



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Habromys simulatus*, UNA
ESPECIE ENDÉMICA Y RESTRINGIDA AL BOSQUE
MESÓFILO DE MONTAÑA**

T E S I S

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

P R E S E N T A

SUSETTE SAMÍ CASTAÑEDA RICO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2008



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.

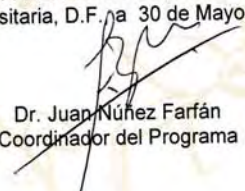
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de Mayo de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **SUSETTE SAMI CASTAÑEDA RICO** con número de cuenta **96320228** con la tesis titulada **"Diversidad genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica y restringida al bosque mesófilo de montaña"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**.

Presidente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Vocal: DR. LUIS MEDRANO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Suplente: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Suplente: DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de Mayo de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO GRACIAS AL APOYO DEL POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

A LA BECA DE MAESTRÍA Y BECA MIXTA, OTORGADA POR EL CONSEJO
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (203160-CONACYT) A Susette Samí Castañeda
Rico

AL APOYO OTORGADO A LA Dra. Ella Vázquez-Domínguez, POR EL INSTITUTO DE
ECOLOGÍA, UNAM.

ADEMÁS SE CONTÓ CON EL APOYO LOGÍSTICO Y FINANCIERO DE LA PORTLAND
STATE UNIVERSITY, POR MEDIO DEL Dr. Luis Ruedas.

EL COMITÉ TUTORAL QUEDÓ INTEGRADO POR LOS SIGUIENTES MIEMBROS:

Dra. Ella Vázquez Domínguez
Dr. Luis Medrano González
Dr. Joaquín Arroyo-Cabrales

*A la persona por la que más amor
y admiración siento..... MI MAMÁ*

A mi familia

Luis,

Mi tía Esther,

Arturo,

Elia,

Enrique,

Darwin y Sultán

A la UNAM

A mis amigos

Con mucho amor...

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por todo lo que me ha dado y de quien siento tanto orgullo.

A mi tutora Ella, por confiar en mí, por sus enseñanzas, por siempre estar ahí para todo y por el apoyo que siempre me mostró.

A Livia León, por confiar una vez más en mí y permitirme trabajar con estos roedores tan interesantes, por sus enseñanzas y su cariño.

Al Dr. Joaquín Arroyo, Dr. Luis Medrano y Dr. Daniel Piñero por toda la ayuda, interés y comentarios que permitieron enriquecer este trabajo.

Al Dr. Luis Ruedas por recibirme en su laboratorio para hacer una estancia de investigación en la Portland State University. En especial por la confianza de recibirme en su casa al lado de DeAnna, Paloma, Angélica y Sara, quienes siempre me demostraron su cariño y su apoyo durante mi estancia en Portland.

Al Dr. Mitchell Cruzan y Dra. Deborah Duffield por permitirme trabajar en sus laboratorios y por toda la ayuda que me dieron.

A Kike, Héctor y Marilú por su valiosa e incomparable ayuda en el campo y por todo lo que eso implica.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Macroecología y el de Dinámica de Poblaciones e Historias de Vida. En especial a Cynthia, Aliet y Lucy por guiarme en el laboratorio, aún cuando llegue y no sabía ni pipetear. A Rebeca y Daya por todas esas pláticas, que en ocasiones sí eran de genética. A Erick, Coni, Brian, Ale, Isra, Gisela, Irma, Mariana y Meli por su apoyo y ratos de diversión. A Gerardo Rodríguez y David por toda su ayuda y comentarios.

Al Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias, en especial a la Colección de Mamíferos a cargo de la Dra. Livia León, por brindarme todos los ejemplares disponibles para este trabajo.

A todos mis amigos del Museo, en especial a mi “mastohermana” Diana, al “ornitorrinco” César, Elisa, Roxana, Anahí, Nanda, Erick y Cirene por su apoyo y por tantos ratos inolvidables.

A mis amigos de siempre Edgar, Yoshinori y Andrea.

A Daniela, Estefanía, Isabel, Carolina, Yuki, Risako, Lorelei, Laurie, Marie, Kristin, Barb, Alisa, Trieste, Paul y Nate por hacer agradable y divertida mi estancia en Portland.

A la gente de Tenango de Doria, Hidalgo, por su amabilidad.

A ustedes.....



*y a todos aquellos a quienes
representan....*

ÍNDICE

	Página
I. Introducción	1
II. Antecedentes	
2.1 Estructura genética y marcadores moleculares	2
2.2 El Bosque Mésófilo de Montaña	5
2.3 Género <i>Habromys</i>	7
2.4 <i>Habromys simulatus</i>	9
III. Objetivos	11
IV. Método	
4.1 Obtención de muestras y trabajo de campo	12
4.2 Extracción de DNA	12
4.3 Estandarización de PCR	13
4.4 Geles de poliacrilamida	14
4.5 Secuenciación y lectura de microsatélites	14
4.6 Diversidad genética	15
4.7 Estructura genética	18
4.8 Cuello de botella, alelos nulos y relaciones de parentesco	20
V. Resultados	
5.1 Diversidad genética	22
5.2 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones	28
5.3 Cuello de botella, alelos nulos y relaciones de parentesco	32
VI. Discusión	
6.1 Diversidad genética	34
6.2 Estructura genética	37
6.3 Cuello de botella	40
6.4 Conservación	41
VII. Conclusión	44
VIII. Bibliografía	45
IX. Anexos	53

RESUMEN

La fragmentación del hábitat comúnmente tiene como consecuencia el aislamiento de las poblaciones y la reducción en su tamaño poblacional. Dichos fragmentos suelen considerarse “islas” en términos de flujo génico y diversidad genética, además de ser susceptibles a eventos estocásticos (fluctuaciones del tamaño poblacional) y presentar reducciones en los niveles de variabilidad genética, sobre todo por deriva génica y entrecruzamiento. Ello provoca una disminución en el potencial evolutivo de las poblaciones y en la adecuación individual, lo que incrementa el riesgo de extinción. El bosque mesófilo de montaña es un caso particularmente extremo de aislamiento y fragmentación en México, debido principalmente a la deforestación. *Habromys simulatus* es un roedor estrictamente arbóreo, endémico y restringido a este tipo de hábitat, con sólo dos poblaciones remanentes conocidas (Hidalgo y Oaxaca). Se conoce muy poco sobre su historia natural, sin embargo, recientemente se ha propuesto que se divida en dos especies diferentes. En este trabajo se analizó la diversidad y estructura genética de *H. simulatus* por medio de 10 loci de microsatélite. El DNA se obtuvo de 52 muestras provenientes de las dos poblaciones. Se detectaron altos niveles de diversidad genética ($H_{NE}=0.732$), lo que se ha reportado para otras especies con distribución fragmentada y en peligro de extinción. Se encontró una diferenciación genética significativa con valores de $F_{ST}=0.178$ y $N_m=0.196$. Dicha estructuración se corroboró con los resultados del análisis de asignación y el análisis factorial de correspondencias. El análisis molecular de varianza (AMOVA) indicó que la mayor parte de la variación se encontró dentro de las poblaciones (82%) y no entre ellas (18%), lo que es de esperarse ya que los genotipos de cada uno de los individuos son totalmente diferentes. No se detectaron relaciones de parentesco entre individuos de una población con respecto a la otra, ni la presencia de un cuello de botella reciente. A pesar de las características de la especie, sus poblaciones aún mantienen una diversidad genética alta, aunque se comienza a observar un deterioro genético (fijación de alelos, deriva génica y cierto grado de endogamia). Por otro lado, los resultados indican que cada población es una fuente de diversidad genética única y deben de ser consideradas como dos unidades evolutivas diferentes, con un alto riesgo de extinción debido principalmente a la pérdida de su hábitat.

