12.3 y 13.1 MA, tras la divergencia de Neotominae hace 17.3 y 18.1 MA, y también que un reducido grupo de sigmodontinos debe haber arribado y divergido en Sudamérica hace 6 MA, antes de la formación de istmo de Panamá. Los datos de Steppan y colaboradores (2004) están en contra de la hipótesis de un centro de diversificación en Norte América y apoyan la hipótesis de un modelo de radiación sudamericana.

Se ha estimado que la divergencia de los sigmodontinos del linaje sudamericano ocurrió entre 7.6 y 12.5 MA. Posteriormente el linaje de orizominos emergió y divergió entre 5.1 y 8.4 MA, en Centroamérica, antes de cruzar hacia Sudamérica o después de cruzar a Sudamérica en la región Andina del norte (Engel *et al.*, 1998). El registro fósil muestra que los sigmodontinos de Norteamérica descienden de *Copemys*, presente en América hace entre 9 y 16 MA (Mioceno tardío). Otros sigmodontinos, que también son ahora neotropicales, se establecieron en el sudeste de Estados Unidos y México hace 4 MA, representados por cinco géneros, entre ellos *Oryzomys*.

2.3 Geología de la Isla Cozumel

Las características geológicas de la Isla Cozumel se encuentran íntimamente ligadas a la historia geológica de la provincia fisiográfica de la península de Yucatán. Probablemente el origen de la isla corresponde a un desprendimiento del margen oriental de la península, durante la formación de la cuenca de Yucatán, entre el Mesozoico tardío y el Cenozoico temprano hace aproximadamente 65 MA (Uchupi, 1973). Las rocas sedimentarias marinas atestiguan un levantamiento gradual de la península, por lo menos desde el Oligoceno, hace aproximadamente 38 MA. La porción septentrional de la península es una superficie nivelada de poca altitud, elevada

sobre el nivel del mar durante el Cuaternario, hace aproximadamente 2 MA, por lo que ha estado sujeta a transgresiones y regresiones (Lugo-Hubp *et al.*, 1992).

La característica geomorfológica más notoria de Isla Cozumel es la presencia de una terraza submarina que en el margen occidental alcanza una profundidad de 20 a 30 m, y corresponde a una terraza de erosión, posiblemente originada por la exposición alternada a ambientes submarinos y subaéreos durante las transgresiones marinas del Pleistoceno, hace 2 MA (Jordán, 1987). La altura máxima de la isla no rebasa los 20 msnm, por lo que durante estos eventos la isla debe haber estado temporalmente sumergida. Isla Cozumel se encuentra separada del continente por el Canal de Cozumel, con un talud insular de más de 400 m de profundidad que elimina la posibilidad de un puente continental y justifica su clasificación de isla oceánica (Davidson, 1975).

De acuerdo con la información geológica sobre el origen de la península de Yucatán e Isla Cozumel, su levantamiento sobre el nivel del mar durante el Pleistoceno, así como los datos fósiles del género *Oryzomys* en México, se puede suponer que éste se encontraba presente en la península desde hace al menos 4 MA. El levantamiento de la isla durante el Cuaternario y el efecto de las transgresiones y regresiones durante este periodo sugieren que la biota de Isla Cozumel se pudo haber originado por fenómenos de dispersión desde el continente a través del Canal de Cozumel desde el último periodo glacial, hace aproximadamente 15,000 años. La presencia de *O. couesi* en Isla Cozumel pudo ser resultado de la dispersión durante alguno de los repetidos descensos del nivel del mar durante el Cuaternario, facilitada por las características natatorias de esta especie. Otra posibilidad es que *O. couesi* haya arribado a la Isla Cozumel en embarcaciones con los primeros colonizadores, tal como se ha dado para otras especies de pequeños mamíferos (Gündüz *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2003). El consecuente aislamiento de *O. couesi* en la isla y el tiempo transcurrido desde la colonización, pudieron haber sido suficientes para que las poblaciones continental e isleña hayan divergido genéticamente.

III. Objetivos

- Determinar la variación genética de *Oryzomys couesi* de Isla Cozumel.
- Evaluar la estructura genética de los sitios de muestreo de *O. couesi*, así como el flujo génico y diferenciación entre sitios de muestreo de Isla Cozumel.
- Comparar genéticamente a *O. couesi* de Isla Cozumel con su contraparte continental para evaluar el posible origen de la subespecie isleña.

IV. Hipótesis

- Dadas las características asociadas a poblaciones naturales en islas, *O. couesi* en Isla Cozumel presentará baja variabilidad genética y alta estructuración.
- Las poblaciones de *O. couesi* en la isla presentarán diferenciación genética con bajos niveles de flujo génico por la fragmentación del hábitat por carreteras y por la distancia geográfica entre ellas.
- Las poblaciones de *O. couesi* de Isla Cozumel estarán genéticamente diferenciadas, pero más cercanamente relacionadas a las de la península de Yucatán que a las poblaciones más alejadas y externas a la península.

V. Métodos

5.1 Área de estudio: descripción de Isla Cozumel

La Isla Cozumel, Quintana Roo, se localiza a los N 20° 28' y W 86° 55' a 17 km de la costa oriental de la península de Yucatán, presenta una extensión de 486 km² (Martínez-Morales, 1996). Esta isla alargada, con su eje mayor en sentido sur-norte, es una de las de mayor tamaño en aguas mexicanas (Jordán, 1987) y la de mayor tamaño en el Caribe mexicano (Fig. 1). El ambiente es netamente marino y se encuentra determinado por el flujo permanente de la corriente de Yucatán, que a lo largo del margen de sotavento alcanza velocidades mayores a tres o cuatro nudos en el verano (Wust, 1964).

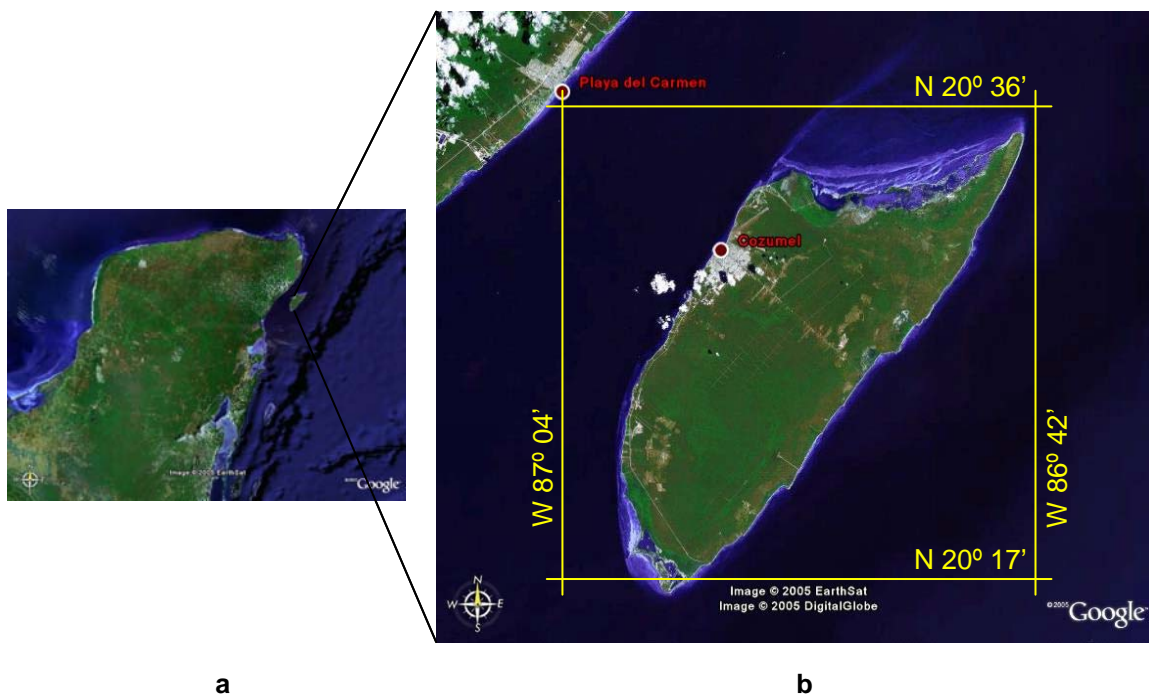


Figura 1: Ubicación de Isla Cozumel. a: península de Yucatán. b: Isla Cozumel, Quintana Roo, está ubicada a 17 km de la costa oriental de la península de Yucatán.

La actividad hotelera y turística de la isla se ha concentrado principalmente en las zonas aledañas a la playa occidental. El crecimiento poblacional y turístico incrementa la demanda de suelos urbanos dándose un aumento de la mancha urbana de 38 ha por año (Diario Oficial de la Federación, 2001). Con poco más de 60,000 habitantes, Isla Cozumel presenta un área destinada al cultivo y ganadería pequeña y alcanza 1,200 ha en el año 2002 (datos INEGI).

Más del 75% de Isla Cozumel presenta vegetación consistente en selva mediana perennifolia y subperennifolia, y manglar en zonas inundables y línea de costa (Martínez-Morales, 1996; Martínez-Morales y Cuarón, 1999). Cuenta con dos áreas naturales protegidas, el Refugio de Flora y Fauna Laguna Colombia con 1,114 ha y el Parque Nacional Arrecifes de Cozumel con

11,988 ha. En el 2001 se decretó un programa de ordenamiento ecológico territorial para la isla y la zona de influencia marina. Se distribuyen 26 taxa de vertebrados endémicos, muchos de ellos en condición de amenazados o en peligro de extinción según la normatividad mexicana y los listados internacionales, de los cuales existe poco conocimiento sobre sus características ecológicas y genéticas (Taylor y Cooley, 1995; Martínez-Morales, 1996; Martínez-Morales, 1999; Martínez-Morales y Cuarón, 1999; Zink *et al.*, 1999, Macouzet y Escalante-Pliego, 2000).

5.2 Sujeto de estudio: características ecológicas de *Oryzomys couesi*

Oryzomys couesi (Sigmodontinae; Musser y Carleton, 1993), conocido como rata arrocera de pantano, es un roedor con hábitos terrestres y semiacuáticos. Presenta una amplia distribución, desde el sur de Texas hasta el noreste de Colombia. En la península de Yucatán, se distribuye en los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, así como en Belice y el Noroeste de Guatemala. *O. couesi* está presente en otros estados de la República Mexicana con excepción de la región centro-norte del altiplano. En la Isla Cozumel ocurre la subespecie *O. c. cozumelae* y se encuentra clasificada según la normatividad mexicana como amenazada (SEMARNAT, 2002).

La población de la península de Yucatán fue considerada por un tiempo como la subespecie *O. palustris couesi*, ello con base en tres caracteres craneales cualitativos y color del pelaje, mientras que la población de Isla Cozumel se consideraba otra especie, *O. cozumelae* (Merriam, 1901), o subespecie, *O. p. cozumelae* (Jones y Lawlor, 1965), por su aislamiento geográfico de la contraparte continental (Hall, 1981). Posteriormente, se determinó a *O. couesi* como una especie genéticamente distinta de *O. palustris*, porque no se encontró evidencia de hibridación en la zona de simpatria en el sur del estado de Texas (Schmidt y Engstrom, 1994). Por ello, se determinó que estas especies se encontraban aisladas reproductivamente y representaban especies biológicas y evolutivas distintas. Por lo mismo, el nombre de la subespecie de la isla se cambió a *O. c. cozumelae*. *O. c. cozumelae* difiere significativamente de *O. couesi* de la península en que es más grande externamente, el cráneo es ligeramente mayor, menos arqueado en las órbitas, tiene dientes más pesados y nasales más largos, y el color es ligeramente más oscuro (Sánchez-Cordero, 2003).

O. couesi es considerada buena dispersora en agua y puede cruzar grandes expansiones de aguas abiertas. Es común en marismas y zonas inundables, incluyendo deslaves flotantes en aguas profundas. Es menos común en matorrales espinosos, bosques y límites de éstos. En ocasiones puede invadir campos de arroz y azúcar. Si se le molesta en la noche, puede sumergirse en el agua y nadar, deteniéndose para descansar a una distancia prudente lejos del peligro. Se alimenta de vegetales verdes, insectos (hormigas, escarabajos y larvas) y semillas (Reid, 1997).

Se ha demostrado que *O. palustris* es capaz de nadar más tiempo en una prueba realizada en un lago y más veces en una prueba realizada en una cámara de nado en comparación con *Sigmodon hispidus* (Esher *et al.*, 1978). Además, el pelaje de *O. palustris* no absorbe tanta agua

como el de *Sigmodon*, permitiéndole mantener por más tiempo su temperatura corporal. Estas características también pueden presentarse en *O. couesi*, dado que antiguamente fue considerada como una subespecie de *O. palustris* y se le asocia a ambientes con mayor disponibilidad de agua.

5.3 Trabajo de campo y muestras

De septiembre de 2001 a enero de 2005 se obtuvieron muestras de tejido de *O. c. cozumelae* de distintas localidades de Isla Cozumel, las cuales fueron utilizadas para el análisis genético de este roedor (Fig. 2a). Se colocaron gradillas de 4 líneas por 10 trampas separadas ≈ 10 m o trayectos de 300 m con 25 trampas cada ≈ 12.5 m al NW, E, N y S de Cozumel (Fig. 2a) para obtener una muestra representativa de toda la isla. El sitio de estudio principal se ubicó en el área de captación y extracción de agua de Cozumel, a cargo de la Comisión de Agua Potable y Alcantarillado (CAPA). La zona de captación de agua se ubica en la región central de la isla, cubierta por vegetación de selva mediana subperennifolia (Romero-Nájera, 2004). Existen dos caminos o ejes principales en el lado sur de la zona de captación de agua, en los kilómetros 6 y 8 de la carretera transversal de la isla (llamados eje 6 y eje 8, respectivamente; Fig. 2b).

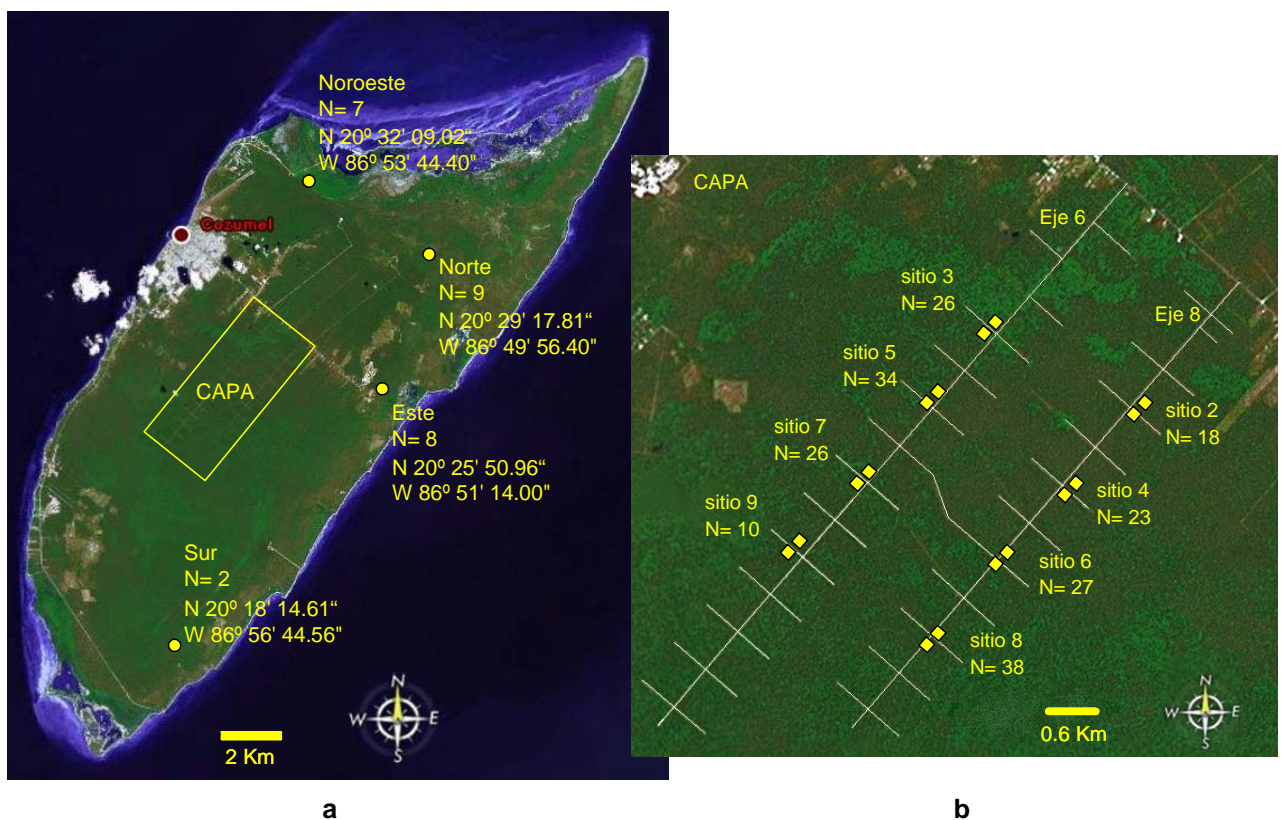


Figura 2: Sitios de muestreo en la Isla Cozumel. a: sitios de muestreo al NW, E, N y S de Isla Cozumel y área de captación y extracción de agua potable (CAPA); b: sitios de muestreo dentro de CAPA en los ejes 6 y 8. N= tamaño de muestra para cada sitio.

En cada eje o camino se habían seleccionado previamente 4 sitios de trapeo para un estudio ecológico, poblacional y conductual de roedores (Gutiérrez-Granados, 2003; Fortes-Corona, 2004). Estos sitios se denominaron sitios 3, 5, 7 y 9 para el eje 6, y sitios 2, 4, 6 y 8 para el eje 8. Cada sitio está compuesto por una parcela de 0.5 ha (71 X 71 m) al norte y al sur de un cruce, que lleva a los pozos de captación de agua, perpendicular a los ejes (Fig. 2b). En cada parcela se colocó una gradilla de 7 líneas por 7 trampas separadas entre sí \approx 8.5 m (49 trampas). Los individuos fueron atrapados utilizando trampas Sherman, cebadas con avena mezclada con crema de cacahuate y vainilla. Las muestras de tejido se obtuvieron por ectomización de falanges.

Para el análisis filogeográfico se incorporaron al análisis varias muestras de Cozumel (CAPA= 5, NW= 3, E= 3, N= 5, S= 2). Se obtuvieron muestras de *O. couesi* de diferentes sitios de Campeche (Fig. 3). Estas muestras provienen de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología, UNAM. También, se obtuvieron muestras provenientes de Chiapas de la colección de mamíferos de El Colegio de la Frontera Sur (EcoSur; Fig. 3).