Palabras clave: *Habromys simulatus*, bosque mesófilo de montaña, microsatélites, diversidad genética, estructura genética.

ABSTRACT

Habitat fragmentation has consequences on populations such as reduction in population size and population isolation. The resulting fragments are regarded as “island” in terms of genetic flow and genetic diversity; therefore, they are more susceptible to stochastic events (fluctuations in population size), and loose genetic variability mainly due to genetic drift and inbreeding. These factors may diminish the populations’ evolutionary potential and the individual fitness, hence increasing extinction risk. Cloud mountain forest is considered an extreme case of habitat isolation and fragmentation in Mexico, mainly due to deforestation. *Habromys simulatus* is an endemic, arboreal rodent, with only two extant populations that are restricted to cloud mountain forest in Hidalgo and Oaxaca. The natural history of *H. simulatus* is poorly known; however, recently it was proposed that they represent two different species. The objective of this work was to analyze the genetic diversity and genetic structure in *H. simulatus*, by 10 microsatellite loci. DNA was obtained from 52 samples from both populations. We found high levels of genetic diversity ($H_{NEF}=0.732$) as reported in other endangered species with fragmented distributions. The genetic differentiation was significant with $F_{ST}=0.178$ and $N_m=0.196$. This structure was supported by means of an assignment test and a factorial correspondence test. The molecular analysis of variance (AMOVA) showed that most of the variation was within populations (82%) and not among them (18%), an expected result given that each of the individual genotypes was different. We did not found a relationship between individuals from each population neither evidence of a recent bottleneck. Despite of the particular characteristics of the species, their populations have high levels of genetic diversity. Nevertheless several genetic processes such as allele fixation, genetic drift and inbreeding are starting to occur. Our results suggest that each population is a unique genetic pool and that they must be considered as two different evolutionary units, with a high risk of extinction mainly due to habitat loss.

Key words: *Habromys simulatus*, cloud mountain forest, microsatellites, genetic diversity, genetic structure.

I.-INTRODUCCIÓN

El hábitat de muchas especies de flora y fauna se ha reducido y fragmentado en tiempos recientes, debido principalmente a factores antropogénicos. Dicha fragmentación ha provocado en muchos casos el aislamiento de las poblaciones y la reducción del tamaño poblacional de las mismas (Van de Zande *et al.*, 2000). Los parches o fragmentos de hábitat suelen considerarse “islas” en términos de flujo génico y diversidad genética (Kim *et al.*, 1998). Dichas poblaciones pequeñas y aisladas son muy susceptibles a eventos estocásticos, lo que resulta en fluctuaciones del tamaño poblacional y de otros parámetros demográficos. Asimismo, los niveles de variabilidad genética (e.g. número de alelos, heterocigosidad, etc.) disminuyen en estas poblaciones, resultado principalmente de deriva génica y de entrecruzamiento (Van Treuren *et al.*, 1991, 1993; Templeton y Read, 1994; Garner *et al.*, 2005). Este proceso de erosión genética puede disminuir el potencial adaptativo de las poblaciones a cambios ambientales, así como la adecuación individual, lo que incrementa el riesgo de extinción de las mismas (Goodman, 1987; Shaffer, 1987; Hedrick *et al.*, 1996; Sachaccheri *et al.*, 1998; Bijlsma *et al.*, 1999, 2000).

Los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y la divergencia entre éstas varía de acuerdo con el grado de fragmentación que presentan (Garner *et al.*, 2005), es decir, a mayor distancia geográfica entre las “islas” y/o a mayor tiempo de aislamiento, se espera que la diversidad genética disminuya y, por tanto, las poblaciones presenten una mayor divergencia (Frankham *et al.*, 2005). Por el contrario, el flujo génico contrarrestará la diferenciación y la pérdida de la diversidad genética.

Es de suma importancia el estudio de este tipo de hábitats fragmentados y las especies que se encuentran asociadas a ellos. Una de las principales razones para ello es que la mayoría de las especies endémicas en nuestro país muestran este tipo de distribución fragmentada, lo que en su mayoría se relaciona con la pérdida del hábitat y la disminución de su distribución potencial, aunado a que comúnmente se encuentran restringidas a biomas o ecosistemas específicos (e.g. bosques montanos, Escalante *et al.*, 1993). Por ejemplo, *Cratogeomys tylosinus*, *Habromys simulatus*, *Orthogeomys cuniculus*, *Peromyscus bullatus* y *Sorex macrodon* presentan una pérdida drástica de su área de distribución, ya que conservan menos del 25% de su distribución potencial (Sánchez-Cordero *et al.*, 2005).

México se distingue por su alto porcentaje de especies endémicas de mamíferos (161, 30%), es decir, exclusivas del país, que lo colocan en el tercer lugar mundial, después de Indonesia y Australia (Ceballos y Brown, 1995). Sin embargo, estos países son insulares, por lo que México ocupa el primer lugar entre los países continentales. Una especie puede ser endémica en un área geográfica amplia o restringida, como ocurre en muchas especies insulares. Las unidades geográficas aisladas, tales como islas remotas, antiguos lagos y cumbres de montañas solitarias, a menudo tienen altos porcentajes de especies endémicas, las cuales son más propensas a la extinción que las especies no endémicas (Frankham, 1998; Primack *et al.*, 2001). En México, la mayoría de las especies endémicas son roedores, lo que es de esperarse dado su muy elevada diversidad y su baja movilidad, en comparación con otros órdenes. Las 113 especies de roedores endémicos, incluye a 74 cricétidos, 12 heterómidos, 13 geómidos, 13 sciúridos y un agutí (Ceballos *et al.*, 2005).

El bosque mesófilo de montaña es un caso particularmente extremo de fragmentación y aislamiento en México. Por ejemplo, estudios sobre la divergencia poblacional en varias especies, empleando caracteres morfológicos y moleculares han mostrado que cada "isla" representa una forma taxonómica endémica (Peterson *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2001; García- Moreno *et al.*, 2004). Así, conocer las consecuencias de la estructura y la diversidad genética de poblaciones que ocupan hábitat fragmentados es esencial para diseñar estrategias de conservación adecuadas y entender procesos de diferenciación y especiación (Kim *et al.*, 1998).

II.- ANTECEDENTES

2.1 Estructura genética y marcadores moleculares

La estructura genética de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos (Wenink, 1996). En las poblaciones naturales dicha estructura tiene un patrón temporal, ya que la proporción de individuos con un genotipo u otro cambia tanto en tiempos cortos (ecológicos) como largos (evolutivos). Asimismo, existe un patrón espacial de la estructura genética, que se refleja en las diferencias genotípicas o fenotípicas entre individuos de la misma especie que se encuentran en sitios diferentes (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2005; Vázquez-Domínguez, en preparación). El examinar las variaciones genéticas entre las poblaciones permite elucidar sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman *et al.*, 2000). Dicha variación genética es un prerrequisito para la evolución y de ahí su importancia (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007; Vázquez-Domínguez, en preparación).

Los niveles de variabilidad genética en una población están determinados por el número de genes con más de un alelo (genes polimórficos) y por el número de alelos para cada gen polimórfico. La existencia de un gen polimórfico permite a algunos individuos de una población diploide ser heterocigotos para ese gen, esto es, reciben un alelo diferente del gen de cada uno de sus padres. Esta variación genética es esencial en términos de los cambios temporales y espaciales que ocurren en el ambiente (Primack *et al.*, 2001); se ha observado que los individuos heterocigotos tienen una mayor adecuación biológica que aquellos homocigotos, esto es, tienen por ejemplo un mayor crecimiento, supervivencia y tasas de reproducción (Allendorf y Leary, 1986; Vázquez-Domínguez *et al.*, 1999).

El uso de marcadores moleculares permite estimar el grado de variación genética existente entre los individuos de una población, entre poblaciones y entre especies. Dentro de los principales marcadores moleculares encontramos a las aloenzimas, los microsatélites y las secuencias de DNA mitocondrial y nuclear. Con dichos marcadores es posible obtener información sobre la variabilidad genética, así como conocer las relaciones filogenéticas e inferir posibles orígenes (Crozier, 1997), reconstruir la historia evolutiva (Avice, 1994, 2000) y determinar las poblaciones y las especies prioritarias para la

conservación (Primack *et al.*, 2001), por mencionar algunos. A nivel de las poblaciones, se pueden obtener diversos parámetros como la tasa de migración, el tamaño poblacional, presencia de cuellos de botella, relaciones de parentesco, etc. (Selkoe y Toonen, 2006).

Uno de los marcadores moleculares más empleados por los ecólogos y en estudios de genética de poblaciones son los microsatélites, debido principalmente a su alto grado de polimorfismo (Lima-Rosa *et al.*, 2000), incluso en poblaciones pequeñas y en especies en peligro de extinción (Allendorf y Luikart, 2007). También se conocen como SSR, VNTR y STR (*Simple Sequence Repeats*, *Variable Number Tandem Repeats* y *Short Tandem Repeats*) (Tóth *et al.*, 2000; Selkoe y Toonen, 2006). Son marcadores moleculares codominantes que se heredan de forma mendeliana y que se presentan en altas frecuencias dentro del genoma nuclear de la mayoría de los taxones. Consisten en una serie de secuencias repetidas de 1-6 nucleótidos, los cuales varían en número (entre 5-40 repeticiones, aunque se pueden encontrar más grandes) y son altamente polimórficos. A cada lado del microsatélite se encuentran las regiones flanqueantes de secuencia única, también conocidas como oligonucleótidos o primers; estas regiones son muy conservadas en los individuos de una misma especie y algunas veces entre diferentes especies por lo que un locus de microsatélite puede ser identificado por dichas regiones (Selkoe y Toonen, 2006). Dicha característica permite que los primers diseñados para una especie en particular, puedan ser utilizados en estudios de taxones relacionados (Luikart y England, 1999; Frankham *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006). Cabe mencionar que las repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos son las más comunes y las que más se emplean en estudios de genética molecular (Selkoe y Toonen, 2006) siendo las primeras, las repeticiones más abundantes en los roedores (Tóth *et al.*, 2000).

Los microsatélites presentan altas tasas de mutación (entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación, en promedio 5×10^{-4}), por lo que intervienen en la evolución del genoma, creando y manteniendo parte de la variación genética (Tautz *et al.*, 1986; Kashi *et al.*, 1997). Esta diversidad alélica es la que se examina en estudios genéticos de procesos que actúan en escalas de tiempo ecológico (Schlötterer, 2000; Selkoe y Toonen, 2006); por otro lado, constituyen uno de los pocos marcadores moleculares que permiten buscar y analizar información a una escala temporal y espacial muy fina (Selkoe y Toonen, 2006), es decir, es posible detectar estructuración dentro de una población a escalas microgeográficas (O'Connell y Slatkin, 1993).

El modelo mutacional más aceptado para microsatélites es el de mutación paso a paso (“stepwise mutation model” o “SMM”, Kimura y Otha, 1978). Este modelo asume que las mutaciones ocurren por la adición o delección de las unidades de repetición nucleotídica que la componen. Dado lo anterior, se dice que cada mutación no será única ya que el alelo al que da lugar, posiblemente, ya se encuentre representado en la población. Sin embargo, aunque los alelos sean idénticos en estado pueden tener orígenes diferentes, a lo que se le conoce como homoplasia, la cual es una desventaja de los microsatélites, sobre todo si se emplean en estudios filogenéticos (Selkoe y Toonen, 2006).

Se ha documentado que el mecanismo mutacional de los microsatélites es más complicado que el SMM (Estoup y Angers, 1998; Li *et al.*, 2002), aunque parece ser, que éste es la fuerza dominante que da lugar a nuevos alelos (Ellegren, 2004). Por otro lado, los microsatélites que no siguen este modelo y que se analizan bajo sus supuestos, presentan resultados menos fidedignos que sí se analizaran bajo el modelo mutacional de alelos infinitos (“Infinite allele model” o “IAM”) (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Landry *et al.*, 2002).

2.2 El Bosque Mesófilo de Montaña

El bosque mesófilo de montaña *sensu* Rzedowski (1978) es un tipo de vegetación de gran complejidad y riqueza; los elementos que lo componen tienen orígenes muy diferentes y se presentan en forma de diversas asociaciones que frecuentemente difieren en cuanto a la altura, fenología y especies dominantes (Luna *et al.*, 1988). Este tipo de vegetación se caracteriza por su origen biogeográfico complejo, su distribución archipelágica, la presencia de taxones paleoendémicos y neoendémicos y su gran diversidad, lo que le confiere una gran importancia biológica y biogeográfica

En México, el bosque mesófilo de montaña es un tipo de vegetación relictual que cubre menos del 1% del país y, a pesar de que ha disminuido por la deforestación (Challenger, 1998) y la agricultura (Luna *et al.*, 1994, 1999), contribuye con cerca del 10-12% de la flora total. Rzedowski (1996) ha sugerido que el bosque mesófilo alberga al menos 2500 especies de plantas vasculares, lo que lo convierte en uno de los tipos de vegetación más diversos por unidad de superficie junto con el bosque tropical perennifolio. Los estados con mayor superficie de bosque mesófilo de montaña son Oaxaca (con 35 217 ha), Chiapas (27 526 ha) e Hidalgo (21 641 ha) (Ortega y Castillo, 1996).