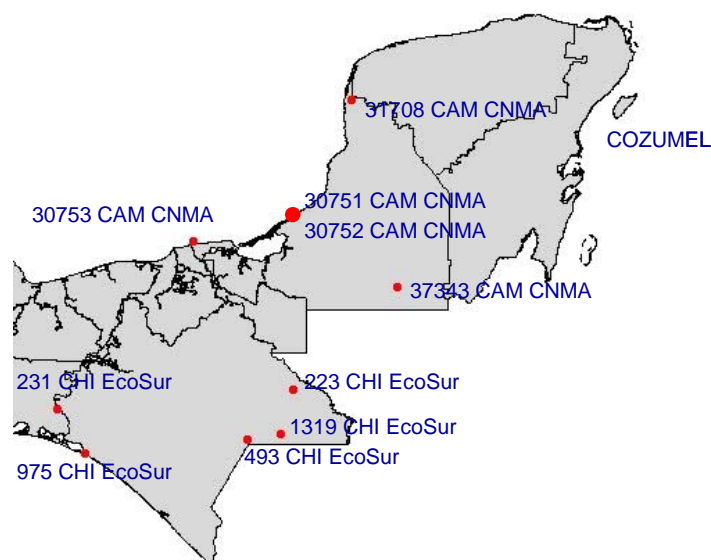


Figura 3: Ubicación geográfica de los sitios de colecta de las muestras de tejido de *Oryzomys couesi* obtenidas de colecciones científicas y utilizadas para el análisis filogeográfico. El número corresponde al número de registro del ejemplar; CAM CNMA: muestras de Campeche obtenidas de la Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM; CHI EcoSur: muestras de Chiapas obtenidas de la Colección de Mamíferos de El Colegio de la Frontera Sur.

5.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN de todos los individuos muestreados en Isla Cozumel se realizó utilizando el kit comercial AquaPure Genomic DNA (Biorad, California), siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración (ng/ μ l) de ADN se cuantificó por medio de espectrofotometría. El

ADN de muestras obtenidas de museos fue extraído por medio de la técnica de fenol-cloroformo dado que esta técnica es más adecuada cuando se tiene ADN degradado o en poca cantidad. La descripción detallada del método de extracción de ADN por fenol-cloroformo se presenta en el Anexo 1.

La integridad del ADN se observó por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados con luz UV.

5.5 Microsatélites y electroforesis en geles de poliacrilamida

Se estandarizaron cinco pares de oligonucleótidos para la amplificación de cinco loci de microsatélites de *O. c. cozumelae* (Cuadro 1), desarrollados previamente para la amplificación de microsatélites de *O. palustris* (Wang *et al.*, 2000). Se realizaron controles negativos durante la estandarización de cada par de oligonucleótidos para asegurar que no hubiera contaminación durante la amplificación y de que las bandas obtenidas fueran propias del microsatélite. Además, se realizaron controles positivos cuando la técnica se estandarizó para asegurarse de que las condiciones de amplificación se mantuvieran entre experimentos. Las condiciones estandarizadas para cada microsatélite se presentan en el Anexo 2. Los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados bajo luz UV. El PCR se repitió cuando en el control negativo aparecía algún producto de amplificación.

Cuadro 1. Cinco loci de microsatélites amplificados por cinco pares de oligonucleótidos (Wang *et al.*, 2000) estandarizados para la amplificación de microsatélites de *O. c. cozumelae*.

Locus	Temperatura de alineación (°C)	Número de acceso de GeneBank	Número de repeticiones AAT	Tamaño del rango de alelos (pb)
OryAAT16	50	AF259065	11	94-125
OryAAT21	55	AF259066	16	184-199
OryAAT26	50	AF259067	13	97-141
OryAAT40	55	AF259068	13	148-175
OryAAT60	53	AF259069	11	130-181

La separación de los productos de amplificación de microsatélites se llevó a cabo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% durante 2 horas a 500 V (Anexo 3). Los geles fueron teñidos por medio de la técnica de tinción con plata utilizando el kit comercial GelCode Color Silver Stain Kit (Pierce, Illinois), siguiendo las especificaciones del proveedor, o por medio de una técnica similar estandarizada en el laboratorio (Anexo 3). Los geles teñidos fueron fotografiados digitalmente y la presencia de microsatélites se estimó visualmente comparando el peso molecular de las bandas obtenidas con el marcador de pesos moleculares (Escalera de 10 pb, Invitrogen). La lectura de los geles y el análisis de las bandas para estimar genotipos homocigos y heterocigos se realizó por medio del programa LabWorks v. 4.5 (UVP, California).

5.6 Diversidad genética

Se estimó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) de los 5 loci para los sitios de CAPA y las otras zonas muestreadas de la isla utilizando el programa GenePop v. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995). El equilibrio de H-W es un modelo teórico para genética de poblaciones en el que se establece que bajo ciertas condiciones, después de una generación de apareamientos al azar, las frecuencias genotípicas de un locus permanecerán constantes o en equilibrio, y que las frecuencias genotípicas en equilibrio pueden ser representadas como una función de las frecuencias alélicas de ese locus. Las pruebas de probabilidad se llevaron a cabo mediante cadenas de Markov utilizando los siguientes criterios del programa: 1000 *dememorizations*, 200 *batches* y 1000 *iterations per batch*. También, se obtuvieron los coeficientes de endogamia (F_{IS}) para cada población por locus con el fin de determinar la deficiencia o exceso de heterocigotos y su significancia estadística con la corrección Bonferroni estándar (Miller, 1981; Rice, 1989). Se estimó el desequilibrio de ligamiento de todos los pares de loci para ver si estos se encontraban o no ligados genéticamente y se estimó su probabilidad con una prueba exacta de Fisher utilizando cadenas de Markov (1000 *dememorizations*, 200 *batches*, 1000 *iterations per batch*). Además, se calcularon los índices de fijación de Wright de los individuos respecto a las subpoblaciones (F_{IS}), de las subpoblaciones respecto al total (F_{ST}) y de los individuos respecto al total (F_{IT}) por locus para todas las poblaciones según Weir y Cockerham (1984). Los índices de fijación determinan la reducción de la heterocigosidad esperada bajo el supuesto de apareamientos al azar en cada nivel de jerarquía poblacional respecto a un nivel más inclusivo, por lo que permiten comparar los efectos de la subestructuración de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

Utilizando el programa PopGene v. 1.31 (Yeh *et al.*, 1997) se determinó el número observado (n_a) y efectivo de alelos (n_e) igualmente frecuentes, calculado como el recíproco de la homocigosidad (Hom), siendo

$$n_e = 1/\text{Hom}$$

También, se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E) según Levene (1949) como

$$H_o = (\sum h/N) / m$$

$$H_E = 1 - (1/m) \sum_{r=1}^m \sum_{i=1}^k p_{ri}^2$$

donde h es el número de heterocigotos por locus, N es el número de individuos y m es el número de loci. Además, se calculó la heterocigosidad o diversidad genética de Nei (1973) para cada locus y promediada entre loci, tomando toda la muestra de CAPA junta o separándola por sitios y para las poblaciones fuera de CAPA (NW, E, N y S de Cozumel). Para documentar la cantidad de variación genética de una manera estandarizada se requieren medidas que permitan cuantificar la información, y la cantidad de heterocigosidad es la medida de variación genética de una población más utilizada (Hedrick, 2000). Se calculó la distancia genética sin sesgo de Nei (1978) y las distancias geográficas (en km) entre todos los sitios de CAPA y al NW, E, N y S de Cozumel.

5.7 Estructura genética

Con el programa Arlequin v. 2.00 (Schneider *et al.*, 2000) se realizó una prueba de Mantel con 100,000 permutaciones utilizando las distancias genéticas y geográficas (en km) entre los sitios de muestreo (medidas utilizando la opción *Measure* de programa Google Earth). También, se calculó la diferenciación genética entre poblaciones (R_{ST}) según Slatkin (1995), siendo

$$R_{ST} = (\hat{S} - S_W) / \hat{S}$$

donde \hat{S} es el promedio de la diferencia cuadrada entre todos los pares de copias de alelos y S_W es el promedio de la suma de cuadrados de las diferencias de los tamaños de los alelos. Este es un índice más adecuado para microsatélites que la F_{ST} de Wright (1951) dado que los microsatélites no se asemejan al modelo de alelos infinitos por presentar una mayor tasa de mutación por generación y por mantener cierta "memoria" del estado alélico previo, asemejándose al proceso de mutación paso a paso (Slatkin, 1995). Además, se calculó el número absoluto de migrantes intercambiados entre pares de poblaciones (M) calculado a partir de R_{ST} , considerando que los individuos son diploides, siendo

$$M = (1 - R_{ST}) / 2 R_{ST}$$

Se estimó el número de mutaciones por generación Theta (θ_H) a partir de la homocigosidad esperada (Hom_E) en una población en equilibrio entre deriva y mutación según Zouros (1979) y Chakraborty y Weiss (1991) para Cozumel y para CAPA, donde

$$E(\theta_H) = [1 + (2(1 + \theta) / (2 + \theta)(3 + \theta))]$$

y

$$\theta = (1 - Hom_E) / Hom_E$$

partiendo de que

$$Hom_E = 1 - H_{Esp}$$

Utilizando los valores de θ se estimaron los tamaños efectivos poblacionales (N_e) para Cozumel y CAPA por medio de la relación

$$\theta = 4N_e\mu$$

donde μ es la tasa de mutación para microsatélites, la cual se ha estimado que varía entre 1×10^{-3} y 1×10^{-5} para humanos, ratones y ratas (Schug *et al.*, 1997).

Para determinar la fuente de la variación se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) de todas las poblaciones de Isla Cozumel o sólo para los sitios de CAPA. Este análisis realiza una partición de la varianza total en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones (ya sea Cozumel o CAPA) y entre individuos dentro de las poblaciones. Los componentes de varianza se utilizan para calcular el índice de fijación R_{ST} (Wright, 1951; Slatkin, 1995) y su significancia se obtiene utilizando una prueba no paramétrica de permutación de genotipos entre poblaciones ($P < 0.05$; 20,000 permutaciones).

Se construyó un árbol de distancias de Neighbor-Joining (NJ), utilizando el programa Mega v. 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), con base en la matriz de distancias genéticas. Con este método se encuentran pares de unidades taxonómicas operacionales (en este caso las distancias apareadas entre los sitios de muestreo de Cozumel) que minimizan las distancias de las ramas totales durante cada paso del agrupamiento, empezando con una topología en forma de estrella y finalizando en un solo árbol más parsimonioso (Saitou y Nei, 1987). Se realizó una búsqueda heurística sin límite de número máximo de árboles en PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2002) para obtener un árbol consenso.

Se utilizó el programa Structure v. 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) para estimar la probabilidad de la distribución de los individuos en diferentes números de poblaciones. Este programa utiliza un método de agrupamiento basado en un modelo Bayesiano derivado de pruebas de asignación y no considera ningún modelo de mutación. A diferencia de otros métodos, el número de poblaciones y sus probabilidades se asignan *a posteriori*. Se consideró que el número máximo de posibles poblaciones fueran 12, correspondientes a los 8 sitios de CAPA y a los 4 sitios fuera de CAPA (NW, E, N y S). El número estimado de poblaciones es el valor de K donde se obtiene la mayor probabilidad logarítmica posterior [$\ln P(K)$] y/o donde se presente el menor valor de admixia α (Small *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004). Valores de $\alpha > 1$ significan que cada individuo presenta copias de alelos que se originaron de K poblaciones en proporciones iguales (Pritchard *et al.*, 2000). Si el valor de K donde se presenta la mayor probabilidad logarítmica posterior no es equivalente al valor de K con el menor valor de admixia, entonces el número de poblaciones estimado corresponde al rango entre el valor de K con la mayor probabilidad logarítmica posterior y el valor K con el menor valor de admixia. Esto significa que no siempre conoceremos el verdadero número de poblaciones, pero hay que tomar los valores que capturen la mayor estructura poblacional (Pritchard *et al.*, 2000). De esta manera, las probabilidades posteriores de los datos que encajan en todas las posibilidades de número de poblaciones (K_1, K_2, \dots, K_{12}) fueron calculadas utilizando el modelo de admixia con frecuencias alélicas correlacionadas (100,000 *iterations for length of burning period*, 10,000 *MCMC repetitions and 100 simulations per K*).

Asimismo, se realizó un análisis de asignación utilizando el algoritmo de Paetkau *et al.* (1995) con el que se puede asignar a un individuo a una población simplemente por su genotipo. Esto se realizó con el programa Doh Assignment Test Calculator (<http://www.Biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>) el cual toma genotipos de individuos de varias poblaciones y determina de cuál población es más probable que el individuo haya provenido utilizando un índice de asignación determinado por la mayor probabilidad del genotipo de un individuo en cualquiera de las poblaciones (Brzustowski, 2002).

Por último, se utilizó el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1996) para detectar cuellos de botella en los sitios de muestreo de Cozumel. Cuando ocurre un cuello de botella el tamaño efectivo poblacional se reduce y provoca una reducción progresiva del número de alelos y la

heterocigosidad, sin embargo la diversidad alélica se pierde más rápido que la heterocigosidad. Este programa prueba la diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada con el número de alelos observados. Si se encuentra un exceso de heterocigosidad observada respecto a la heterocigosidad esperada se puede considerar que la población sufrió un cuello de botella reciente. Esto se ha probado para loci que evolucionan siguiendo el modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés) y no para el modelo de evolución paso a paso (SMM, por sus siglas en inglés). Sin embargo, se puede detectar un exceso de heterocigosidad bajo el modelo de mutación de dos fases (*two phased model of mutation*, TPM), el cual es intermedio al IAM y al SMM, y es más recomendable para microsatélites (Cornuet y Luikart, 1996). Para determinar si las poblaciones exhibieron cuellos de botella se estimó la heterocigosidad observada y esperada bajo el modelo de TPM con 90% SMM, 10% IAM y varianza= 10 (porque se ha observado que los microsatélites no se comportan 100% siguiendo el SMM), y con 70% SMM, 30% IAM y varianza= 10 (valores *default*). Para determinar si la población presentó un exceso significativo de heterocigosidad se realizó una prueba de Wilcoxon (con un valor de significancia $P < 0.05$) ya que puede usarse para pocos loci con cualquier tamaño de muestra.

5.8 Secuenciación de Citocromo b

Para el análisis filogeográfico, se amplificó una porción del ADNmt de las muestras continentales e insulares de *O. couesi*. La región amplificada fue una porción de 884 pb del gene mitocondrial citocromo b (cyt b), en la que se utilizaron los pares de oligos MVZ 05-04 y MVZ 45-16 (Cuadro 2; Smith y Patton, 1993).

Las condiciones utilizadas para la amplificación se presentan en el Anexo 4. Los productos de amplificación fueron observados en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y visualizados bajo luz UV. Después, el PCR se limpió por el procedimiento de PEG (polietilenglicol; Anexo 5) y nuevamente se visualizó en geles de agarosa para asegurarse de que el producto de PCR no se hubiese perdido. A continuación se realizó el PCR de secuenciación (Anexo 4) utilizando el kit comercial BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, California). Las muestras se limpiaron nuevamente con un procedimiento basado en Sephadex G-50 (Anexo 6) y se enviaron a secuenciar en secuenciadores automáticos Applied Biosystems 373 y 3100 DNA.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cyt b (Smith y Patton, 1993)

Cadena Forward o light	Secuencia (5'-3')
MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG
MVZ45	ACNACHATAGCNACAGCATTTCGTAGG
Cadena Reverse o heavy	
MVZ04	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC
MVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT

5.9 Análisis filogeográfico

Se secuenciaron 28 individuos, de los cuales 5 provinieron de Campeche, 5 de Chiapas y 18 de Cozumel (Fig. 3). Las secuencias de cyt b de *O. couesi* se alinearon utilizando el programa BioEdit v. 7.0.1 (Hall, 1999), incorporando además una secuencia de GeneBank de *O. megacephalus* (AY275124.1) y de *Calomys callosus* (AY439002.1) como grupos externos. Con el programa DnaSP v. 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) se calculó el número de sitios polimórficos, sitios parsimoniosamente informativos, la diversidad haplotípica de Nei (Hd; 1987), la diversidad nucleotídica (π) como el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias, el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Da) y el número promedio de sustituciones netas por sitio entre poblaciones (Dxy).

Posteriormente, las secuencias se incorporaron al programa ModelTest v. 3.06 (Posada y Crandall, 1998) para ver el modelo de sustitución de ADN. Se encontró que el modelo de evolución de ADN más apropiado es el de Hasegawa, Kishino y Yano (HKY; 1985), el cual es similar al modelo de Tamura-Nei. Bajo el modelo HKY, un sitio que contenga una purina (A o G) tiene una cierta probabilidad de sustitución por otra purina y una cierta probabilidad de sustitución por otra base al azar de un *pool* con las cuatro bases. También, una pirimidina (T o C) tiene cierta probabilidad de sustitución por otra pirimidina y por otra base al azar de un *pool* con las cuatro bases. Además, la tasa sustitución de transversiones sobre transiciones (α_R/α_Y) es igual a la frecuencia de purinas sobre pirimidinas (π_R/π_Y) en un pool con las cuatro bases (Felsenstein, 2004). Se utilizó el programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2002) para calcular árboles de NJ con 1000 bootstrap utilizando el modelo de sustitución HKY.

Por otro lado, el método de Templeton (TCS; 1992) se ha usado con datos de secuencia para inferir genealogías a nivel de poblaciones cuando hay poca divergencia. Se utilizó el programa TCS (Clement *et al.*, 2000) para estimar las relaciones genealógicas entre las secuencias de cyt b de *O. couesi* de Cozumel, de la península de Yucatán y de Chiapas. Este programa obtiene las frecuencias de los haplotipos y las utiliza para estimar las probabilidades del haplotipo del grupo externo, las cuales deben correlacionar con la edad del haplotipo. Después, el programa calcula una matriz de distancias absolutas entre pares de haplotipos y construye una red de haplotipos por parsimonia conectados por el número máximo de mutaciones (Clement *et al.*, 2000).

Finalmente, con el programa DnaSP v. 4.10.4 (Rozas *et al.*, 2003) se utilizó un procedimiento basado en distancias (distribución "mismatch") para probar las firmas demográficas de expansión poblacional comparando la distribución observada con la esperada asumiendo un modelo de expansión (Rogers y Harpending, 1992), utilizando las muestras de Cozumel. Se utilizó la prueba estadística de Ramos-Onsins y Rozas porque el comportamiento de esta prueba es mejor para tamaños pequeños de muestra (Ramos-Onsins y Rozas, 2002), con 1000 simulaciones.