Fisionómicamente, este bosque es denso, con alturas de árboles entre 15-30 m, algunos pueden llegar a tener una altura de 40-60 m. Se encuentra multiestratificado, en general el estrato arbóreo superior está dominado por taxones deciduos y los estratos inferiores por taxones siempre verdes. El estrato arbóreo está frecuentemente multiestratificado, con tres o más subestratos y los helechos arbóreos son comunes. Generalmente se presentan uno o dos estratos arbustivos así como un herbáceo que tiende a ser pobre cuando la comunidad está conservada. Las epífitas y las pteridofitas son abundantes y diversas (Luna y Alcántara, 2004). Para que este bosque pueda establecerse, requiere de una humedad relativa alta, ambiente de montaña, topografía irregular, suelo con una capa profunda de hojarasca y clima templado (Velázquez *et al.*, 2000). Su complejidad estructural decrece conforme aumenta la latitud y varía de una loma a otra. Se le encuentra desde los 600 a los 3200 msnm, aunque con mayor frecuencia entre los 1000-1750 msnm (Luna *et al.*, 1988). Puede alternar con bosques de encinos y de coníferas, especialmente en cañadas protegidas del viento y la insolación, frecuentemente contiguos a cuerpos de agua o vegetación riparia, generalmente en zonas de pendiente abrupta (Luna *et al.*, 1994).

Bajo un contexto dispersalista, donde México ha sido considerado como receptor de ciertos elementos florísticos y como centro de origen y radiación de otros, dado que presenta la zona de transición entre las regiones Neártica y Neotropical, se ha postulado que el bosque mesófilo mexicano tiene una relación estrecha con los bosques caducifolios del este de Estados Unidos y con el este de Asia (Sharp e Iwatsuki, 1965; Puig, 1989), y de igual forma con bosques similares de América del Sur (Rzedowski, 1996). La antigüedad de ciertas asociaciones florísticas, así como la presencia de sus registros en lugares donde actualmente se encuentra otro tipo de vegetación, ha conducido a pensar que el bosque mesófilo tuvo en el pasado una distribución más extensa y continua.

Dada la distribución en forma de archipiélago que presentan estos bosques, cada parche o "isla" tiene una composición diferente de flora y fauna (Luna *et al.*, 1999). Estas condiciones hacen importante su estudio desde un punto de vista biogeográfico (Luna *et al.* 1994), ya que estas zonas han actuado como centros de diversificación y endemismo para múltiples grupos como plantas (Luna *et al.*, 1999), insectos (Halffter, 1987), mamíferos (Sullivan *et al.*, 2000; León-Paniagua *et al.*, 2007), aves (García-Moreno *et al.*, 2004) y reptiles (Duellman, 1966). Los patrones filogenéticos y biogeográficos de los taxones que habitan las zonas montañas de Mesoamérica están siendo explorados

recientemente (García-Moreno *et al.*, 2004); los resultados encontrados sugieren que existen procesos complejos que han producido la alta diversidad biótica y los endemismos de la región.

En la actualidad este tipo de vegetación es uno de los más amenazados (Bubb *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2005), por lo que es urgente establecer programas de recuperación; según Halffter (1992), la conservación de ecosistemas que contienen muchos endemismos debería ocupar el primer lugar en una estrategia global, ya que la destrucción de estos ecosistemas representa la pérdida de líneas evolutivas únicas.

2.3 Género *Habromys*

El género *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) es un grupo de ratones de talla relativamente pequeña, morfológicamente homogéneos, que habitan las zonas montanas de Mesoamérica, desde el centro y sur de México hasta Guatemala, El Salvador y Honduras (Carleton, 1989; Carleton *et al.*, 2002). Su distribución geográfica es discontinua, dada su restricción a hábitats de bosque mesófilo de montaña y de pino-encino (Carleton *et al.*, 2002). Sus poblaciones se encuentran entre los 1800 y 3150 msnm, donde la abundancia es baja (Romo *et al.* 2005). Dados sus hábitos arbóreos, las condiciones ambientales tan específicas que requieren (Carleton *et al.*, 2002; Romo *et al.* 2005 y León-Paniagua *et al.* 2007) y su distribución fragmentada, es extremadamente difícil encontrarlos, por lo que están escasamente representados en las colecciones científicas. Por lo anterior, el conocimiento biológico general de las especies de este género es escaso, lo mismo que las reconstrucciones filogenéticas. Con base en los trabajos que existen sobre su taxonomía, aunque con propuestas variables y cambiantes, se reconocen siete especies; *H. simulatus* de la Sierra Madre Oriental, *H. delicatulus* y *H. schmidlyi* del Eje Volcánico Transversal, *H. chinanteco*, *H. ixtlani* y *H. lepturus* de la Sierra de Juárez en el norte de Oaxaca y *H. lophurus* de Chiapas a El Salvador.

Inicialmente dichas especies se consideraban parte del género *Peromyscus* (Hooper y Musser, 1964), pero Carleton (1980, 1989) lo reconoce como género. Los caracteres anatómicos diagnósticos del grupo que fueron utilizados para esta separación fueron la estructura y la disposición del báculo y las glándulas reproductivas accesorias de los

machos, la falta de gancho acrosomal y un mayor número de vértebras torácico-lumbares (20) y costillas (13). Hooper (1968) sugiere que estos ratones representan un taxón relictual independiente que divergió tempranamente de *Peromyscus*.

De acuerdo con Carleton (1980) este género es monofilético y se encuentra cercanamente relacionado con roedores de los géneros *Neotomodon* y *Podomys*. Por otro lado, la evolución de este género está asociada con los cambios que experimentaron los bosques durante el Pleistoceno, seguidos de eventos vicariantes. Romo *et al.* (2005), utilizando comparaciones morfométricas y anatómicas, encuentran dos linajes filogenéticos dentro de *Habromys*: uno es el de las especies pequeñas (*H. delicatulus*, *H. chinanteco*, *H. simulatus* y *H. schmidlyi*) y, el otro incluye a las especies grandes (*H. lepturus*, *H. ixtlani* y *H. lophurus*).

Recientemente León-Paniagua *et al.* (2007) realizaron la filogenia del género completo, empleando los genes mitocondriales ND3 y ND4, en la que se confirmó la monofilia del grupo como había sugerido previamente Carleton (1980). Los análisis sugieren una relación con los géneros *Peromyscus*, *Podomys*, *Neotomodon* y *Reithrodontomys*. Sin embargo, no se resuelve claramente su relación con otros roedores neotominos. Se encontró que la especie más basal del grupo es *H. simulatus*, mientras que *H. lophurus* parece ser la especie derivada más recientemente. Los datos obtenidos apoyan fuertemente la existencia de cuatro clados mayores dentro del género: *H. simulatus*, *H. delicatulus* más *H. schmidlyi*; *H. lepturus* más *H. chinanteco* e *H. ixtlani* y *H. lophurus*. Todos los análisis apoyan que *H. simulatus* y *H. lophurus* están compuestos cada uno por dos taxones diferentes. El primer clado de *H. simulatus* contiene a las poblaciones de la Sierra Madre Oriental (*H. simulatus*) y el segundo a las poblaciones de la Sierra Mazateca, en las tierras altas de Oaxaca (*Habromys sp. nov. 1*, León-Paniagua *et al.*, 2007) (Figura 1). Se sugiere que esta divergencia es suficiente para considerarlas como dos especies diferentes aunque la separación sea reciente. Esta divergencia es apoyada por los datos del número de cromosomas (80 vs. 78; Vargas *et al.* en preparación) y los cariotipos entre ambas poblaciones. Este patrón se ha observado en otras especies de roedores que sugieren una historia evolutiva aislada e independiente después de eventos de vicarianza (*Peromyscus furvus*; Harris *et al.*, 2000). Incluso la estructura y composición de la vegetación entre la Sierra Mazateca y las montañas aledañas (Ruíz-Jiménez *et al.*, 2000) sugieren la existencia de hábitat en forma de "isla", lo

que se refleja en la diferenciación de la fauna de vertebrados asociada (García-Moreno et al., 2004).

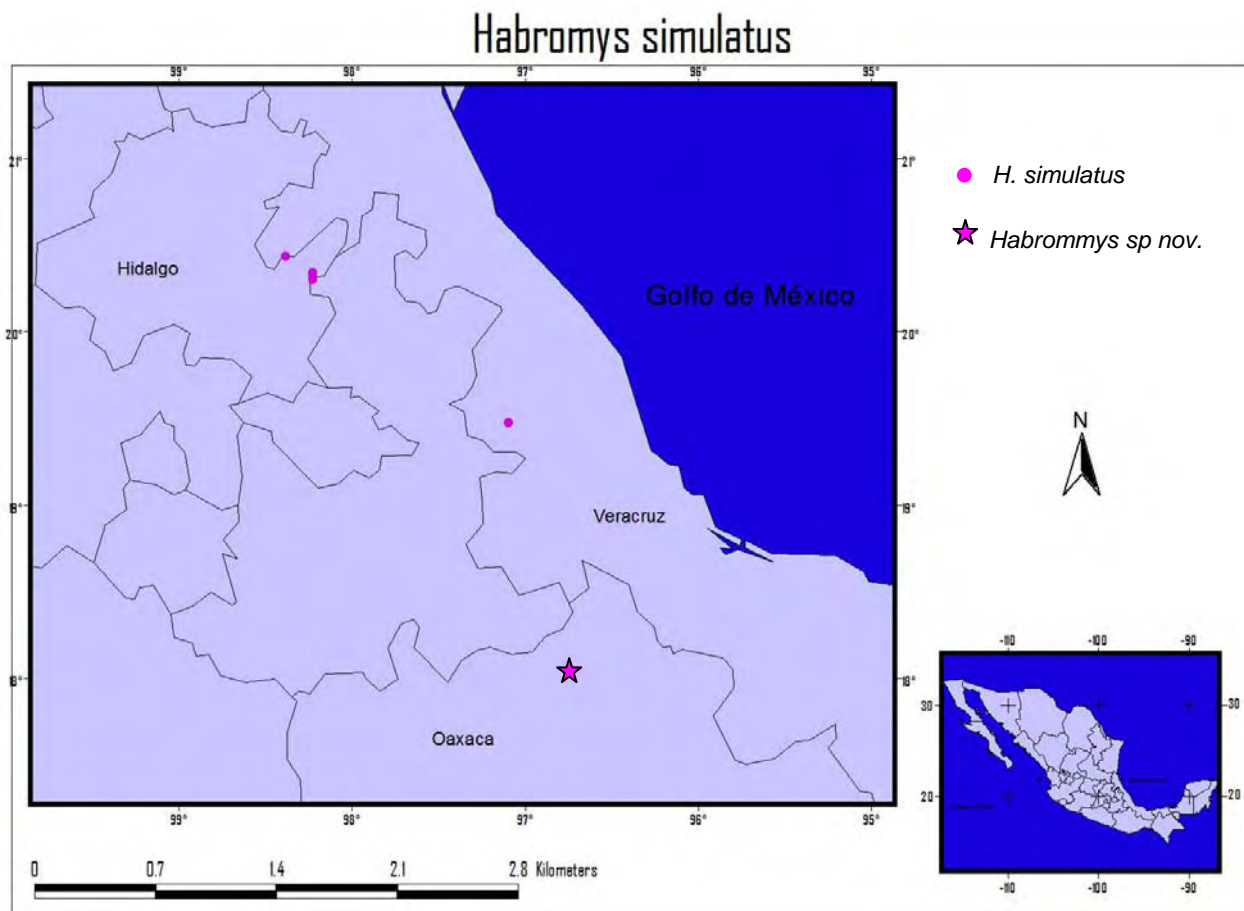


Figura 1. Mapa de localidades de *Habromys simulatus*, donde se indica la nueva propuesta de León-Paniagua et al., 2007.

2.4 *Habromys simulatus*

•Nombre común: Ratón silvestre veracruzano, Jico deer mouse.

Sinonimias

Año	Sinónimo	Referencia
1904	<i>Peromyscus simulatus</i>	Osgood, Proc. Biol. Soc. Washington, 17: 72
1982	<i>Habromys simulatus</i>	Honacki et al., in: Mammal Species of the World. p. 419.

Son roedores de tamaño muy pequeño (17-19 gr.). La coloración del pelaje en las partes superiores es de color pardo oscuro a café canela, con una línea lateral de color ocre que separa los lados de las partes ventrales blancas. Las patas traseras son negruzcas hasta la base de los dedos y las anteriores son totalmente blancas. Las marcas faciales son casi negras. La cola es de un solo color, peluda y con una cresta de pelos largos que forman un mechón bien definido en el extremo distal en forma de pincel. El cráneo es parecido al de *H. lophurus* pero más pequeño; la caja craneal es más inflamada y el rostro más comprimido. La bula auditiva es relativamente grande. Presentan dientes pequeños (Fórmula dentaria: I 1/1, C 0/0, P 0/0, M 3/3 = 16), las medidas externas aproximadas son: LT: 168-203mm; CV: 78-111; P: 21-24; O: 16-19. (Osgood, 1904; Musser, 1969; Villa y Cervantes, 2003; León-Paniagua y Romo, 2005).

Son ratones arborícolas con distribución restringida a bosques mesófilos, en las áreas de vegetación densa, fría y muy húmeda compuesta principalmente por encinos. Se encuentran restringidos a 2000 msnm. Se sugiere que se alimenta de musgos y bromelias, las cuales también utilizan como refugios.