VI. Resultados

6.1 Diversidad y estructura genética

Se muestreó y amplificó el ADN de 228 individuos de *O. c. cozumelae* provenientes de diferentes regiones de Cozumel con 5 oligos para microsatélites. De éstos, 202 provinieron de CAPA y 26 se obtuvieron en las zonas al NW, E, N y S de la isla (Fig. 2).

Se presentaron 54 alelos para los 5 loci utilizados en este estudio; las frecuencias alélicas dentro de cada sitio de muestreo se presentan en el Anexo 7. Se encontraron pocos alelos exclusivos, es decir, aquellos que se observan en un sitio de muestreo y no en los otros: en los sitios 5 y 6 de CAPA para Ory16 (2 alelos, uno en cada uno), sitio 4 para Ory26 (1 alelo) y sitio 5 para Ory40 (1 alelo). En ningún sitio de muestreo se presentaron alelos exclusivos para los loci Ory21 y Ory60. Hubieron algunos alelos que se presentaron exclusivamente en sitios del eje 8 y no en los del eje 6 (Ory21, 1 alelo) y en sitios fuera de CAPA (Ory40, 2 alelos). Para cada locus hay uno o dos alelos con alta frecuencia en todos los sitios y varios alelos poco frecuentes.

La mayoría de los sitios de CAPA se encontraron en equilibrio de H-W para cada locus (Cuadro 3), aunque el locus Ory26 presentó 3 sitios en desequilibrio por una deficiencia de heterócigos (sitios 5, 4 y 6), y el locus Ory21 presentó dos sitios en desequilibrio por una deficiencia de heterócigos (sitios 7 y 8). No se presentaron sitios con un exceso de heterócigos significativo. No se calculó la significancia para aquellos sitios con una $N < 10$ (sitios NW, E, N y S).

Cuadro 3. Valores de F_{IS} de Weir y Cockerham (1984) y equilibrio de H-W.

	N	Ory16	Ory21	Ory26	Ory40	Ory60	Total
sitio 3	26	0.065	0.095	0.234	0.117	0.301	0.160
sitio 5	34	0.074	0.025	0.496	0.049	0.047	0.087
sitio 7	26	-0.002	0.254	-0.097	0.049	0.116	0.098
sitio 9	10	-0.014	0.232	0.000	-0.248	-0.208	-0.035
sitio 2	18	0.114	0.147	0.213	-0.066	-0.131	0.037
sitio 4	23	0.051	0.198	0.537	0.106	0.039	0.035
sitio 6	27	-0.091	0.106	0.743	-0.134	-0.014	0.012
sitio 8	38	0.079	0.245	0.317	-0.022	0.077	0.125
NW*	7	-0.263	0.200	0.647	0.040	-0.029	0.074
E*	8	-0.140	-0.143	-0.296	0.167	-0.043	-0.077
N*	9	-0.067	0.344	0.455	0.226	0.226	0.225
S*	2	-0.333	-0.333	1.000	0.000	0.000	0.111

Valores significativos con corrección Bonferroni estándar

*No se calculó la significancia porque $N < 10$

Con la prueba de desequilibrio de ligamiento se observó que sólo el par de loci Ory40-Ory60 estaban en desequilibrio con un valor de $P= 0.033$ (Cuadro 4).

Cuadro 4. Desequilibrio de ligamiento para todos los pares de loci (Prueba de Fisher).

Par de loci		X^2	g. l.	P
Ory16	Ory21	0	2	1
Ory16	Ory26	0.352	2	0.838
Ory16	Ory40	2.822	2	0.244
Ory16	Ory60	0.984	2	0.611
Ory21	Ory26	1.783	2	0.41
Ory21	Ory40	1.742	2	0.418
Ory21	Ory60	0.61	2	0.737
Ory26	Ory40	1.216	2	0.545
Ory26	Ory60	1.751	2	0.417
Ory40	Ory60	6.816	2	0.033

Valores significativos en negritas ($P < 0.05$)

Los índices de fijación de Wright de los individuos respecto a las subpoblaciones (F_{IS}), de las subpoblaciones respecto al total (F_{ST}) y de los individuos respecto al total (F_{IT}) se presentan en el Cuadro 5. El locus Ory26 presentó el mayor valor de fijación de los individuos dentro de todos los sitios, mostrando una deficiencia de heterocigotos. Por otro lado, se presentaron valores bajos de F_{ST} en todos los loci analizados, lo que indica que no existen muchos alelos fijos en los sitios muestreados respecto a la muestra total.

Cuadro 5. Índices de fijación según Weir y Cockerham (1984)

	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Ory16	0.015	0.005	0.020
Ory21	0.163	0.001	0.163
Ory26	0.366	0.016	0.376
Ory40	0.032	0.020	0.051
Ory60	0.083	0.004	0.086
Total	0.107	0.008	0.113

En general, se encontró un alto número de alelos por locus excepto para Ory26 (Cuadro 6). El locus Ory26 fue el que presentó el menor número de alelos (7 alelos), seguido por Ory60. Ory21 fue el locus con el mayor número de alelos (15 alelos), seguido por Ory16 y Ory40. Los valores de heterocigosidad observada por locus fueron altos (Cuadro 6), donde Ory26 fue el locus con menor diversidad, debido a la deficiencia de heterocigotos, el bajo número de alelos y a que uno de ellos se

presentó con una frecuencia mayor al 50% en todos los sitios. Los demás loci presentaron valores de heterocigosidad de Nei mayores que 0.6, siendo Ory60 el locus con mayor diversidad. La diversidad genética de Nei promediada entre los 5 loci también fue alta.

Cuadro 6. Diversidad genética por locus de *Oryzomys couesi* de Cozumel

Locus	N	n _a	n _e *	H _O *	H _E *	H _{Nei} **
Ory16	228	13	3.726	0.719	0.733	0.732
Ory21	228	15	7.096	0.728	0.861	0.859
Ory26	228	7	1.473	0.215	0.322	0.321
Ory40	228	10	3.027	0.645	0.671	0.670
Ory60	228	9	7.234	0.811	0.864	0.862
Media				0.624	0.690	0.689
D. S.				0.236	0.222	0.222

n_a= número observado de alelos

n_e= número efectivo de alelos

* Levene, 1949. ** Nei, 1973

Todos los sitios dentro de CAPA presentaron valores de diversidad de Nei promediada entre loci que varían entre 0.6 y 0.7. Los sitios de muestreo fuera de CAPA presentaron valores ligeramente mayores (H_{Nei}= 0.65-0.75), incluso el sitio S en el cual únicamente se muestrearon dos individuos. El valor de heterocigosidad promediado para todo CAPA fue similar al encontrado para toda la Isla Cozumel (H_{Nei}= 0.67 vs. 0.68; Cuadro 7).

Cuadro 7. Diversidad genética de *Oryzomys couesi*

Sitio	N	H _O *	H _E *	H _{Nei} **
sitio 3	26	0.600	0.712	0.699
sitio 5	34	0.629	0.688	0.678
sitio 7	26	0.608	0.672	0.659
sitio 9	10	0.660	0.639	0.607
sitio 2	18	0.644	0.669	0.650
sitio 4	23	0.591	0.682	0.667
sitio 6	27	0.644	0.652	0.640
sitio 8	38	0.574	0.655	0.646
NW	7	0.686	0.736	0.684
E	8	0.800	0.747	0.700
N	9	0.622	0.792	0.748
S	2	0.800	0.867	0.650
CAPA	202	0.613	0.677	0.675
Cozumel	228	0.624	0.690	0.689

* Levene, 1949

** Nei 1973

Las distancias genéticas entre los sitios de CAPA son menores que entre los sitios de CAPA y los sitios al E y N de la isla (Cuadro 8). Dentro de CAPA las distancias genéticas oscilaron entre 0.01 y 0.07, mientras que entre los sitios de CAPA y los sitios E y N los valores de distancias genéticas oscilaron entre 0.07 y 0.17. El sitio al NW de la isla fue el más similar genéticamente a los de CAPA ya que presentó distancias genéticas entre 0.020 y 0.071, valores similares a los encontrados entre sitios dentro de CAPA. Las distancias genéticas de cualquier sitio fuera o dentro de CAPA con el sitio al S de la isla fueron mayores (oscilaron entre 0.06-0.42), pero es necesario confirmarlo aumentando el tamaño de muestra en este sitio ($N= 2$). La prueba de Mantel indicó que existe una correlación estadísticamente significativa de las distancias genéticas y las distancias geográficas entre sitios (coeficiente de correlación= 0.702, $P= 0.007$). Esta correlación se mantiene incluso si se omite el sitio S del análisis (coeficiente de correlación= 0.650, $P= 0.019$). Por lo tanto, existe una relación entre la distancia genética y la geográfica en los sitios muestreados.

La diferenciación genética entre sitios basada en R_{ST} , así como el número absoluto de migrantes (M) se presentan en el Cuadro 9. Varios sitios dentro y fuera de CAPA mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$). Los sitios 3, 5 y E fueron los que presentaron un mayor número de diferencias significativas con el resto de los sitios. Curiosamente, el sitio 3 se diferenció de sitios de CAPA y no de las poblaciones más alejadas al NW, E, N y S de Cozumel. Algunos valores pareados de R_{ST} resultaron negativos, debido a que la suma de cuadrados promedio de las diferencias en el tamaño de alelos dentro de los sitios (S_W) fue mayor que la diferencia cuadrada promedio entre los pares de copias (\hat{S}). Esto significa que no hay diferenciación genética entre poblaciones. El número de migrantes intercambiados entre sitios significativamente diferenciados alcanzó los 20 individuos, mientras que entre otros sitios los valores de M fueron mayores. Algunos valores de M entre sitios no pudieron calcularse debido a que los valores de R_{ST} fueron negativos o equivalentes a cero, por lo que no hay diferenciación entre los sitios y el número de migrantes estimado es infinito.

Los valores de θ_H para Cozumel y CAPA fueron similares (Cozumel: $\theta_H= 2.876$; CAPA: $\theta_H= 2.718$ mutaciones por generación). El tamaño efectivo poblacional (N_e) para Cozumel varió entre 720 y 72,000 individuos, y para CAPA varió entre 680 y 68,000 individuos, considerando tasas de mutación de 1×10^{-3} y 1×10^{-5} , respectivamente.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para todas las muestras de Cozumel y para únicamente las muestras de CAPA, mostró que la variación entre sitios fue baja pero estadísticamente significativa (Cozumel: 2.88%, $P_{RST} < 0.001$; CAPA: 1.71%, $P_{RST} = 0.011$), y que el mayor porcentaje de la variación se encontró dentro de los sitios (Cozumel: 97.12%; CAPA: 98.29%). Pensando que el tamaño de muestra del sitio S ($N= 2$) pudiera estar sesgando el análisis, se realizó un AMOVA sin este sitio y los resultados fueron similares (los datos no se muestran). Estos resultados apoyan lo

observado con la prueba de Mantel y de diferenciación genética significativa entre sitios dentro y fuera de CAPA, donde se observó que hay cierta estructuración poblacional en Isla Cozumel.

En el análisis de estructuración de las poblaciones basado en su perfil genotípico y sin utilizar información previa, se encontró que la máxima probabilidad del número de poblaciones fue para $K=1$ [$\ln P(K) = -3801.4$, $\alpha = 0.66$], pero el menor valor de admixión fue para un grupo de $K=5$ [$\ln P(K) = -4300.4$, $\alpha = 0.148$]. Como el valor de K donde se presenta la mayor probabilidad logarítmica posterior no es equivalente al valor de K con el menor valor de admixión, entonces el número de poblaciones estimado corresponde a un rango entre estos dos valores de K (Pritchard *et al.*, 2000). Esto significa que los genotipos con los 5 loci son muy similares entre sitios y que los grupos o poblaciones definidos por las frecuencias alélicas son mayores o iguales que 1 pero menores o iguales que 5.

Los resultados del análisis de asignación mostraron que los individuos fueron generalmente asignados por su genotipo a un sitio diferente de donde fueron muestreados, lo que está relacionado con el alto número de migrantes encontrado entre sitios y a la distribución de los alelos en todo lo largo y ancho de la isla. Las mayores probabilidades de asignación se obtuvieron para los sitios 9 y NW, donde entre el 30 y 37% de los individuos fueron asignados correctamente por su genotipo al sitio de muestreo. En otros sitios no se pudieron asignar individuos basándose en su genotipo (sitios 7, N y S). En los demás sitios se obtuvieron entre 5 y 20% de individuos correctamente asignados.

Cuadro 8. Distancia genética de Nei (debajo de la diagonal) y distancias geográficas (arriba de la diagonal) entre sitios

	sitio 3	sitio 5	sitio 7	sitio 9	sitio 2	sitio 4	sitio 6	sitio 8	NW	E	N	S
sitio 3	-	1.246	2.406	3.614	2.083	2.218	2.886	3.802	8.777	7.533	9.602	17.455
sitio 5	0.048	-	1.167	2.373	2.716	2.184	2.269	2.878	9.892	8.033	10.733	16.455
sitio 7	0.023	0.009	-	1.208	3.513	2.596	2.071	2.154	11.014	8.497	11.745	15.454
sitio 9	0.031	0.055	0.035	-	4.556	3.471	2.579	2.026	12.160	9.188	12.858	14.501
sitio 2	0.036	0.040	0.025	0.046	-	1.286	2.503	3.703	9.418	5.454	8.324	16.902
sitio 4	0.068	0.031	0.025	0.069	0.040	-	1.218	2.419	10.490	5.923	9.536	15.732
sitio 6	0.046	0.024	0.013	0.035	0.028	0.042	-	1.201	11.523	6.609	10.713	14.664
sitio 8	0.026	0.045	0.019	0.031	0.029	0.049	0.023	-	12.558	7.443	11.888	13.653
NW	0.020	0.035	0.050	0.065	0.057	0.071	0.053	0.035	-	12.417	8.448	26.186
E	0.078	0.132	0.082	0.129	0.124	0.124	0.107	0.112	0.157	-	6.747	16.996
N	0.126	0.088	0.142	0.170	0.169	0.157	0.144	0.144	0.081	0.126	-	23.580
S	0.320	0.258	0.336	0.419	0.312	0.391	0.323	0.314	0.180	0.337	0.067	-

Cuadro 9. Valores de R_{ST} (debajo de la diagonal) y de M (arriba de la diagonal) entre sitios

	sitio 3	sitio 5	sitio 7	sitio 9	sitio 2	sitio 4	sitio 6	sitio 8	NW	E	N	S
sitio 3	-	9.001	48.866	7.227	51.818	11.330	6.541	158.223	39.871	10.717	46.432	3.621
sitio 5	0.053	-	X	9.119	75.304	X	591.832	19.967	X	2.314	11.571	2.365
sitio 7	0.010	-0.002	-	14.487	X	X	133.054	X	X	3.980	25.853	3.297
sitio 9	0.065	0.052	0.033	-	5.020	51.300	38.818	29.953	7.629	5.508	14.489	3.635
sitio 2	0.010	0.007	-0.007	0.091	-	20.213	12.580	32.302	X	3.470	19.987	3.135
sitio 4	0.042	-0.004	-0.008	0.010	0.024	-	X	1046.366	X	2.586	9.971	1.860
sitio 6	0.071	0.001	0.004	0.013	0.038	-0.012	-	24.975	162.870	2.294	9.163	2.408
sitio 8	0.003	0.024	-0.006	0.016	0.015	0.000	0.020	-	X	5.423	25.109	3.159
NW	0.012	-0.009	-0.021	0.062	-0.031	-0.008	0.003	-0.010	-	2.991	14.138	1.648
E	0.045	0.178	0.112	0.083	0.126	0.162	0.179	0.084	0.143	-	600.412	X
N	0.011	0.041	0.019	0.033	0.024	0.048	0.052	0.020	0.034	0.001	-	X
S	0.121	0.175	0.132	0.121	0.138	0.212	0.172	0.137	0.233	-0.015	-0.007	-

Valores significativos en negritas ($P < 0.05$)

Las X's representan valores de M que no se pueden calcular porque $R_{ST} \leq 0$.

Se obtuvo un solo árbol de NJ (Fig. 4), a pesar de que la búsqueda heurística se realizó sin un límite máximo de árboles, por lo tanto, este árbol de distancias es el único posible. Los sitios de CAPA formaron un agrupamiento distanciado genéticamente de los sitios NW, N y S. El sitio 5 se alejó de los demás sitios de CAPA, mientras que el sitio E quedó agrupado con el sitio 3 ya que su distancia genética pareada fue menor que con el resto de los sitios. Los dos sitios más sureños de CAPA, sitios 9 y 8, formaron un grupo poco distanciado del sitio 6, y a su vez estuvieron más cercanos con el grupo de los sitios 2 y 4.

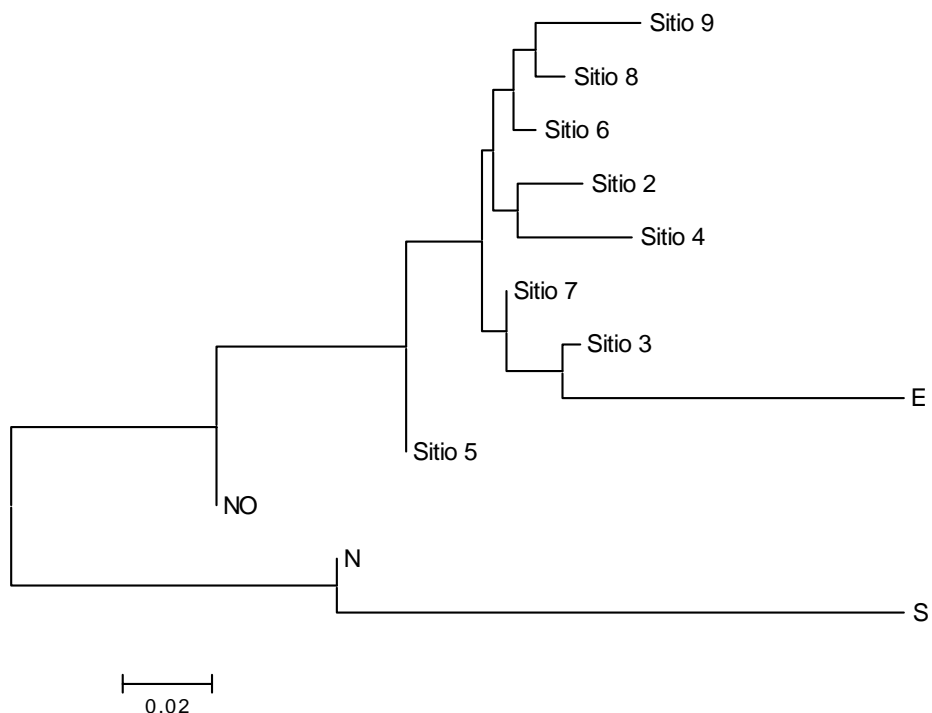


Figura 4: Árbol construido por el método de NJ utilizando distancias genéticas de Nei (1978) entre sitios de Cozumel. Una búsqueda heurística encontró sólo esta topología.