Es una especie monotípica y endémica de México, está considerada como un taxón relicto (Carleton, 1990). Se desconoce el estado de sus poblaciones ya que no se tienen datos sobre su reproducción, ecología o genética. Sin embargo, es importante mencionar que la vegetación original en donde fue recolectada esta especie (localidad tipo Xico, Veracruz), se ha reemplazado por cultivos de café (*Cofea arabiga*), por lo que se sugiere considerarse en peligro de extinción (León-Paniagua y Romo, 2005).

Su distribución incluye la localidad tipo en Xico, Veracruz; 3 km al oeste de Zacualpan, en la ladera este de la Sierra Madre Oriental en Veracruz; El Potrero en Hidalgo y Puerto de la Soledad en Oaxaca. Las dos primeras se consideran poblaciones extintas, debido a la pérdida del hábitat, por deforestación o a que ha sido sustituido por potreros, mientras que las dos últimas fueron registradas aproximadamente en el año 2000 (León-Paniagua, 2004 *comunicación personal*).

Tomando en cuenta las características que presenta *H. simulatus*, tales como una distribución geográfica restringida, sólo dos poblaciones, tamaños poblacionales pequeños y requerimientos de hábitat especializados, se considera que es una especie vulnerable a la extinción (Primack *et al.* 2001). Sin embargo, la escasa información que se tiene sobre la especie no ha permitido que se clasifique en alguna categoría de conservación. Por ello, generar la información biológica y genética de *H. simulatus* es particularmente importante y

de alta prioridad. Esta especie estaría aún más amenazada con la propuesta de León-Paniagua *et al.* (2007) de considerarla como dos especies diferentes, ya que su distribución geográfica se vería aún más reducida y sus poblaciones conocidas se limitarían a una, respectivamente. Debido a que el uso de marcadores moleculares ha permitido, entre muchos otros aspectos, evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y especies, conocer las relaciones filogenéticas, inferir su posible origen (Crozier, 1997), reconstruir la historia evolutiva (Avice, 1994, 2000) y establecer poblaciones y especies prioritarias para la conservación, el objetivo del presente estudio fue evaluar la diversidad y diferenciación genética existente en las poblaciones de *H. simulatus*, con el fin de proponer estrategias para su conservación.

III.- OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la diversidad y diferenciación genética existente en las poblaciones de *Habromys simulatus*, con el fin de proponer estrategias de conservación.

Objetivos Particulares

- Determinar la variación genética de *H. simulatus*.
- Evaluar la estructura genética de las poblaciones de *H. simulatus* así como el flujo génico y diferenciación entre poblaciones.
- Comparar los resultados obtenidos con la propuesta de que *H. simulatus* incluye a dos especies diferentes.
- Proponer acciones de conservación adecuadas para *H. simulatus* a partir de la información obtenida.

IV.- MÉTODO

4.1 Obtención de muestras y trabajo de campo

Para la obtención de muestras se realizó una búsqueda de ejemplares de museo en las principales colecciones del país y del extranjero (Anexo 1). Como resultado de esta búsqueda se solicitaron muestras de tejido de *H. simulatus* a la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias, UNAM. Con el fin de incrementar el tamaño de muestra se realizó una salida de campo a la localidad de El Potrero, Hidalgo del 8 al 18 de abril del 2006. Cabe mencionar que previo al inicio de este trabajo ya se había realizado una salida de campo a la misma localidad en la que se encontraron tres ejemplares de *H. simulatus* (marzo 2004) y una a Puerto de la Soledad (2005) en la que no fue posible encontrarlos. El método de trampeo que se empleó fue muy específico y dirigido a estos ratones arborícolas, ya que se emplearon trampas Sherman colocadas sobre rejillas en los troncos de los árboles entre alturas de tres a 20 metros, para lo cual se empleó equipo de escalada y de descenso. Se usaron de 7 a 8 trampas en cada uno de los 10 árboles muestreados. Cada trampa estuvo activa en promedio de 8 a 9 noches. Como cebo se empleó una mezcla de avena, crema de cacahuate, vainilla y manzana. A cada individuo colectado se le tomó una muestra de tejido (oreja) previo a su liberación. Tres de estos ejemplares fueron colectados y depositados en la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología, para realizar estudios de cariotipo, aparato reproductor y morfometría.

4.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA de tejido (oreja, hígado, corazón y riñón) se realizó con el kit comercial AquaPure Genomic DNA (BIORAD), siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo 2). Para las muestras de piel se empleó el kit de DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del proveedor (Anexo 3), ya que es recomendable en casos donde el DNA está degradado o se encuentra en pocas cantidades (ejemplares de museo). Para cuantificar la cantidad de DNA y su pureza (libre de proteínas y RNA) se empleó un biofotómetro Eppendorf (BioPhotometer 6131), el cual nos proporciona la concentración de DNA (ng/μl) (Anexo 4). Cuando los resultados de las lecturas del

biofotómetro no eran adecuadas, las muestras se visualizaban en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio al 0.5 µg/ml y visualizados con luz UV, de esta manera se estimaba la concentración de DNA y su degradación, empleando una referencia de pesos moleculares específicos (Anexo 5).

4.3 Estandarización de PCR

Se probaron 12 pares de oligonucleótidos o primers para la amplificación de 12 loci de microsatélites en *H. simulatus* (Cuadro 1), los cuales fueron desarrollados previamente para *Peromyscus maniculatus* (Chirhart *et al.*, 2000, 2005). Cabe destacar que la elección de estos primers se basó principalmente en el hecho de que *Habromys* y *Peromyscus* son géneros hermanos.

Cuadro 1.-Loci de microsatélites amplificados por 12 pares de primers para *Peromyscus maniculatus* (Chirhart *et al.*, 2000) y utilizados en *Habromys simulatus*.

Locus	Número de repeticiones CA	Número de acceso a GeneBank	Intervalo de tamaño de los alelos (pb)
Pml01	18	AF251775	145-187
Pml02	20	AF251776	195-245
Pml03	22	AF251777	221-261
Pml04	27	AF251778	194-232
Pml05	21	AF251779	186-214
Pml06	24	AF251780	126-176
Pml07	18	AF251781	229-263
Pml08	20	AF251782	211-251
Pml09	25	AF251783	190-258
Pml10	21	AF251784	158-200
Pml11	23	AF251785	218-254
Pml12	20	AF251786	143-179

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) variaron para cada primer (Anexo 6). La estandarización consistió básicamente en la modificación de MgCl₂, primer, DNA y en el número de ciclos y temperatura de alineamiento durante el PCR. En

cada PCR se utilizó un control negativo para asegurar que no existía contaminación en los experimentos.

4.4 Geles de poliacrilamida

La separación de los productos de la amplificación de los microsatélites se hizo en geles de poliacrilamida al 6% que corrieron aproximadamente 3:30 horas a 500 volts en el caso de los geles chicos y de cuatro a 4:30 horas a 1300 volts en el caso de los grandes. La preparación y el montaje de los vidrios así como su tinción en plata se muestran en el Anexo 7. Los geles teñidos fueron visualizados con luz UV y fotografiados digitalmente; posteriormente dichas fotografías se analizaron en el programa LabWorks Image Acquisition and Analysis Software Version 4.5 (UVP, BioImaging Systems), donde la presencia de los microsatélites se estimó comparando el peso molecular de las bandas obtenidas con un indicador de peso molecular (escalera de 10 pb, Invitrogen). La determinación de los genotipos (homócigos o heterócigos) no fue posible con este método ya que la separación de las bandas no fue suficiente para leerlas adecuadamente en el programa. Por lo anterior, sólo fue posible estimar si el loci era polimórfico o no.