No se encontró evidencia de cuellos de botella en ninguna de las poblaciones de CAPA, asociados a un exceso de heterocigosidad significativo. Bajo el modelo de dos fases, TPM (90% SMM y 10% IAM, varianza= 10), se encontraron 5 sitios de CAPA (sitios 3, 5, 9, 2 y 6) con una deficiencia de heterocigosidad significativa ($P < 0.05$). Al hacer el TPM más semejante al modelo de alelos infinitos (70% SMM y 30% IAM, varianza= 10), sólo una población presentó deficiencia de heterocigosidad significativa (sitio 9, $P < 0.05$). Se realizó el mismo análisis pero aumentando la varianza a 30 y los resultados fueron similares (los datos no se muestran) indicando que no hay evidencias de cuellos de botella.

6.2 Filogeografía de *Oryzomys couesi*

De los 884 pb de cyt b secuenciados, 47 sitios fueron variables y 27 fueron pasimoniosamente informativos. Para la muestra total (península de Yucatán, Chiapas y Cozumel) se encontraron 18 haplotipos. Se encontró un valor alto de diversidad genética $Hd= 0.939$, y se encontraron valores de diversidad nucleotídica $\pi= 0.01010 \pm 0.00202$. El número promedio de diferencias nucleotídicas fue $k= 8.019$. La mayor diversidad nucleotídica por población se encontró en Chiapas y la menor en Cozumel (Cuadro 10). La diversidad nucleotídica de Cozumel fue significativamente 2.2 veces menor que la de Campeche y 3.4 veces menor que la de Chiapas ($P < 0.05$).

Cuadro 10. Diversidad nucleotídica por población

	N	π	d. s.	k
Cozumel	18	0.005	0.001	3.954
Campeche	5	0.011	0.002	9.1
Chiapas	5	0.017	0.005	14.8

$P < 0.05$

Los valores de divergencia D_a y D_{xy} se presentan en el Cuadro 11. Las poblaciones de Cozumel y Campeche fueron las más similares, mientras que ambas presentaron una mayor divergencia respecto a la de Chiapas.

Cuadro 11. Valores de D_a (debajo de la diagonal) y D_{xy} (arriba de la diagonal) entre poblaciones

	Cozumel	Campeche	Chiapas
Cozumel	-	0.00889	0.01508
Campeche	0.00067	-	0.01932
Chiapas	0.00417	0.00429	-

En el árbol de NJ se observó que los valores de *bootstrap* fueron bajos en general y las distancias genéticas entre muestras fueron pequeñas, incluso muchos haplotipos fueron idénticos. Cozumel presentó varios haplotipos, pero con un bajo número de sustituciones nucleotídicas y poca distancia entre ellos (Fig. 5 a y b). Dentro de Cozumel varios haplotipos fueron idénticos, pero nunca fueron idénticos a los encontrados en Campeche y Chiapas. Las muestras de Chiapas fueron las más distanciadas y con valores más altos de *bootstrap*. Las muestras de Cozumel no formaron un grupo monofilético; 5 muestras de Cozumel se encontraron distanciadas del resto, mientras que 13 se ubicaron en un solo clado. Este clado estuvo cercanamente relacionado con una muestra de Campeche (31708) con un valor de *bootstrap* de 56. Las muestras de Campeche tampoco formaron un grupo monofilético y se encontraron cercanas a muestras de Cozumel o de Chiapas. Por otro lado, las muestras de Chiapas formaron dos clados separados, uno de ellos relacionado con una muestra de Campeche (30753), y a su vez externo respecto al

primer grupo de Cozumel, y otro clado con dos individuos más distanciados. Los grupos externos, representados por *O. megacephalus* y *C. callosus*, quedaron muy distanciados genéticamente de las muestras continentales e insulares de *O. couesi*.

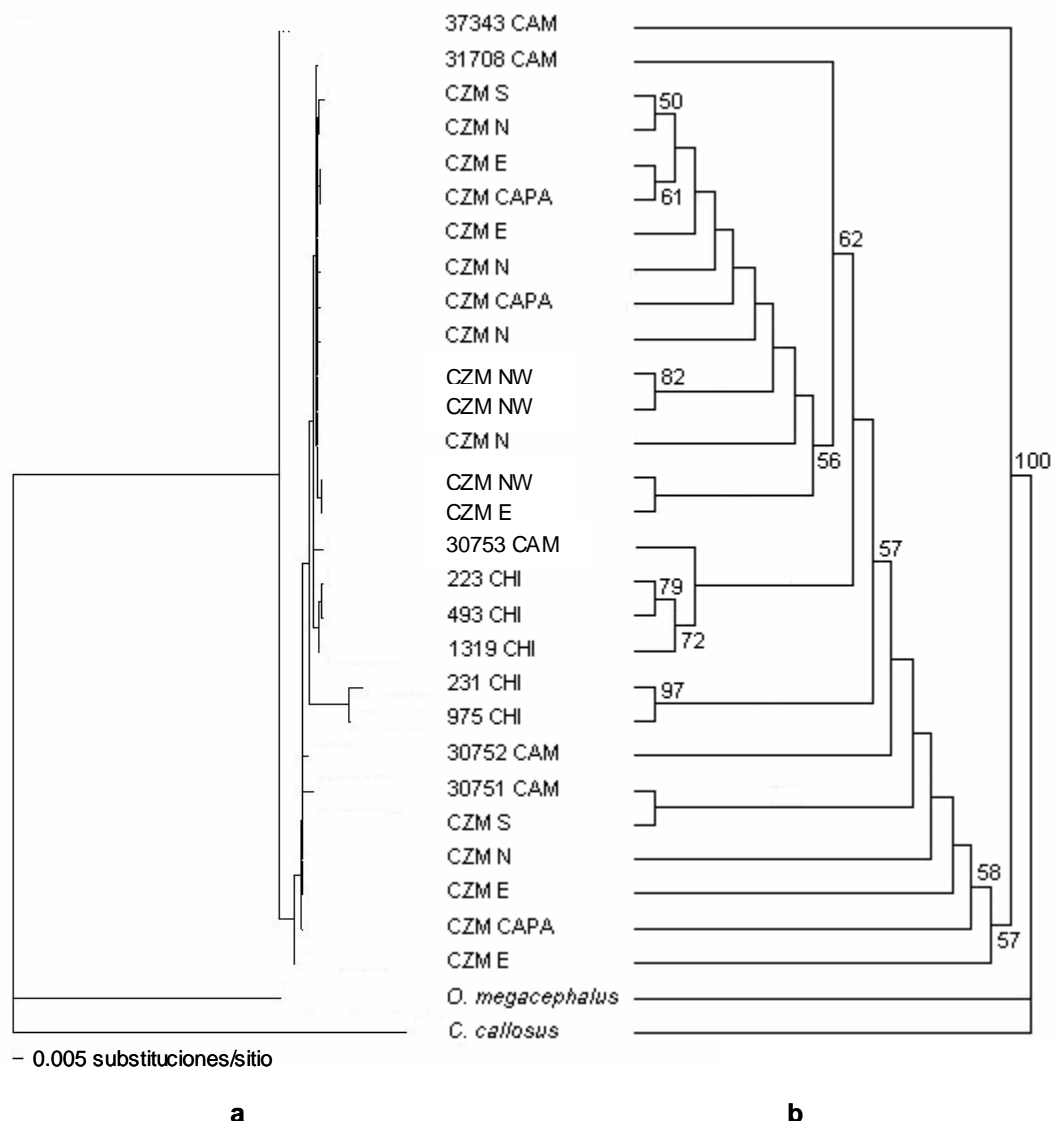


Figura 5: Árbol de NJ de muestras de Cozumel (CZM), Campeche (CAM) y Chiapas (CHI). a: filograma; b: cladograma rectangular. Valores de bootstrap (> 50%) sobre las ramas.

En la red mínima de haplotipos se observó algo similar (Fig. 6). Las muestras de Cozumel se distribuyeron en varios sitios de la red, lo que resalta nuevamente la diversidad haplotípica de la población isleña. Sin embargo, se presentaron 6 muestras de Cozumel idénticas entre sí formando un grupo central del cual se prolongaron varios haplotipos separados por uno o dos pasos mutacionales. Otras muestras de Cozumel quedaron más alejadas y formaron un segundo grupo con 4 muestras con haplotipos idénticos. Todas las muestras de Campeche quedaron más cercanas a las muestras isleñas que a las de Chiapas, pero generalmente separadas por varios pasos mutacionales. En particular, sólo una muestra de Campeche (31708) quedó unida al resto de

las de Cozumel por un paso mutacional y corresponde a la que geográficamente está más cercana a la isla (Fig. 3). Tres muestras de Chiapas (1319, 223 y 493) quedaron unidas por 5 pasos mutacionales al grupo central de Cozumel. Estas muestras de Chiapas son las que en el árbol de NJ formaron un clado distanciado pero unido a una muestra de Campeche (30753) y a muestras de Cozumel. Otras dos muestras de Chiapas (975 y 231) formaron una red separada y aislada del resto (> 12 pasos mutacionales), y son las mismas que en el árbol de NJ formaron un clado más distanciado y separado del resto de las muestras de Cozumel y Campeche. Además, son éstas las que geográficamente se encuentran más distantes a Cozumel (ver Fig. 3).

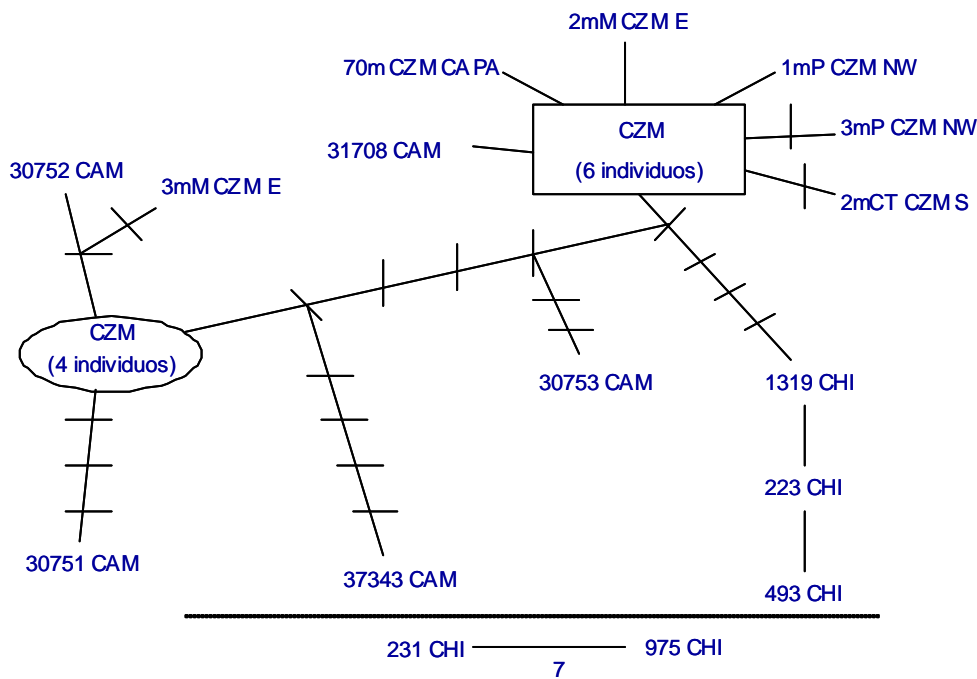


Figura 6: Red mínima de haplotipos de muestras de Cozumel (CZM), Campeche (CAM) y Chiapas (CHI).
Cada segmento corresponde a un paso mutacional.

Finalmente, la distribución de las frecuencias pareadas (distribución “*mismatch*”) mostró una distribución bimodal de las muestras de Cozumel, la cual se presenta cuando las poblaciones están geográficamente subdivididas o son resultado de varios eventos de colonización. También, se presentó una firma demográfica de expansión poblacional estadísticamente significativa bajo la prueba de Ramos-Onsins y Rozas comparando la distribución observada con la esperada asumiendo un modelo de expansión ($R_2= 0.1055$; Fig. 7).

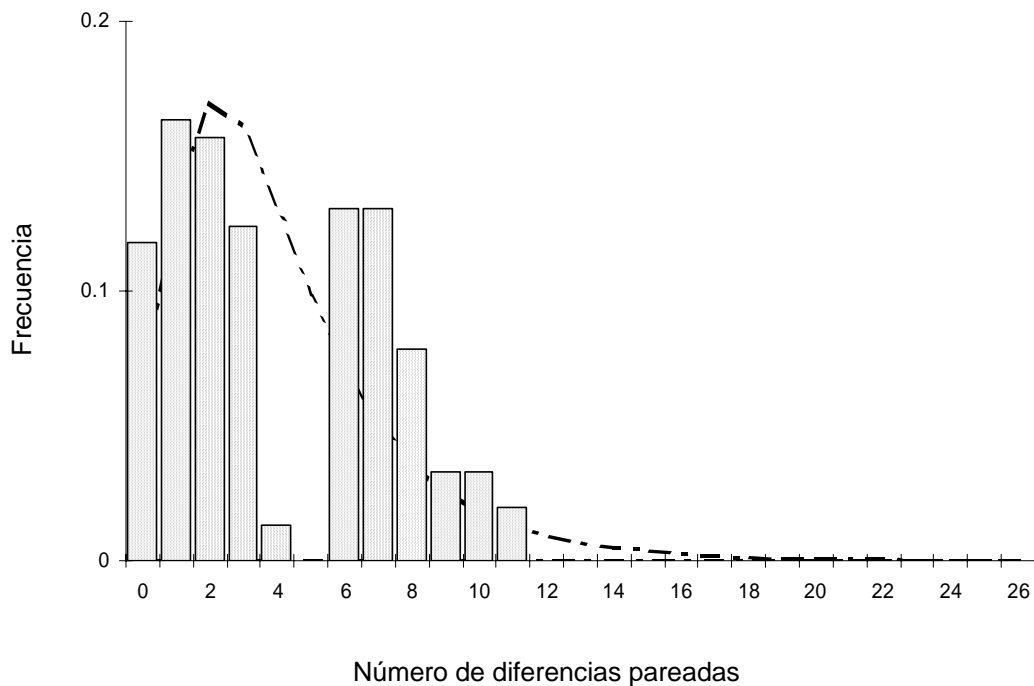


Figura 7: Distribución de diferencias pareadas (distribución “mismatch”) para las muestras de Isla Cozumel. La línea punteada corresponde a la distribución esperada y las barras a la observada. La distribución observada corresponde a una firma demográfica de expansión poblacional y el patrón bimodal corresponde a poblaciones geográficamente subdivididas o varios eventos de colonización.

VII. Discusión

Se encontró una alta diversidad genética para la población de la isla y dentro de cada sitio de muestreo en Cozumel, que contrasta con lo esperado bajo la teoría de genética de poblaciones en islas (Kilpatrick, 1981; Frankham, 1996; 1997; 1998). En varios trabajos con mamíferos pequeños y medianos en islas se han encontrado valores de diversidad genética observada y esperada menores a los encontrados en *O. c. cozumelae* (Cuadro 12). Los bajos valores de diversidad genética en el demonio de tasmania *Sarcophilus laniarius* (Jones *et al.*, 2004), por ejemplo, pudieron ser resultado de un efecto fundador y posterior aislamiento en la isla de Tasmania desde hace 10,000 a 12,000 años, así como por un efecto del sesgo reproductivo en donde sólo unos cuantos machos dominan la paternidad. El wallaby *Petrogale lateralis* (Eldridge *et al.*, 1999), presenta también bajos valores de diversidad genética relacionados con el aislamiento en la isla Barrow por cientos de generaciones dada su baja capacidad de dispersión por el agua, además de presentar una población poco numerosa (aproximadamente 150 individuos) sujeta a endogamia. En los trabajos de *Rattus fuscipes greyii* (Hinten *et al.*, 2003) la mayor diversidad genética se encontró en la isla Kangaroo, la de mayor tamaño con 400,000 ha, así como una mayor

diversidad genética en islas de menor tamaño cercanas al continente respecto a islas de menor tamaño lejanas al continente.

Cuadro 12. Valores de heterocigosidad con microsatélites para mamíferos pequeños y medianos

Especie	N	H _{Obs}	H _{Esp}	H _{Nei}	# Loci	Referencia
<i>Oryzomys couesi</i> <i>cozumelae</i> ¹	228	0.574-0.686	0.639-0.792	0.607-0.750	5	Este trabajo
<i>Rattus rattus</i> ¹	266	0.43-0.68	0.42-0.69	-	8	Abdelkrim <i>et al.</i> , 2005
<i>Glaucomys sabrinus</i> <i>griseifrons</i> ¹	233	0.128-0.644	0.247-0.624	-	6	Bidlack y Cook, 2002
<i>Petrogale lateralis</i> ¹	29	-	0.05-0.27	0.053	10	Eldridge <i>et al.</i> , 1999; 2004
<i>Lagorchestes hirsutus</i> ¹	25	-	0.25	-	8	Eldridge <i>et al.</i> , 2004
<i>Macropus eugenii</i> ¹	29	-	0.44	-	7	Eldridge <i>et al.</i> , 2004
<i>Rattus fuscipes greyii</i> ¹	81	-	0.03-0.83	-	6	Hinten <i>et al.</i> , 2003
<i>Sarcophilus lanarius</i> ¹	262	0.399-0.475	0.386-0.419	-	11	Jones <i>et al.</i> , 2004
<i>Sorex araneus</i> ²	49	0.64	0.702	-	12	Lugon-Moulin, 2000
<i>Marmota marmota</i> ²	588	0.58	0.74	-	6	Goossens <i>et al.</i> , 2001
<i>Microtus oeconomus</i> ³	182	0.61-0.82	0.57-0.76	-	8	Van de Zande <i>et al.</i> , 2000
<i>Arvicola terrestris</i> ³	628	0.73-0.85	0.80-0.85	-	8	Berthier <i>et al.</i> , 2005

¹ Isla

² Valle

³ Área no fragmentada

Los niveles de diversidad genética en poblaciones isleñas están relacionados, entre otras cosas, con el área o tamaño de la isla, debido a que islas de mayor tamaño pueden albergar mayores tamaños poblacionales, evitándose así la endogamia y la deriva genética que pueden disminuir la variabilidad y en ciertos casos ocasionar la extinción de las poblaciones. Asimismo, se ha reportado que en islas puede darse el “efecto cerca” (*fence effect*) que provoca un aumento de las densidades poblacionales por la prevención y selección en contra de la migración (Adler *et al.*, 1986). Cozumel es una de las islas de mayor tamaño de México y la de mayor tamaño en el Caribe mexicano, con aproximadamente 486 km², y alrededor del 75% de la isla está cubierta por vegetación de selva mediana subperenifolia y en el 2000 el 90% estaba cubierta por vegetación nativa (Cuarón *et al.*, 2004; Romero-Nájera y Cuarón, datos sin publicar). Estos factores, entre otros, pueden estar promoviendo que *O. c. cozumelae* presente densidades poblacionales suficientemente altas como para evitar la endogamia y deriva génica, y permitiendo a su vez que se mantengan altos niveles de diversidad genética en comparación con los encontrados en otras especies isleñas.