4.5 Secuenciación y lectura de los microsatélites

Para la secuenciación de los microsatélites fue necesario emplear primers fluorescentes (Cuadro 2) que fueron estandarizados nuevamente modificando las concentraciones de $MgCl_2$, primer, DNA y el número de ciclos y temperatura de alineamiento durante el PCR. Para la amplificación se empleó el kit de HotStarTaq Mix (QIAGEN) y los tubos preparados de Illustra-PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE). Las condiciones para cada primer fueron diferentes (Anexo 8). Para la obtención de los genotipos de cada locus se empleó el secuenciador de capilar ABI Prism 310 Genetic Analyzer y ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), en el cual se incorporó una mezcla de 1 μ l del producto de PCR, 12 μ l de Formamida deionizada (HiDi) y 0.5 μ l de GeneScan-500 ROX Size Standard. Previo al ingreso en el secuenciador, cada muestra fue desnaturalizada por 5 minutos a 95°C, seguido de 5 minutos en hielo.

El tamaño de los alelos se obtuvo en el programa GENESCAN 3.1 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por medio de la calibración y la comparación

directa con la escalera interna ROX. Cabe destacar que en los casos en los que no se obtenían amplificaciones adecuadas se modificaron las concentraciones de DNA de cada muestra durante el PCR.

Cuadro 2.-Primers forward fluorescentes utilizados en *Habromys simulatus* para amplificar 12 loci de microsatélite.

Primer	Tipo de marcador o "dye" en el extremo 5´	Primer	Tipo de marcador o "dye" en el extremo 5´
Pml01	FAM	Pml07	FAM
Pml02	FAM	Pml08	HEX
Pml03	HEX	Pml09	FAM
Pml04	HEX	Pml10	HEX
Pml05	HEX	Pml11	HEX
Pml06	HEX	Pml12	FAM

4.6 Diversidad genética

La diversidad genética es uno de los atributos más importantes en cualquier población, ya que permite que los individuos puedan adaptarse a su medio, por lo que el estimar dicha diversidad es el eje central de la genética de poblaciones; además implica información esencial en estudios de biología de la conservación.

Con el programa GenePop 3.4 (Raymond y Rousset, 1995) se analizó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con su coeficiente de endogamia, el desequilibrio de ligamiento, las frecuencias alélicas, los genotipos observados y las distribuciones alélicas y genotípicas para las dos poblaciones de *Habromys simulatus*. Las pruebas de probabilidad se llevaron a cabo mediante dos métodos: 1) Cadenas de Markov para cada locus por población, utilizando los siguientes criterios del programa: 1000 *dememorizaciones*, 200 *batches* y 1000 *iteraciones* y 2) Método de Fisher para los 10 loci por población.

El equilibrio de H-W es el modelo teórico más simple en genética de poblaciones, el cual establece que después de una generación con apareamientos al azar las frecuencias alélicas y genotípicas de un locus se mantienen en equilibrio, es decir que no cambian de una generación a otra, siempre y cuando no exista mutación, migración o selección. Bajo

este supuesto las frecuencias genotípicas pueden ser representadas como función de las frecuencias alélicas (Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007). La hipótesis nula para esta prueba es “la unión aleatoria de los gametos” que es rechazada cuando $p \leq 0.05$. En el mismo análisis se obtuvieron los coeficientes de endogamia (F_{is}) de Weir y Cockerham para cada población por locus, cuyos valores negativos indican un exceso de heterocigos y los positivos una deficiencia. Se decidió emplear dicho estimador debido a la variación que se presenta en el tamaño de nuestras muestras, ya que éste pondera las frecuencias alélicas con respecto al tamaño de la muestra.

El valor de significancia de los valores de p fue evaluada mediante la corrección de Bonferroni secuencial. Para aplicar dicha corrección se determina el nivel de significancia ($p=0.05$) y el número de comparaciones (k), los valores de p se ordenan de menor (p_1) a mayor (p_k). Si $p_1 \leq \alpha/k$ se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el segundo valor más pequeño de p . Si $p_2 \leq \alpha/(k-2+1)$ se rechaza nuevamente la hipótesis nula y se prosigue con el siguiente valor. Si $p_3 \leq \alpha/(k-3+1)$ se rechaza una vez más la hipótesis nula y así sucesivamente hasta que se acepta la hipótesis. La corrección de Bonferroni elimina los valores de significancia asignados por el azar y se utiliza cuando se tienen comparaciones múltiples (Rice, 1989).

La asociación no aleatoria entre alelos de diferentes loci se conoce como desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium), lo cual puede ser consecuencia de eventos azarosos en poblaciones pequeñas, cuellos de botella, la unión reciente de poblaciones diferentes y cualquier tipo de selección (Frankham *et al.* 2005). La hipótesis nula para esta prueba es que “los genotipos de un locus son independientes de los de otro locus” y se rechaza si $p \leq 0.05$.

Se evaluó la diferenciación alélica y genotípica entre poblaciones, donde la hipótesis nula es “la distribución alélica/genotípica es la misma a lo largo de las poblaciones”. Esta prueba se hizo por poblaciones pareadas para cada locus y con los 10 loci en conjunto. Los valores de p se obtuvieron mediante una prueba de Fisher (Raymond y Rousset, 1995) para la distribución alélica y con una prueba de G (Goudet, *et al.*, 1996) para los genotipos. Se empleó la corrección de Bonferroni secuencial para los valores de p .

Para estimar la diversidad genética existente en las dos poblaciones se calculó el número observado de alelos (n_o), el número efectivo de alelos (n_e), la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e) y la heterocigosidad esperada no sesgada de Nei (H_{NEI}) (Nei, 1987) con el programa PopGene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

El número observado (n_o) de alelos se considera una medida complementaria de diversidad genética ya que es más sensible a la pérdida de diversidad genética en poblaciones pequeñas que la heterocigosidad, además de ser una medida importante del potencial evolutivo de las poblaciones (Allendorf, 1986). Se encuentra altamente relacionado con el tamaño de la muestra. El número efectivo de alelos (n_e) es el número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal, los cuales producirían la misma heterocigosidad u homocigosidad observada en la población actual (Allendorf y Luikart, 2007) y se calcula como el inverso de la homocigosidad esperada:

$$n_e = 1 / \sum P_i^2$$

donde P_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un locus en una población.

La heterocigosidad es una de las medidas de diversidad genética a nivel poblacional más ampliamente utilizada, ya que los individuos de especies diploides pueden ser heterócigos u homócigos para un locus dado. La heterocigosidad observada puede calcularse como:

$$H_o = N_{ij} / N$$

donde N_{ij} es el número de heterócigos observados para un locus dado y N es el total de los individuos muestreados.