Los datos sugieren que varias poblaciones no se encuentran en equilibrio de mutación-deriva y han experimentado una reciente expansión en el tamaño poblacional o una introducción de alelos raros a partir de inmigrantes genéticamente distintos. La expansión poblacional evita que alelos raros se pierdan y la introducción de alelos por inmigrantes provocan que el número de alelos raros se incremente y que la heterocigosidad esperada sea significativamente mayor que la

observada, por lo que no hay una deficiencia de alelos ni un exceso de heterocigosidad observada respecto a la esperada, características de un cuello de botella poblacional.

Los cambios estacionales (temporada seca y de lluvias), las especies introducidas como serpientes, ratas, ratones, perros y gatos, los depredadores y competidores naturales, los huracanes y la actividad antropogénica comúnmente afectan la estructura y diversidad genética de las poblaciones isleñas (Frankham, 1996; 1997; 1998; Alcover *et al.*, 1998; Álvarez-Castañeda y Ortega-Rubio, 2003). El que se haya encontrado evidencia de expansión poblacional, como la deficiencia de heterocigosidad en varias poblaciones y una firma demográfica de expansión a partir de las diferencias pareadas para Cozumel, así como altos valores de diversidad genética y alélica, sugiere que estos factores de perturbación en islas no han afectado, a nivel genético, a las poblaciones de *O. c. cozumelae*.

Se ha observado que los tamaños poblacionales de *O. c. cozumelae* cambian estacionalmente (Gutiérrez-Granados, 2003; Fortes-Corona, 2004), sin embargo, los resultados sugieren que la reducción anual en el tamaño poblacional no es lo suficientemente drástica como para producir un cuello de botella o endogamia detectable. Además, durante un muestreo de 7 meses se observó que no hay diferencias estacionales significativas entre la actividad e inactividad reproductiva de los individuos, donde se encontraron individuos en estado reproductivo todo el año (Fortes-Corona, 2004). También, las poblaciones naturales de roedores de la isla han estado sometidas históricamente a perturbaciones por huracanes, por lo que los efectos sobre la dinámica poblacional pudieran no ser tan drásticos como para las especies de roedores introducidas. Si la población disminuye su tamaño durante la época seca y/o después de un huracán (aumentando nuevamente durante la época de lluvias) sin llegar a un cuello de botella y además existe la posibilidad de reproducirse todo el año o durante varios meses, puede estarse evitando la pérdida de alelos y aquellos alelos raros pueden pasar a las siguientes generaciones. Sin embargo, es importante mencionar que en 2005 se presentaron dos huracanes que afectaron notablemente a la isla: Emily (17 de julio de 2005) y Wilma (21-24 de octubre de 2005). Sería interesante evaluar la diversidad genética post-huracán y contrastarla con los valores obtenidos en este estudio realizado antes de estos huracanes, así como darle un seguimiento en términos poblacional y genético.

Los depredadores introducidos como perros y gatos se distribuyen en toda la isla, pero presentan una mayor abundancia cerca de las poblaciones humanas que en sitios más alejados (Bautista-Denis, 2006). Esto puede estar ligado a una menor probabilidad de ser depredado en la selva por estas especies introducidas. La boa, *Boa constrictor*, fue introducida en la isla en 1971 (Martínez-Morales y Cuarón, 1999) y es un depredador de ratas y ratones endémicos (González-Baca, 2006), así como de otros vertebrados. El hecho de que, aún en presencia de la boa, las poblaciones de *O. c. cozumelae* sean abundantes puede estar relacionado con el hecho de que en la isla se distribuyen dos especies de colúbridos como la serpiente lagartijera olivácea (*Dryadophis melanomulus*; A. D. Cuarón, datos no publicados) y el bejuquillo (*Oxybelis fulgidus*), y que este

roedor no sea tan ingenuo (*i. e. naiveté*) para evadir depredadores como otras especies isleñas (Williamson, 1981; Mellink *et al.*, 2002). Otros posibles depredadores naturales como las aves de presa diurnas (*Falco columbarius*, *F. peregrinus*, *F. ruficularis*, *Buteo brachyurus fuliginosus*, *Elanoides forficatus*) no se distribuyen comúnmente en selva mediana subcaducifolia (Fortes-Corona, 2004). Otros depredadores potenciales para *O. c. cozumelae* son el tejón de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), pero el estado de sus poblaciones es crítico y con seguridad se encuentran en muy bajas densidades (Cuarón *et al.*, 2004). El efecto de la depredación de estas especies sobre *O. c. cozumelae* puede ser no tan drástico, por lo que podrían mantenerse mayores densidades poblacionales en comparación con otras especies de roedores de la isla y no la está empujando hacia cuellos de botella.

Las ratas y ratones introducidos (*Rattus* spp. y *Mus musculus*) son posibles competidores y especies exitosas en otros ambientes isleños (Alcover *et al.*, 1998; Álvarez-Castañeda y Ortega-Rubio, 2003). Sin embargo, a pesar de que estas especies eran comunes en la década de los 1980, sólo se ha atrapado una rata durante cuatro años y medio (2001 al presente) de trabajo de captura-recaptura en la zona rural de la isla (A. D. Cuarón, com. pers.). Por el contrario, se han atrapado individuos de estas especies en restaurantes de playa, en el basurero municipal, así como en la zona urbana, por lo que se puede pensar que su presencia en la isla está estrechamente ligada a los asentamientos humanos. Por esto, puede sugerirse que actualmente las especies de ratas y ratones introducidas no excluyen competitivamente a *O. c. cozumelae* en la selva de Isla Cozumel como se ha dado en otras islas. La competencia interespecífica puede afectar a algunos de los componentes más importantes de la adecuación, como son la supervivencia, la reproducción y el uso del espacio (Eccard y Ylönen, 2002). Además de *O. c. cozumelae*, existen registrados en la isla otros dos taxa de roedores nativos (ambos endémicos), *Reithrodontomys spectabilis* y *Peromyscus leucopus cozumelae*, quienes podrían competir interespecíficamente a nivel individual y poblacional con *O. c. cozumelae*. La primera es una especie de ratón de menor tamaño que *Oryzomys*, con hábitos semiarborícolas y con menor densidad poblacional (Gutiérrez-Granados, 2003; Fortes-Corona, 2004), por lo que el uso del espacio y supervivencia pueden diferir. Por ejemplo, se ha observado que el uso de hábitat de *O. palustris* difiere y es más variable entre estaciones que la de *R. fulvescens* en una pradera costera en Texas, EU (Kincaid *et al.*, 1983). También, el uso diferencial del hábitat puede ser resultado de las diferencias entre especies para cosechar y defender los recursos, susceptibilidad a depredadores y parásitos, y en sus historias de vida. La selección del hábitat por denso-dependencia puede ser un mecanismo para mitigar los efectos negativos de la competencia, tal como se ha probado para *Dicrostonyx* y *Lemmus* (Morris *et al.*, 2000). Si en Cozumel se estuviera presentando un fenómeno similar, pudiera darse una coexistencia de estas especies disminuyéndose la competencia por una distribución diferencial del hábitat. *P. l. cozumelae* es una subespecie que presentaba una mayor densidad poblacional que *O. c. cozumelae* (Engstrom *et al.*, 1989) pero que se cree que está extinta dado que no se ha

capturado desde 1989 (Fortes-Corona, 2004); si este es el caso, entonces en la isla hay un posible competidor menos y una liberación de recursos que pueden ser utilizados por *O. c. cozumelae*. Podría suponerse que el efecto de la competencia interespecífica sobre la adecuación de *O. c. cozumelae* no es tan drástica, por lo que sus densidades no son tan bajas evitándose así la endogamia y la pérdida de alelos raros.

La población isleña presentó una clara estructuración y una correlación significativa con la distancia geográfica, lo que sugiere que está conformada por varias subpoblaciones. Con el análisis de varianza tomando todas las muestras de la isla o únicamente a las de CAPA, un pequeño porcentaje de la variación entre los sitios resultó ser significativo, lo que está de acuerdo con la correlación genética y geográfica. Sin embargo, la distribución de la variación se concentró principalmente dentro de las poblaciones debido a que por su genotipo casi no se encontraron individuos idénticos. De hecho, la diversidad de genotipos fue tal que el análisis de asignación no pudo asignar a los individuos a los sitios donde fueron capturados, y el análisis de estructuración poblacional basado en genotipos determinó que en la isla se presentan entre 1 y 5 poblaciones dependiendo de si se toma el valor de mayor probabilidad logarítmica posterior para un cierto número de poblaciones ($K= 1$) o si se toma el menor valor de admixia ($K= 5$). Los resultados contrastantes sobre estructura genética se pueden deber a la diferente sensibilidad de los métodos utilizados; por un lado están las comparaciones pareadas y el análisis de varianza molecular que utilizan valores de diferenciación genética entre sitios, y por otro lado los métodos de asignación genética y estructuración bayesiana que utilizan directamente a los genotipos.

Se ha documentado que los caminos pueden interrumpir o disminuir el movimiento de individuos de un sitio a otro (McDonald y St. Clair, 2004; Goosem y Marsh, 1997; Goosem, 2001); en el caso de Cozumel el número de migrantes por generación estimado de manera indirecta a partir de R_{ST} entre los sitios fue alto en la mayoría de los casos. Estos datos contrastan con lo encontrado en trabajos de captura-recaptura en la isla en donde pocos individuos capturados en un sitio fueron recapturados en otro (Fortes-Corona, 2004). El poco movimiento de individuos que pudiera darse ocasionalmente entre sitios puede estar evitando la diferenciación genética. Sin embargo, los caminos de la zona de captación de agua no están fragmentando la isla dado que no la cruzan en su totalidad, por lo que si los roedores no cruzan frecuentemente los caminos o evitan acercarse a los bordes, pueden rodearlos. Al contrario, la carretera transversal sí fragmenta a la isla en norte y sur, por lo que puede tener un efecto sobre la estructuración genética observada. Por otro lado, los altos valores de flujo génico pueden ser resultado de la distribución histórica casi equitativa de las frecuencias alélicas entre sitios y no necesariamente al movimiento de individuos de un sitio a otro. Si efectivamente los roedores se ven afectados en cierta medida por los caminos, tal vez el tiempo desde su construcción en de la isla no ha sido suficiente para diferenciar a las poblaciones.

Pueden considerarse varios escenarios que expliquen la alta diversidad alélica y genética de *O. couesi* en la isla: 1) si la población isleña proviene de un solo evento de colonización, los migrantes deben haber sufrido un cuello de botella, pero al encontrarse en un ambiente adecuado sin depredadores y competidores la población se expandió y actualmente hay frecuencias alélicas similares entre sitios por migración y expansión poblacional, pocos alelos exclusivos para un sitio o área particular, así como una gran diversidad de alelos debido a la alta tasa de mutación en microsatélites; 2) si la población isleña proviene de varios eventos de migración continente-isla propiciados por huracanes, lluvias e inundaciones, o movimientos humanos, ello podría explicar la alta diversidad de alelos, dada la introducción de alelos diferentes a la isla en momentos distintos desde la formación de la misma. Ambos escenarios son factibles, pero dado el tiempo, el tamaño y la distancia de la isla al continente (MacArthur y Wilson, 1967) es más probable que hayan ocurrido varios eventos de colonización de Isla Cozumel.

En el árbol de NJ se puede observar que no se forman grupos monofiléticos exclusivos para las muestras de Cozumel, Campeche o Chiapas. En la red mínima de haplotipos también se observa que las muestras de Cozumel no forman una red separada de las muestras de Campeche y de Chiapas, aunque sí respecto a las muestras de Chiapas provenientes de la costa del Pacífico e istmo de Tehuantepec. Dentro de la isla se presentaron varios haplotipos, en particular dos de ellos muy frecuentes y a su vez cercanos a los de Campeche. Es interesante resaltar que la muestra de Campeche genéticamente más cercana a las de Cozumel es la que geográficamente también se encuentra más cercana. Los haplotipos de Chiapas quedaron siempre más distanciados, en especial las dos muestras de la costa Pacífica e istmo de Tehuantepec que formaron una red separada, y esto puede deberse a la mayor distancia y aislamiento geográfico respecto a Campeche y Cozumel. En la red mínima de haplotipos se observa una distribución en forma de estrella a partir del genotipo más común de Cozumel y que se asocia a otros haplotipos de la isla, y que generalmente se relaciona a eventos de rápida expansión. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos y discutidos anteriormente sobre posible expansión poblacional. Estos datos sugieren, como era de esperarse, que el origen de la población de la isla ocurrió a partir de la migración de *O. couesi* proveniente de la península de Yucatán. También, la presencia de dos grupos separados de muestras de Cozumel en la red de haplotipos y la distribución bimodal de las diferencias pareadas sugieren la posibilidad de varios eventos de colonización continente-isla (Rowe *et al.*, 2004). Es necesario ampliar la muestra de *O. couesi* peninsular y continental para determinar el patrón filogeográfico de la isla y evaluar más precisamente su origen.

En los últimos dos años (2004-2006) el éxito de captura de *O. couesi* en la península de Yucatán ha sido muy bajo a pesar de un gran esfuerzo de muestreo (observación personal). La falta de un mayor número de muestras de *O. couesi* continentales hace imposible señalar exactamente el lugar de origen de la población isleña y presentar un análisis filogeográfico más completo. Seguramente el menor éxito de captura de *O. couesi* en la península de Yucatán

significa que esta especie se encuentra en densidades poblacionales menores que en la isla y le da una mayor importancia, en términos de biodiversidad y conservación, a la población de Cozumel.

La Isla Cozumel presenta menores niveles de presión de cambio de uso de suelo en comparación con la Riviera Maya y el resto de la península (G. Pasquetti, com. pers.). Sin embargo, la introducción de especies exóticas y el incremento notable de la demanda por la construcción hotelera y de infraestructura portuaria en los últimos años (Estadísticas del Medio Ambiente, INEGI-SEMARNAP, México, 1999), trae consigo un aumento de las presiones sobre el ecosistema isleño. En esta isla se distribuyen varias especies endémicas, morfológica y genéticamente distintas a las continentales (Martínez-Morales, 1999; Zink *et al.*, 1999; Cuarón *et al.*, 2004; McFadden, 2004), por lo que es necesario implementar medidas de conservación a corto y largo plazo para evitar la pérdida de diversidad biológica. También, es necesario que se desarrollen más estudios ecológicos, filogeográficos y genéticos de otras especies endémicas para dar mayor robustez a las propuestas de manejo o conservación que se planteen para la Isla Cozumel. Sin embargo, cualquier estrategia de conservación o manejo debe considerar la realidad política y económica del país y de la región. En este estudio se ha demostrado que la población isleña de *O. c. cozumelae* presenta una rica diversidad genética y alélica, así como una estructuración significativa a lo largo de Isla Cozumel, que le da una gran importancia en el ámbito de la conservación de la biodiversidad.

VIII. Conclusión

O. c. cozumelae presenta niveles significativamente altos de diversidad genética y alélica, a pesar de ser una subespecie isleña sujeta al efecto de depredadores naturales e introducidos, competencia interespecífica, cambios estacionales y huracanes, que podrían llevar a las poblaciones a cuellos de botella. La población isleña se encontró estructurada y diferenciada a pesar de haberse estimado altos valores de flujo génico, por lo que no debe considerarse como una única población continua. Tomando en cuenta el bajo número de muestras para el análisis filogeográfico, la población isleña no se ha diferenciado de la peninsular, pero sí se observa que hay una clara estructuración isla-península *versus* continente (muestras de Chiapas), que pueden representar diferentes unidades evolutivamente significativas. La alta diversidad genética en comparación con otras especies isleñas, la estructuración genética y las firmas demográficas de expansión poblacional a pesar de la presencia de especies introducidas, cambios estacionales y otras perturbaciones ecológicas como huracanes, así como el menor éxito de captura de *O. couesi* en la península vuelve a la población o poblaciones isleñas más importantes en términos de conservación.

IX. Bibliografía

- Abdelkrim, J., Pascal, M. and Samadi, S. 2005. Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Mol. Ecol.* **14**: 2923-2931.
- Adler, G. H., Wilson, M. L. and DeRosa, M. J.. 1986. Influence of island area and isolation on population characteristics of *Peromyscus leucopus*. *J. Mammal.* **67**:406-409.
- Alcover, J.A., Sans, A., Palmer, M. 1998. The extent of extinctions of mammals on islands. *J. Biogeo.* **25**: 913-918.
- Alvarez-Castañeda, S. T. and Ortega-Rubio, A. 2003. Current status of rodents on islands in the Gulf of California. *Biol. Cons.* **109**:157-163.
- Avise, J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* **63**: 62-76.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Harvard.
- Bautista-Denis, S. M. 2006. Distribución, abundancia y dieta de perros y gatos ferales en la Isla Cozumel. Posgrado en Manejo de Fauna Silvestre. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa.
- Berthier, K., Galan, M., Foltête, J. C., Charbonnel, N. and Cosson, J. F. 2005. Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Mol. Ecol.* **14**: 2861-28719.
- Bidlack, A. and Cook, J.A. 2002. A nuclear perspective on endemism in north flying squirrels (*Glaucomys sabrinus*) of the alexander Archipelago, Alaska. *Cons. Genet.* **3**: 247-259.
- Brzustowski, J. 2002. Doh assignment test calculator. Available at: <http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>.
- Burbidge, A. A. and Manly, B. F. J. 2002. Mammal extinctions on Australian islands: causes and conservation implications. *J. Biogeo.* **29**:465-473.
- Burbidge, A. A. and Morris, K. D. 2002. Introduced mammal eradications for nature conservation on Western Australian islands: a review. En: Veitch, C. R. and Clout, M. N. (Eds.). *Turning the tide: the eradication of invasive species*. Proceedings of the International Conference on Eradication of Island Invasives. Occasional paper of the IUCN Species Survival Commission **27**.
- Carlquist, S. 1974. *Island biology*. Columbia University Press, USA.
- Chakraborty, R. and Weiss, K. M. 1991. Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation-drift equilibrium. *Am. J. Phys. Anthropol.* **86**: 497-506.
- Clement, M., Posada, D. and Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**:1657-1659.
- Coblentz, B.E. 1990. Exotic organisms: a dilemma for conservation biology. *Cons. Biol.* **4**: 261-265.
- Cornuet, J. M. and Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**:2001-2014.
- Crozier, R.H. 1997. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny and conservation worth. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 243-268.
- Cuarón, A. D., Martínez-Morales, M. A., McFadden, K. W., Valenzuela, D. and Gompper, M. E. 2004. The status of dwarf carnivores on Cozumel Island, Mexico. *Biod. Cons.* **13**: 317-331.
- Darbre, P. D. 1999. *Basic molecular biology: essential techniques*. Wiley. USA.
- Davidson, W. V. 1975. The geographical setting. En: Sablof, J. A. and Rathje, W. L. (Eds.). *Changing Pre-Columbia commercial systems*. Peabody Museum Monograph No. 3. Harvard University. USA.
- Eccard, J. A. and Ylönen, H. 2002. Direct interference or indirect exploitation? An experimental study of fitness costs of interspecific competition in voles. *Oikos* **99**:580-590.
- Eldridge, M. D. B., King, J. M., Loupis, A. K., Spencer, P. B. S., Taylor, A. C., Pope, L. C. and Hall, G. P. 1999. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in an island population of the black-footed rock-wallaby. *Cons. Biol.* **13**: 531-541.
- Eldridge, M.D.B., Kinnear, J.E., Zenger, K.R., McKenzie, L.M. and Spencer, P.B.S. 2004. Genetic diversity in remnant mainland and 'pristine' island populations of three endemic Australian

- macropodids (Marsupialia): *Macropus eugenii*, *Lagorchestes hirsutus* and *Petrogale lateralis*. *Cons. Genet.* **5**: 325-338.
- Engel, S.R., Hogan, K.M., Taylor, J.F. and Davis, S.K. 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American Sigmodontine rodents. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 35-49.
- Engstrom, M.D., Schmidt, C. A., Morales, J. C. and Dowler, R. C. 1989. Records of mammals from Isla Cozumel, Quintana Roo, Mexico. *Southwest. Nat.* **34**: 413-449.
- Esher, R.J., Wolfe, J.L. and Layne, J.N. 1978. Swimming behavior of rice rats (*Oryzomys palustris*) and cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J. Mammal.* **59**: 551-558.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and 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. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, USA. P.p. 664.
- Fortes-Corona, I. A. 2004. *Ecología de roedores endémicos de la isla de Cozumel, Quintana Roo, México*. Tesis de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UdG
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annu. Rev. Genetics* **29**: 305-27.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Cons. Biol.* **10**: 1500-508.
- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**: 311-327.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. *Cons. Biol.* **12**: 665-675.
- González-Baca, C. A. 2006. *Ecología de forrajeo de la boa (Boa constrictor), un depredador introducido a la Isla Cozumel*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Goosem, M. 2001. Effects of tropical rainforest roads on small mammals: inhibition of crossing movements. *Wildlife Res* **28**: 351-364.
- Goosem, M. and Marsh, H. 1997. Fragmentation of a small-mammal community by a powerline corridor through tropical rainforest. *Wildlife Res* **24**: 613-629.
- Goossens, B., Chikhi, L., Taberlet, P., Waits, L. P. and Allainé, D. 2001. Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps. *Mol. Ecol* **10**:41-52.
- Grant, P. (Ed.). 1998. *Evolution on islands*. Oxford University Press, Oxford.
- Gündüz, İ, Auffray, J.C., Britton-Davidian, J., Catalan, J., Ganem, G., Ramalhinho, M. G., Mathias, M. L. and Searle, J. B. 2001. Molecular studies on the colonization of the Madeiran archipelago by house mice. *Mol. Ecol.* **10**:2023-2029.
- Gutiérrez-Granados, G. 2003. *Ecología de los ratones de Cozumel y su relación con el sotobosque*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM.
- Hall, E.R. 1981. *The mammals of North America*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York. USA. 608 p.p.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Harris, D., Rogers, D.S. and Sullivan, J. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Mol. Ecol.* **9**: 2129-2135.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates, Canada. P.p. 542.
- Hasegawa, M., Kishino, H. and Yano, T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**:160-174.
- Haynes, S., Jaarola, M. and Searle, J. B. 2003. Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Mol. Ecol.* **12**:951-956.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers. USA. P.p. 552.
- Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. 1996. *Molecular systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- Hinten, G., Harris, F., Rossetto, M. and Baverstock, P.R. 2003. Genetic variation and island biogeography: microsatellite and mitochondrial DNA variation in island populations of the Australian bush rat, *Rattus fuscipes greyii*. *Cons. Genet.* **4**: 759-778.
- Jones, J. K. Jr. and Lawlor, T.E. 1965. Mammals from Isla Cozumel, Mexico, with description of a new species of harvest mouse. University Kansas Publishing, Museum of Natural History **16**: 409-419.
- Jones, M. E., Paetkau, D., Geffen, E. and Moritz, C. 2004. Genetic diversity and population structure of Tasmanian devils, the largest marsupial carnivore. *Mol. Ecol.* **13**: 2197-2209.
- Jordán, E. 1987. Arrecifes profundos en la isla de Cozumel, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Estación Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.*
- Kilpatrick, C. W. 1981. Genetic structure of insular populations. Pp. 28-59. En: Smith, M. H. and Joule, J. (Eds.). *Mammalian Population Genetics*. University of Georgia Press, USA.
- Kim, I., Phillips, C. J., Monjeau, J. A., Birney, E. C., Noack, K., Pumo, D. E., Sises, R. S. and Dole, J. A. 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Mol Ecol* **7**: 667-678.
- Kincaid, W. B., Cameron, G. N. and Carnes, B. A. 1983. Patterns of habitat utilization in sympatric coastal prairie rodents. *Ecology* **64**: 1471-1480.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-163.
- Landry, P.A., Lapointe, F.J. 1999. The genetic heterogeneity of deer mouse populations (*Peromyscus maniculatus*) in an insular landscape. *Res. Popul. Ecol.* **41**: 263-268.
- Levene, H. 1949. On a matching problem in genetics. *Ann Math Stat* **20**: 91-94.
- Loxterman, J.L., Mocrief, N.D., Dueser, R.D., et al. 1998. Dispersal abilities and genetic population structure of insular and mainland *Oryzomys palustris* and *Peromyscus leucopus*. *J. Mammal.* **79**: 66-77.
- Lugo-Hubp, J., Aceves-Quesada, J.F. y Espinasa-Pereña, R. 1992. Rasgos geomorfológicos mayores de la península de Yucatán. *Anales del Instituto de Geología UNAM* **10**: 142-50.
- Lugon-Moulin, N., Balloux, F. and Hausser, J. 2000. Genetic differentiation of common shrew *Sorex araneus* populations among different alpine valleys revealed by microsatellites. *Acta Theriol.* **45**: (Suppl. 1)103-117.
- MacArthur, R.H. and Wilson, E.O. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, USA.
- Macouzet, T.M., Escalante-Pliego, P. 2000. New records of birds for Cozumel island, México. *Southwest. Naturalist* **45**: 79-81.
- Martínez-Morales, M.A. 1996. *The Cozumel Curassow: abundance, habitat preferences and conservation*. MPhil Thesis, University of Cambridge, Cambridge.
- Martínez-Morales, M.A. 1999. Conservation status and habitat preferences of the Cozumel Curassow. *The Condor* **101**: 14-20.
- Martínez-Morales, M.A., Cuarón, D.A. 1999. *Boa constrictor*, an introduced predator threatening the endemic fauna of Cozumel island, México. *Biod. Cons.* **8**: 957-963.
- Mayr, E. 1954. En: Huxley, J., Hardy, A.C., Ford, E.B. (Eds.). *Evolution as a process*. Allen and Unwin, UK.
- McDonald, W.R. and St.Clair, C.C. 2004. The effects of artificial and natural barriers on the movement of small mammals in Banff National Park, Canada. *Oikos* **105**: 397-407.
- Mellink, E., Ceballos, G. and Luégano, J. 2002. Population demise and extinction threat of the Angel de la Guarda deer mouse (*Peromyscus guardia*). *Biol. Cons.* **108**: 107-111.
- Merriam, C. H. 1901. Six new mammals from Cozumel Island, Yucatan. *Proc. Biol. Soc. Washington* **14**: 99-104.
- Miller, R. G., Jr. 1981. *Simultaneous Statistical Inference*. McGraw Hill, USA.
- Moritz, C. 1994. Application of mitochondrial DNA analysis on conservation: a critical review. *Mol. Ecol.* **3**: 401-411.
- Morris, D. W., Davidson, D. L. and Krebs, C. J. 2000. Measuring the ghost of competition: Insights from density-dependent habitat selection on the co-existence and dynamics of lemmings. *Evol. Ecol Res.* **2**: 41-67.

- Mossman, C.A. and Waser, P.M. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Can. J. Zool.* **79**: 285-295.
- Musser, G.G. and Carleton, M.D. 1993. En: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.) *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. 2nd ed. Smithsonian Institution Press, USA.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of the average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* **4**: 347-354.
- Pope, L.C., Estoup, A. and Moritz, C. 2000. Phylogeography and population structure of an ecotonal marsupial, *Bettongia tropica*, determined using mtDNA and microsatellites. *Mol. Ecol.* **9**: 2041-2053.
- Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817-818.
- Primack, R.B. 1993. *Essentials of conservation biology*. Sinauer Associates, Inc., USA.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-59.
- Ramos-Onsins, S. E. and Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2092-2100.
- Raymond, M., Rousset. 1995. GENEPOP (Version: 1.2): population genetics software for exact test and ecumenism. *J. Hered.* **86**: 248-249.
- Reid, F.A. 1997. *A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico*. Oxford University Press, USA.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223-225.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J. and Alexander, L.F. 2000. Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of North American warm regional deserts. *Mol. Phyl. Evol.* **17**: 145-160.
- Rogers, A. R. and Harpending, H. C. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552-569.
- Romero-Nájera, I. 2004. Distribución, abundancia y uso de hábitat de *Boa constrictor* introducida en la Isla Cozumel. Tesis de Maestría, UNAM. México.
- Rowe, K. C., Heske, E. J., Brown, P. W. and Paige, K. N. 2004. Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101**: 10355-10359.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.
- Ryder, O.A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol. Evol.* **1**: 9-10.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sánchez Cordero, V. 2003. *Oryzomys couesi cozumelae*. Estado actual del conocimiento biológico de algunas especies de roedores de las familias Muridae, Geomyidae, Heteromyidae y Sciuridae (Rodentia: Mammalia) incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Departamento de Zoología, Instituto de Biología, UNAM. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W036. México.
- Schmidt, C. A. and Engstrom, M.D. 1994. Genic variation and systematics of rice rats (*Oryzomys palustris* species group) in southern Texas and northeastern Tamaulipas, Mexico. *J. Mammal.* **74**: 914-928.
- Schneider, S., Kueffer, D., Roessli, L., Excoffier, L. 1997. *ARLEQUIN, version 1.1*. Genetics and Biometry Laboratory, university of Geneva, Switzerland.
- Schug, M.D., Mackay, T.F.C. y Aquadro, C.F. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* **15**: 99-102.
- SEMARNAT, 2002. NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o

- cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Miércoles 6 de marzo, p.p. 1-85.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**:457–462.
- Small, M. P., Stone, K. D. and Cook, J. A. 2003. American marten (*Martes americana*) in the Pacific Northwest: population differentiation across a landscape fragmented in time and space. *Mol. Ecol.* **12**: 89-103.
- Smith, M. F. and Patton, J. L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol. J. Linn. Soc.* **50**: 149-177.
- Smith, T.B., Wayne, R.K. (Eds.). 1996. *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Steppan, S. J., Adkins, R. M. and Anderson, J. 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst. Biol.* **53**: 533-553.
- Surzycki, S. J. 2000. *Basic Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag. USA.
- Swofford, D.L. 1993. *PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1*. Illinois Natural History survey, Champaign, Illinois.
- Taylor, H.L., Cooley, C.R. 1995. A multivariate analysis of morphological variation among parthenogenetic Teiid lizards of the *Cnemidophorus cozumelae* complex. *Herpetologica* **51**: 67-76.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. and Sing, C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619-633.
- Uchupi, E. 1973. Eastern Yucatan continental margin and Western Caribbean tectonics. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* **57**: 1075-1085.
- Van de Zande, L., Van Apeldoorn, R.C., Blijdenstein, A.F. and De Jong, D. 2000. Microsatellite analysis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Mol. Ecol.* **9**: 1651-1656.
- Vázquez-Domínguez, E., Ceballos, G. and Cruzado, J. 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx*, **38**: 347-350.
- Vázquez-Domínguez, E., Paetkau, D., Tucker, N.J., Hinten, G., Moritz, C. 2001. Resolution of natural groups using iterative assignment tests: an example of two species of Australian native rats (*Rattus*). *Mol. Ecol.* **10**:2069-78.
- Vázquez-Domínguez, E., Piñero, D. and Ceballos, G. 1999. Linking heterozygosity, demography, and fitness of tropical populations of *Liomys pictus*. *J. Mammal.* **80**: 810-822.
- Vázquez-Domínguez, E. y Vega, R. 2006 ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? En: Vázquez-Domínguez, E. y Hafner, D. (Eds.). *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. Michigan University Press. USA.
- McFadden, K. W. 2004. The Ecology, Evolution and Natural History of the Endangered Carnivores of Cozumel Island, Mexico. PhD. Dissertation. Graduate School of Arts and Sciences. Columbia University.
- Wang, Y.Q., Hughes, C.R., Gines-Candelaria, E.A., et al. 2000. Polymorphic microsatellite loci of *Oryzomys palustris*, the marsh rice rat, in south Florida detected by silver staining. *Mol. Ecol.* **9**: 1931-32.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Williamson, M. 1981. *Island populations*. Oxford University Press, UK.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323-354.
- Wust, G. 1964. *Stratification and circulation in the Antillean-Caribbean basins*. Columbia University Press, USA.
- Yeh, F.C., Young, R.C., Timothy, B., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and J.X. Mao. 1997. *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.

- Zink, R.M., Dittmann, D.L., Klicka, J., Blackwell-Rago, R.C. 1999. Evolutionary patterns of morphometrics, allozymes and mitochondrial DNA in thrashers (genus *Toxostoma*). *Auk* **116**: 1021-38.
- Zouros, E. 1979. Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics* **92**: 623-646.

Anexo 1. Extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo

Las muestras son pequeños pedazos de piel sin pelo de ejemplares de colecciones mastozoológicas o fragmentos de tejido que se han conservado en congelación a -70°C o en alcohol al 90%.

Día 1. - Las muestras se colocan en un tubo Ependorf etiquetado y se cortan con tijeras en pequeños trozos. Se agregan 300 μl de solución de lisis (EDTA 0.1 M, NaCl 0.15 M) y 17 μl de SDS. Se mezcla utilizando un vortex. Se agregan 30 μl de Proteinasa K y se mezcla utilizando un vortex. Se coloca en baño María a 60°C por toda la noche.

Día 2.- A cada muestra se le agrega un volumen de Fenol, se mezcla (vortex), se centrifuga 10 minutos a 12,000 RPM. Se recoge el sobrenadante (colocándolo en un nuevo tubo etiquetado), éste se mezcla con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (25:24:1). Se mezcla (vortex), se centrifuga 10 minutos a 12,000 RPM. Se recoge el sobrenadante y se mezcla con un volumen de cloroformo alcohol-isoamílico (24:1) y se homogeneiza (vortex). Se centrifuga 10 minutos a 12,000 RPM. Se recoge el sobrenadante y se agrega un volumen de éter etílico, se mezcla (vortex) y se centrifuga tres minutos a 12,000 RPM. Se retira el sobrenadante (es el éter) y la muestra queda abajo. Las muestras se colocan en baño María de 3 a 5 minutos con los tubos abiertos para que se evapore el éter. Se añade 0.1 volumen de Acetato de Sodio y 2.5 volumen de alcohol etílico absoluto frío (el alcohol se agrega lentamente) y después se mezcla de manera suave. Refrigeración a -20°C durante 12 horas. Para muestras antiguas dejar tres días.

Día 3.- Centrifugar 30 minutos a 12,000 RPM. Se extrae el alcohol y se deja el botón de ADN. Se añaden 100 μl de alcohol etílico al 80% y no se resuspende. Centrifugar 5 minutos a 12,000 RPM. Se extrae el alcohol. Las muestras se colocan en una centrífuga al vacío entre 3 a 5 minutos. Se añaden 100 μl de TE (Tris HCl 10mM EDTA 1mM) al botón. Se resuspende el botón. Para bajar las gotitas de las paredes del tubo se colocan las muestras en la nanofuga por algunos segundos (2-3). Se añaden 11.1 μl de ARNasa (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incuba a 37°C durante una hora. Se añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) se homogeneiza y se centrifuga durante 5 minutos. Se recupera el sobrenadante y se agrega 0.1 volumen de Na Ac (Acetato de Sodio) más 2.5 volumen de etanol absoluto frío, éste último se resbala suavemente por las paredes del tubo. Se mezcla suavemente. Se colocan los tubos a -20°C hasta el siguiente día.

Día 4.- Centrifugar de 20 a 30 minutos a 12,000 RPM. Eliminar el alcohol. Agregar 100 μl de etanol al 80% sin resuspender. Centrifugar 5 minutos a 12,000 RPM. Se extrae el etanol. Se colocan las muestras en la centrífuga de vacío entre 3 a 5 minutos. Se agregan 50 μl de agua bidestilada (libre de ARNasa y ADNasa) y se resuspende el botón de ADN. Las muestras se colocan en refrigeración a -20°C . Nota. Un volumen es de 350 μl (Darbre, 1999; Surzycki, 2000).

Anexo 2. Condiciones de amplificación de microsatélites de *Oryzomys couesi cozumelae*.

Ory16	Reactivo	μl	Concent. Final	Temp. Alin.	Ory26	Reactivo	μl	Concent. Final	Temp. Alin.
	MgCl ₂	1.05	3.5 mM	50°C		MgCl ₂	1.2	4mM	50°C
	dNTPs	1.5	2 mM			dNTPs	1.5	2 mM	
	F	0.9	0.6 μM			F	0.9	0.6 μM	
	R	0.9	0.6 μM			R	0.9	0.6 μM	
	Buffer 10X	1.5	1X			Buffer 10X	1.5	1X	
	Taq	0.15	0.75 u/μl			Taq	0.15	0.75 u/μl	
	Platinum					Platinum			
	DNA	1				DNA	1		
	H ₂ O	8				H ₂ O	7.85		
	<u>Total</u>	<u>15</u>				<u>Total</u>	<u>15</u>		

Ory21	Reactivo	μl	Concent. Final	Temp. Alin.	Ory40	Reactivo	μl	Concent. Final	Temp. Alin.
	MgCl ₂	0.9	3.0 mM	55°C		MgCl ₂	1.05	3.5 mM	55°C
	dNTPs	1.5	2.0 mM			dNTPs	1.5	2.0 mM	
	F	1.5	1.0 μM			F	1.5	1.0 μM	
	R	1.5	1.0 μM			R	1.5	1.0 μM	
	Buffer 10X	1.5	1X			Buffer 10X	1.5	1X	
	Taq	0.15	0.75 u/μl			Taq	0.15	0.75 u/μl	
	Platinum					Platinum			
	DNA	1				DNA	1		
	H ₂ O	6.95				H ₂ O	6.8		
	<u>Total</u>	<u>15</u>				<u>Total</u>	<u>15</u>		

Ory60	Reactivo	μl	Concent. Final	Temp. Alin.
	MgCl ₂	1.05	3.5 mM	53°C
	dNTPs	1.5	2.0 mM	
	F	1.5	1.0 μM	
	R	1.5	1.0 μM	
	Buffer 10X	1.5	1X	
	Taq	0.15	0.75 u/μl	
	Platinum			
	DNA	1		
	H ₂ O	6.8		
	<u>Total</u>	<u>15</u>		

Anexo 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% y tinción con plata.

Primero se debe preparar la poliacrilamida al 40% (debe tenerse mucho cuidado porque la poliacrilamida es altamente tóxica):

- 38 g de Acrilamida
- 2 g de Bis-Acrilamida
- 100 ml de H₂O

Posteriormente se hace un stock de poliacrilamida al 6%. Preferentemente, puede usarse la poliacrilamida comercial RAPID GEL 40% y de ahí preparar el stock a 6%. El stock puede prepararse siguiendo las especificaciones siguientes:

Preparación de 250 ml de stock de poliacrilamida 6%:

- 37.5 ml de poliacrilamida 40% o de RAPID GEL 40%.
- 105 g de Urea
- 25 ml TBE 10X pH 8.3

Agregar a un vaso de precipitado 100 ml de H₂O y la urea. Colocar un agitador y disolver. Calentar levemente para acelerar la disolución de la urea (puede tardar varios minutos). Agregar el TBE 10X pH 8.3. Agregar la poliacrilamida 40% (preparada o de RAPID GEL) y revolver bien. Aforar a 250 ml y guardar en refrigeración (4°C).

Preparación del gel:

Se deben usar dos vidrios, uno donde se va a pegar el gel (chico) y otro donde no se debe pegar (grande). Ambos vidrios deben lavarse cuidadosamente primero con jabón, después con agua destilada y al final con alcohol de tal manera de que no queden residuos sobre su superficie. Secarlos y colocarlos de manera horizontal sobre algún tipo de soporte o base. De vez en cuando dejarlos enjuagando con NaOH 1M 20 min-toda la noche.

En un tubo Ependorf de 1.5 ml agregar 1.25 µl de Bind Silane, 83 µl de ácido acético al 10% y 333 µl de Etanol al 100% a 4°C (puede usarse alcohol del 96). Tirar esta solución sobre una cara del vidrio donde se pegará el gel (vidrio chico) y con una sanita extender sobre toda la superficie homogéneamente. Al vidrio grande (donde no se pega el gel), se le moja con unas gotas de Rain Anti-Fog (repelente de agua para parabrisas de coche, de uso comercial) o con Repel Silane. Extender homogéneamente y dejar secar unos 10-15 min. Es importante que ambos vidrios se dejen secar bien antes de seguir con el protocolo.

Colocar los separadores de 0.4 mm en los extremos del vidrio chico y colocar el vidrio grande encima. Las caras de los vidrios que fueron mojadas con las soluciones deben quedar aproximadas

pero no deben tocarse. Colocar broches en los extremos de los dos vidrios para que estos no se separen. Además se requiere para polimerizar la acrilamida, Persulfato de Amonio (APS) al 10% y TEMED (BioRad).

En otro recipiente (ya sea una jeringa sin aguja o algo que sirva para verter poco a poco) colocar dependiendo del tamaño del vidrio a utilizar:

Poliacrilamida 6% (ml)	APS (ml)	TEMED (ml)
15 (vidrio chico)	45	12.5
20	60	16.6
25	75	20.75
30 (vidrio grande)	90	24.9

Revolver y verter la solución de poliacrilamida entre los dos vidrios de tal manera que se cubra todo y no queden burbujas en medio. Colocar el peine pero en posición invertida para que quede una superficie plana donde luego se harán los pozos donde se colocarán las muestras a analizar. Colocar uno o dos broches sobre el peine y dejar polimerizar al menos 35 min.

Una vez polimerizado, retirar el peine, colocar el gel en una cámara de electroforesis vertical, llenar con TBE 1X pH 8.3, limpiar los excesos de poliacrilamida y colocar nuevamente el peine pero esta vez insertando los dientes en la poliacrilamida (entre 2-5 mm, aproximadamente). Limpiar cada pozo con el mismo buffer de la cámara de electroforesis y usando una pipeta (los pozos tienen urea y restos de gel). Ponerlo a precorrer unos 15 min antes de cargar las muestras.

Colocar ½ volumen de buffer de carga a cada muestra. Desnaturalizar por 7 min a 94°C. Colocar 7 ml de muestra en cada pozo. Correr a 500 V por 2:10 horas o hasta que el frente del buffer de carga llegue a 5 cm del final del gel. El gel se calentará para mantener las muestras desnaturalizadas, pero no demasiado.

Al terminar, sacar el gel de la cámara y con una espátula separar ambos vidrios. El gel queda pegado en el vidrio chico (donde se colocó el Bind Silane). El vidrio grande debe quedar limpio, sin pedazos de gel adheridos.

Tinción con Plata: Siempre se debe usar agua fría.

- Colocar el vidrio con el gel en una charola con ácido acético al 10% frío y dejar agitando 35 min.
- Pasar el ácido acético a otro recipiente (se utilizará posteriormente). Agregar agua fría (suficiente para que cubra al gel) y dejar 5 min.
- Agregar la solución de plata (0.3 g de Nitrato de Plata, 300 ml H₂O a 4°C y 450 ml de Formaldehído al 37%. Dejar 25-30 min.

- Retirar la solución de plata (es tóxica, ver tratamiento para su desecho). Agregar agua fría y rápidamente tirarla (3-5 seg).
- Agregar la solución reveladora (9 g de Acetato de Calcio, 300 ml H₂O a 4°C, 450 ml de Formaldehído al 37% y 500 ml de Tiosulfato de Sodio 0.1 N). Agitar hasta que se vean las bandas.
- Una vez que se vean las bandas, tirar la solución reveladora y rápidamente colocar el ácido acético que se usó en el primer paso. Dejar 10 min. Al terminar, tirar el ácido acético, colocar un poco de agua destilada, y dejar secar el gel una noche.
- Leer las bandas.

Anexo 4. Condiciones de amplificación y secuenciación de citocromo b de *Oryzomys couesi*.

Condiciones de amplificación de cyt b para *Oryzomys couesi*

Reactivos	µl	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Buffer 10X	2	Ciclo inicial	94	4
MgCl ₂ 25 mM	2.4	Desnaturalización	94	1
dNTP's 10 mM	4	Alineación	50-52	1
Primer Forward 10 µM	0.8	Extensión	72	1
Primer Reverse 10 µM	0.8	35 veces		
Taq 5 U/µl	0.2	Extensión Final	72	5
H ₂ O dd	8.8	Final	4	24 hrs
ADN	1			
Vol. Final	20			

Condiciones de secuenciación de cyt b para *Oryzomys couesi*

Reactivos	µl	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
ADN	5	Ciclo inicial	96	1 min
Primer Forward (o reverse)	1	Desnaturalización	96	10 seg
Prism	2	Alineación	50	5 seg
Buffer de reacción	3	Extensión	60	4 min
Vol. Final	11	25 veces		
		Final	4	24 hrs

Anexo 5. Precipitación por Polietilenglicol (PEG-3350) para la limpieza de productos de PCR.

Para la purificación de productos de PCR mayores que 300 pb.

- 1) Transferir los productos de PCR a un tubo nuevo de 1.5 ml etiquetado.
- 2) Adicionar $\frac{1}{2}$ volumen de 30% PEG-3350 (en 1.5 M NaCl) a la reacción de PCR (por ejemplo, 25 μ l de solución de PEG a 50 μ l de reacción de PCR).
- 3) Agitar gentilmente (ya sea golpeando el tubo con el dedo o usando la micropipeta levantando y soltando el líquido varias veces) y dejar reposar por 10-15 min a temperatura ambiente. Productos cercanos a 300 pb necesitan entre 15 y 30 min.
- 4) Centrifugar 8 min a 13,200 RPM. Los productos más grandes que 300 pb formarán un botón. Los productos menores que 300 pb (dNTP's, oligos) quedarán en el sobrenadante.
- 5) Cuidadosamente, remover el sobrenadante con una pipeta sin tocar el botón.
- 6) Cuidadosamente (sin mezclar), adicionar 300 μ l de 75% etanol para lavar el botón de PEG.
- 7) Centrifugar 4 min a 13,200 RPM.
- 8) Cuidadosamente sacar el etanol sin tocar o mover el botón.
- 9) Repetir los pasos 5-8 (opcional pero no recomendado).
- 10) Secar el etanol restante del botón en una centrífuga de vacío a temperatura media (30 min). Asegurarse que el tubo quede seco. También pueden dejarse las muestras secando al aire libre.
- 11) Resuspender el botón de ADN en un volumen de 12-25 μ l de 10 mM Tris. Agitar bien por 15 seg y colocar a 37° C por 15 min o hasta que se resuspenda el botón, después agitar nuevamente. Para el procedimiento de secuenciación (donde se requieran 10 μ l), resuspender en 15 μ l (o en 16 μ l si el pipeteo no es exacto).

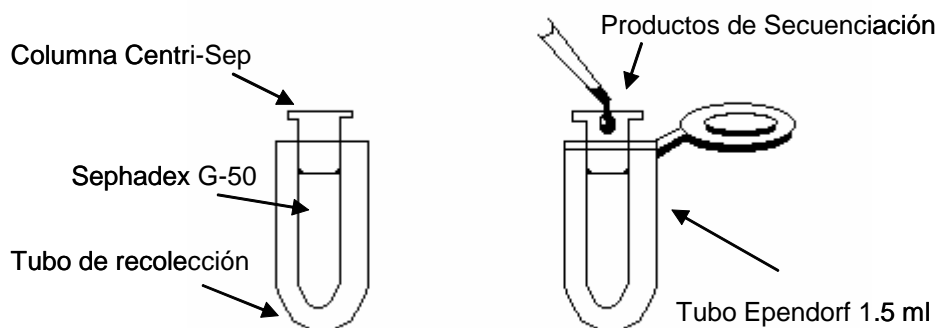
Visualizar en gel de agarosa para asegurar que hubo recuperación de ADN.

Anexo 6. Limpieza de productos de secuenciación con Sephadex G-50.

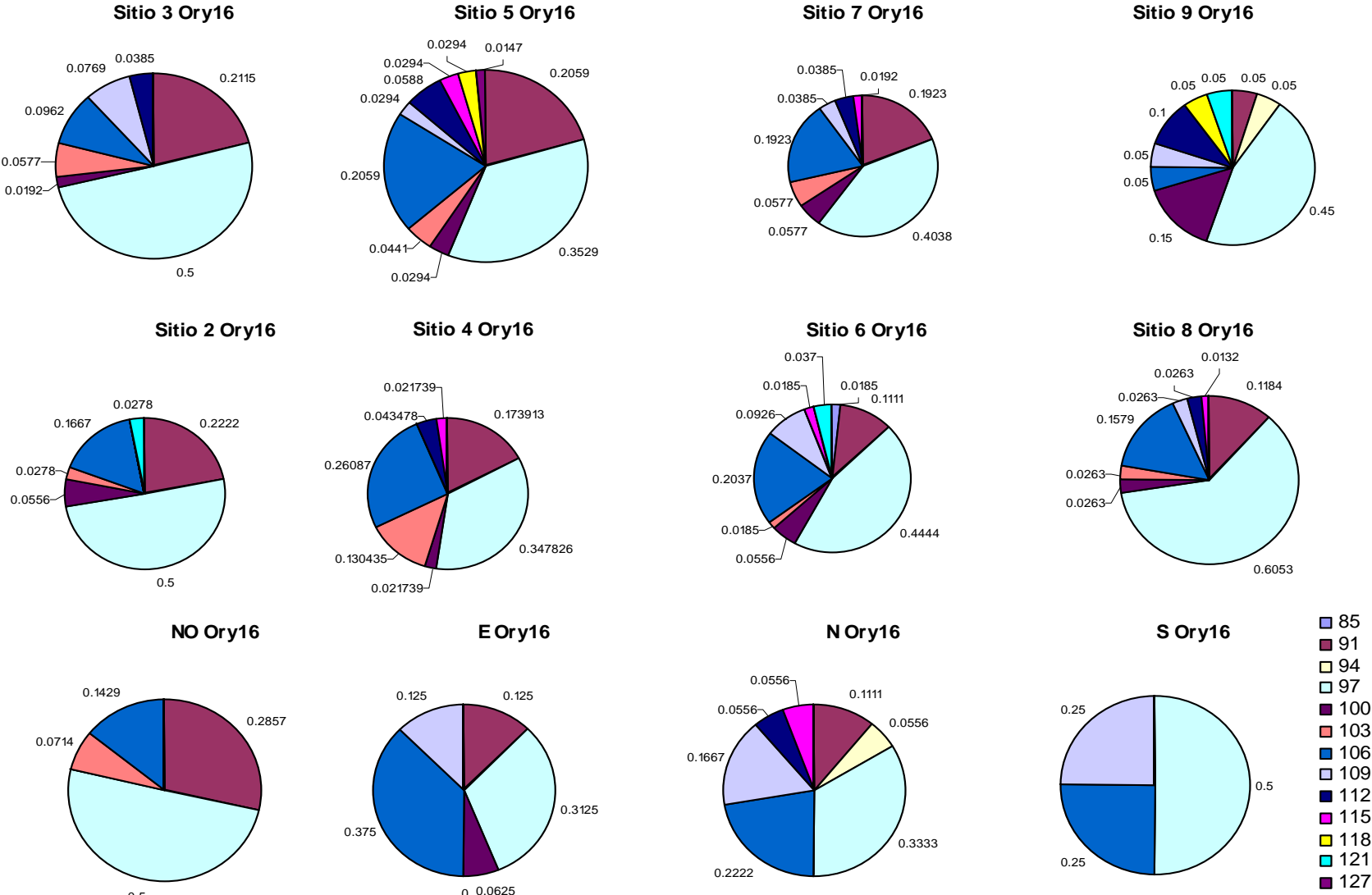
Se utilizan las columnas de Centri-Sep (Princeton Separations) y se pueden rehusar varias veces. Para preparar el Sephadex o resina, se pesan 5 g de polvo Sephadex G-50 y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se agregan 75 ml de agua bidestilada, se tapa el matraz y se calienta por 10 min a bajo poder sin dejar que el agua hierva. Después se lleva la solución al nivel original si se evaporó mucha agua. Se coloca una mosca (para agitar la solución), se tapa con Parafilm y se coloca a 4 °C para evitar evaporación. No se debe utilizar el Sephadex caliente.

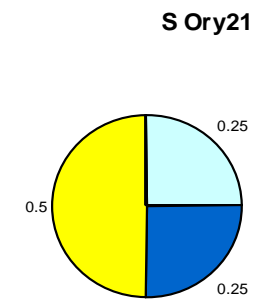
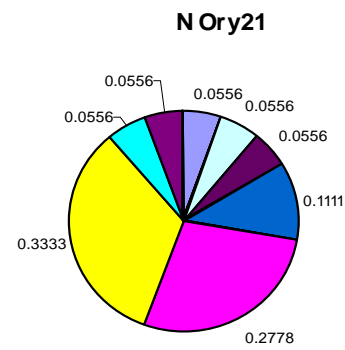
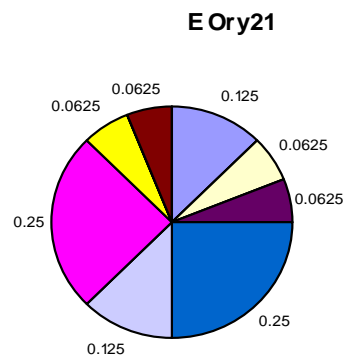
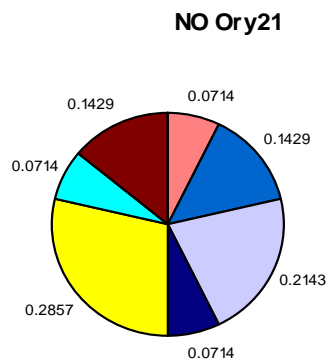
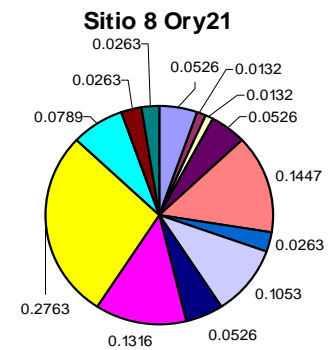
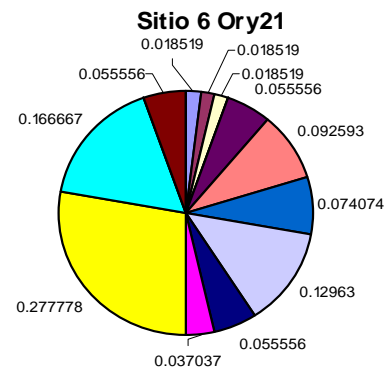
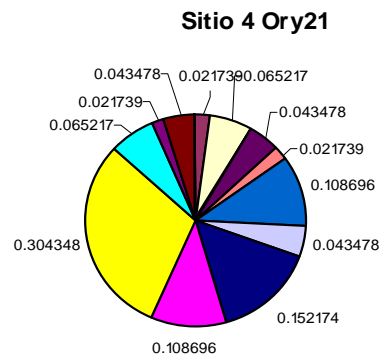
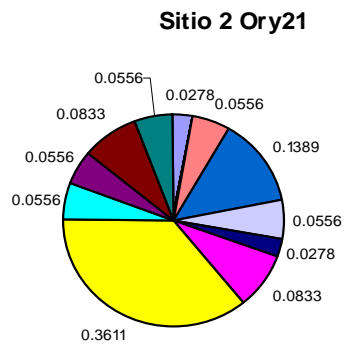
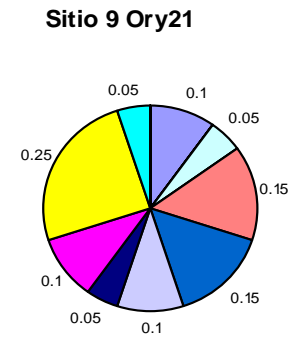
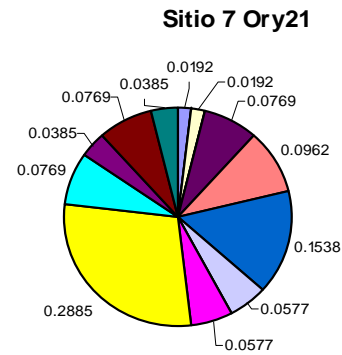
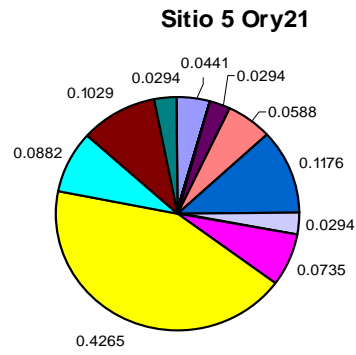
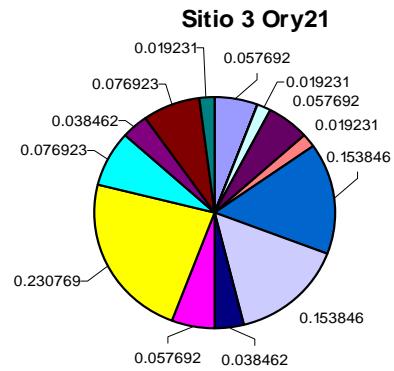
Pasos a seguir para la limpieza de la reacción de secuenciación:

- 1) Colocar el matraz Erlenmeyer con el Sephadex G-50 en agitación. Evitar que la solución se asiente.
- 2) Asegurarse de que el tubo de Centri- Sep esté limpio y seco.
- 3) Colocar 650 μ l de Sephadex G-50 en la columna de Centri-Sep evitando de que queden burbujas y añadiendo desde el fondo.
- 4) Orientar las columnas hacia fuera en la microcentrífuga. Centrifugar por 3 min a 2400 RPM.
- 5) Sacar la columna del tubo de recolección y colocarla en un tubo Ependorf de 1.5 ml etiquetado.
- 6) Adicionar 10 μ l de H₂O a cada producto de reacción (dando un total de 21 μ l). El agua facilita el movimiento de los productos de secuenciación a través de la columna de Sephadex.
- 7) Adicionar los productos de secuenciación al centro de la resina de Sephadex G-50, no a los lados. No tocar la resina con la punta de la pipeta.
- 8) Centrifugar nuevamente por 3 min a 2400 RPM. Orientar los tubos en el mismo sentido. Al final de la centrifugada se debe observar el mismo volumen que se adicionó a la columna.
- 9) Secar los productos en una centrífuga al vacío o a temperatura ambiente si sobre secar.
- 10) Se tira la resina de Sephadex G-50 y las columnas Centri-Sep se lavan con agua destilada y se dejan secar. No se debe utilizar jabón.
- 11) Las muestras se pueden colocar en refrigeración a 4 °C hasta que se envíen a secuenciar.

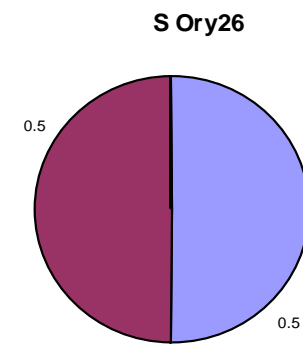
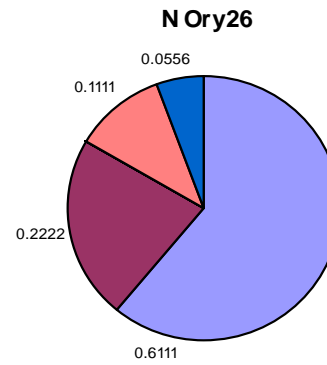
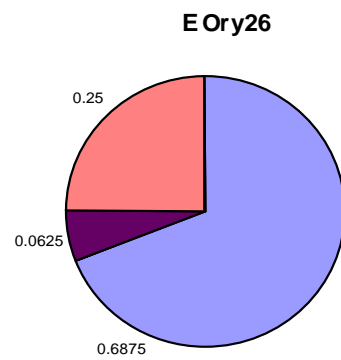
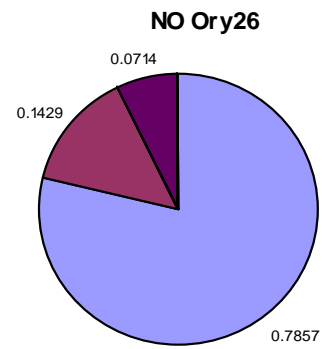
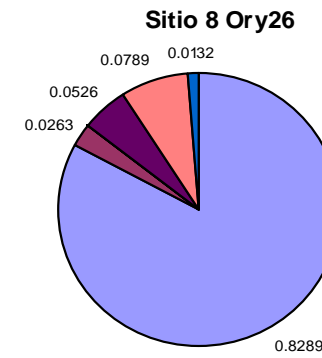
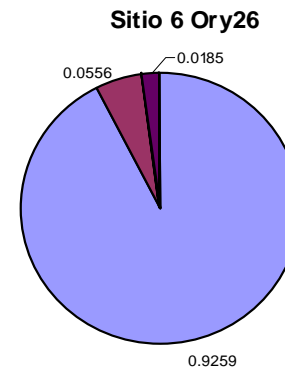
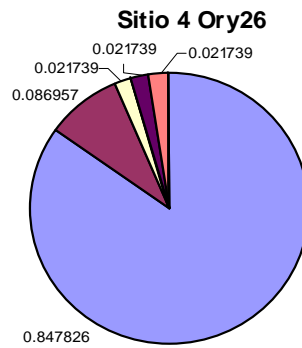
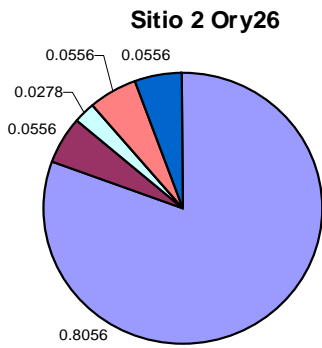
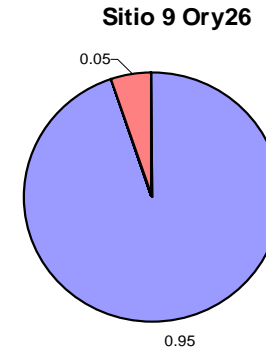
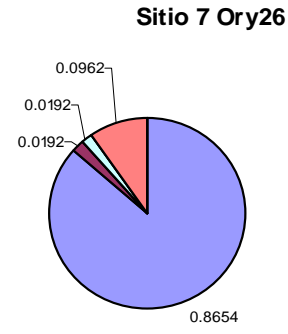
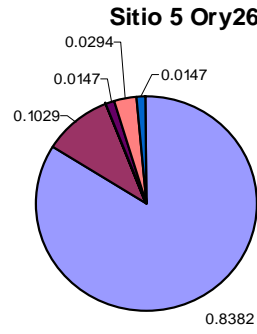
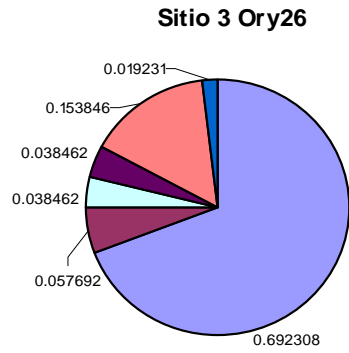


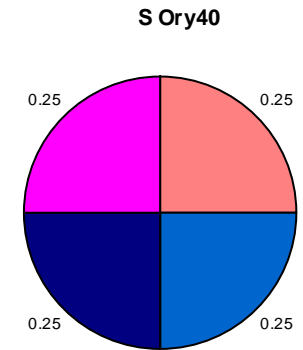
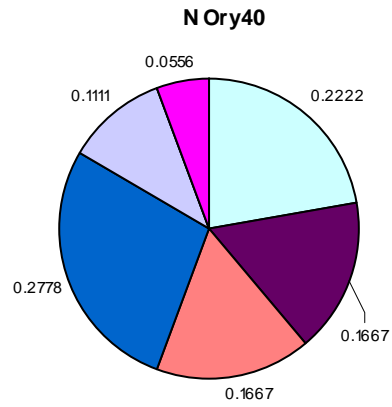
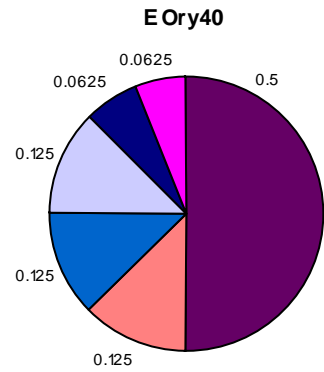
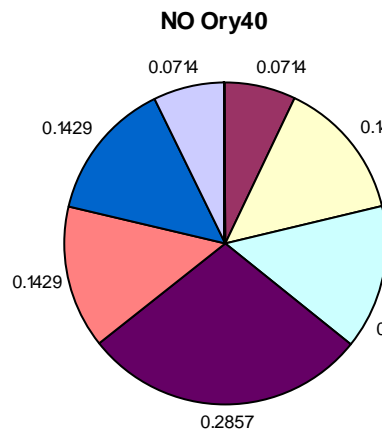
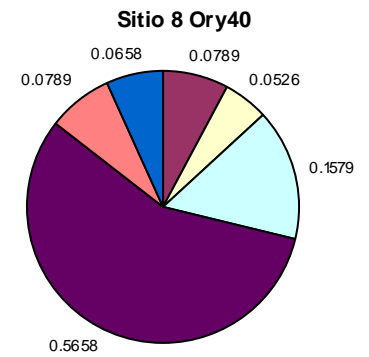
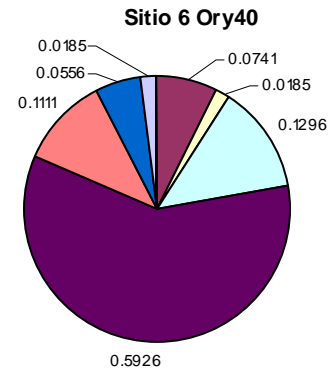
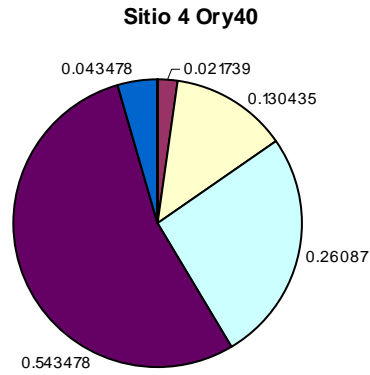
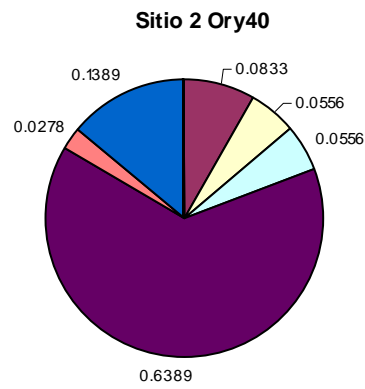
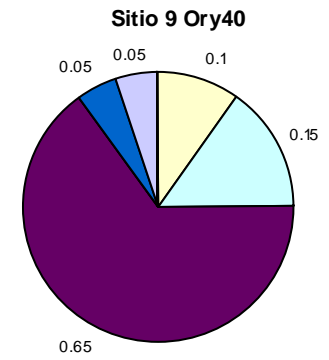
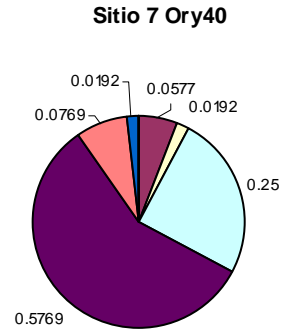
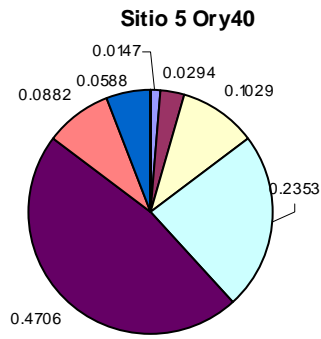
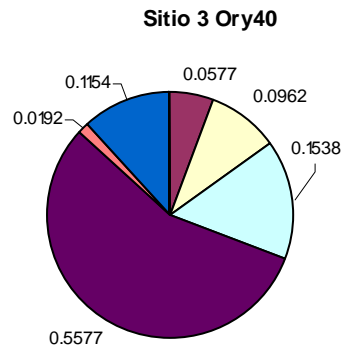
Anexo 7. Frecuencias alélicas para CAPA y otras regiones de la isla.



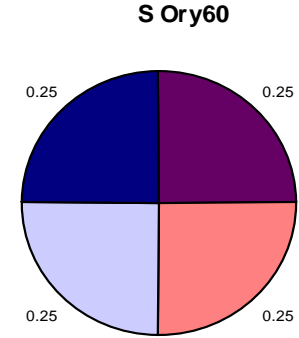
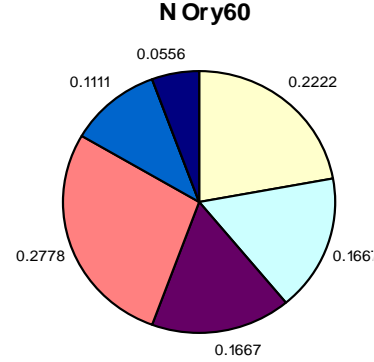
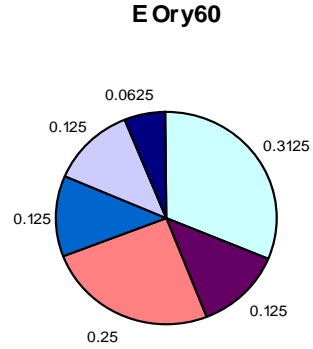
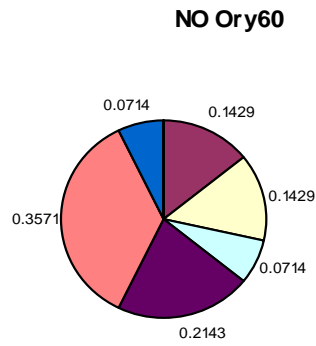
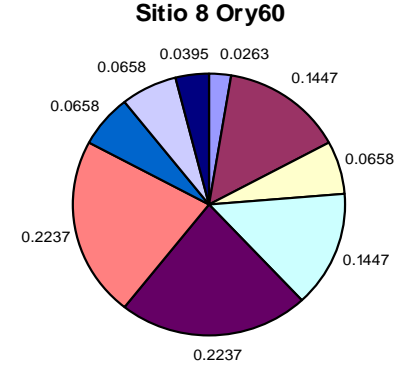
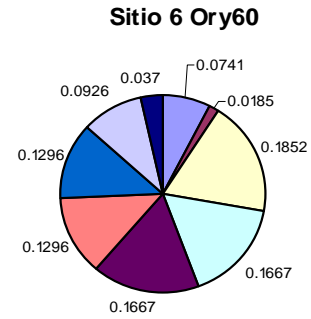
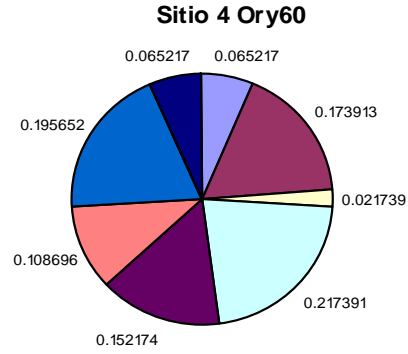
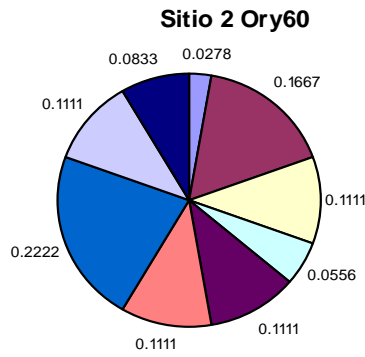
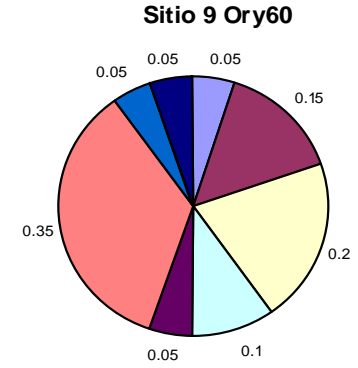
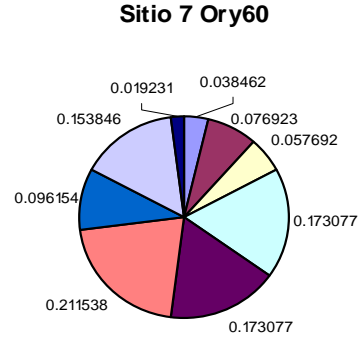
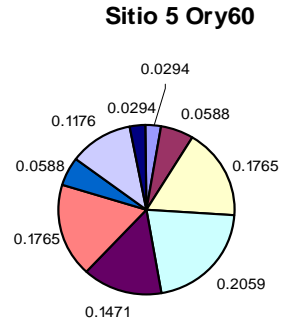
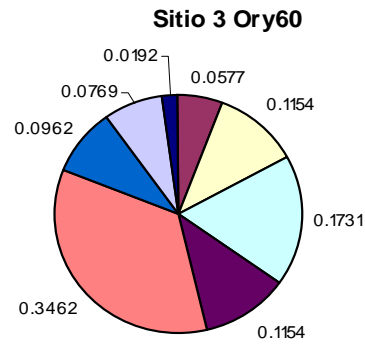


- 151
- 154
- 157
- 160
- 163
- 166
- 169
- 172
- 175
- 178
- 181
- 184
- 187
- 190
- 193





- 127
- 130
- 133
- 136
- 139
- 142
- 145
- 148
- 151
- 154



- 129
- 132
- 135
- 138
- 141
- 144
- 147
- 150
- 153