La homocigosidad esperada esta dada por:

$$J = \sum P_i^2$$

donde P_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un determinado locus en una población.

La heterocigosidad esperada bajo el equilibrio de H-W en n loci dentro de una población se puede calcular como:

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

que es uno menos la homocigosidad bajo equilibrio de H-W (frecuencias alélicas al cuadrado).

Nei (1978) sugirió que cuando se trata de muestras pequeñas debe de hacerse una pequeña corrección en la fórmula:

$$H_{NEF} = 2N(2N-1)(1 - \sum P_i^2)$$

donde N es el tamaño de la muestra y P_i es la frecuencia el i ésimo alelo (i th) para un locus en una población (Hedrick, 2005).

4.7 Estructura genética

Una de las medidas que se emplea para cuantificar diferencias entre poblaciones es la distancia genética. En algunos casos se utiliza para delimitar poblaciones alopátricas como especies separadas bajo el contexto de similitudes genéticas (Coyne y Orr, 1989, Frankham *et al.* 2005), ya que el aislamiento reproductivo se encuentra relacionado con su diferenciación genética. Una de las medidas más empleadas es la distancia genética de Nei (D_N) que se define como:

$$D_N = -\ln(I_N)$$

donde I_N es el índice de similitud genética de Nei, que se define como:

$$I_N = \sum_{i=1}^m (P_{ix} P_{iy}) / [(\sum_{i=1}^m P_{ix}^2) (\sum_{i=1}^m P_{iy}^2)]^{1/2}$$

donde P_{ix} es la frecuencia del alelo i en la población (o especie) x y P_{iy} es el alelo i en la población (o especie) y , y m es el número de alelos presentes en el locus. Cuando las frecuencias alélicas son similares en dos poblaciones ($P_{ix} = P_{iy}$), la similitud genética se aproxima a 1 y la distancia genética a cero. Contrariamente, cuando las dos poblaciones no comparten alelos el índice de similitud es cero y la distancia genética es infinita (Frankham *et al.*, 2005).

Otra medida importante para estudios de estructura genética es el flujo génico que existe entre las poblaciones, ya que si éste se ve reducido considerablemente puede provocar endogamia o depresión endogámica; por otro lado, un exceso puede limitar las adaptaciones locales o causar depresión exogámica. Su estimación y monitoreo puede ayudar en mantener la viabilidad de las poblaciones frente a cambios ambientales o fragmentación del hábitat por lo que se utiliza en estudios de biología de la conservación. Una medida indirecta del flujo génico entre poblaciones es la estimación del número de migrantes (Nm); en este caso se calcula a partir de las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones (F_{ST} o R_{ST}) (Gaggiotti *et al.*, 1999; Allendorf y Luikart, 2007), para lo cual se empleó el programa Arlequín 3.11 (Schneider *et al.*, 2000).

El grado de endogamia que resulta de la fragmentación de una población puede ser usado como una medida de diferenciación entre los fragmentos o subpoblaciones de dicha población, diferenciación que puede expresarse en términos de los coeficientes de endogamia. Sewall Wright (1931, 1951, 1969) utilizó tres coeficientes para describir la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones, denominándolos

estadísticos F (F_{IS} , F_{ST} y F_{IT}). La F_{ST} o índice de fijación es una medida de divergencia entre las frecuencias alélicas de las subpoblaciones. Se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en una población sean idénticos por descendencia, su valor siempre es positivo y mantiene una relación inversamente proporcional con el flujo génico entre poblaciones. La F_{IS} o coeficiente de endogamia y la F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg de los individuos dentro de las subpoblaciones y de los individuos respecto al total, respectivamente. F_{IS} es definido como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia, su valor es positivo si hay una deficiencia de heterocigos y negativo si hay un exceso (Frankham *et al.* 2005, Allendorf y Luikart, 2007). Con el programa GenePop 3.4 se calcularon éstos valores para cada loci.

Se evaluó la estructura y diferenciación genética dentro y entre poblaciones con el estimador de F_{ST} (basado en el número de alelos diferentes entre las poblaciones; Weir y Cockerham, 1984; Michalakis y Excoffier, 1996) y el de R_{ST} (suma de las diferencias al cuadrado de los tamaños de los alelos; Slatkin, 1995; Michalakis y Excoffier, 1996) con el programa Arlequín 3.11. Es importante mencionar que el índice de R_{ST} es más adecuado para análisis con microsatélites (Slatkin, 1995) ya que utiliza la varianza de los tamaños de los alelos y se basa en el modelo de mutación paso a paso (stepwise-mutation model), el cual presenta una alta tasa de mutación y asume que éstas ocurren solamente a estados adyacentes (Ohta y Kimura, 1973; Ellegren, 2004). Sin embargo, Gaggiotti *et al.* (1999) encuentran que cuando el tamaño de muestra ($N < 50$) y el número de loci analizados (< 20) son pequeños, es mejor utilizar el estimador de F_{ST} ya que con el R_{ST} se pueden obtener datos erróneos.

También se hizo una prueba de varianza molecular (AMOVA), con Arlequín, empleando 30 000 permutaciones. El AMOVA utiliza métodos permutacionales no paramétricos (Excoffier *et al.*, 1992) para analizar la distribución de la varianza genética entre los diferentes niveles jerárquicos de agrupación, mediante la partición de la varianza en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones y entre los individuos de la población.

Se realizó un análisis de asignación basado en un método de frecuencias (Paetkau *et al.*, 1995) con el programa GeneClass 2.0 (Piry *et al.*, 2004), en el cual el genotipo de cada individuo se analiza para determinar a qué población es más probable que pertenezca según las frecuencias genotípicas que se presenten en las poblaciones,

también es utilizado para detectar posibles migrantes (Paetkau *et al.*, 1995, 1997). Cabe destacar que a pesar de que los métodos probabilísticos (frecuencias y bayesianos) asumen que existe equilibrio de H-W y que no existe desequilibrio de ligamiento, siempre se obtienen mejores resultados de asignación que los métodos de distancia, a pesar de que los supuestos no se cumplan (Cornuet y Luikart, 1996).

En el programa Genetix 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004) se hizo un análisis factorial de correspondencias (AFC, Benzécri, 1973; Escofier y Pagès, 1990). Es un análisis estadístico multidimensional que sintetiza bases de datos grandes, sin modificar la naturaleza de los mismos. En este caso los objetos analizados (grupo de individuos) son visualizados como una nube de puntos en un hiperespacio que tiene tantas dimensiones como número de alelos. Para tomar en cuenta el genotipo de cada individuo, a cada uno de los alelos de los diferentes loci se le asigna un valor de 0 para la ausencia, 1 para la presencia en estado heterocigoto y 2 para la presencia en estado homocigoto; con esto se elabora una tabla de contingencia a partir de la cual se grafica. El algoritmo empleado por el análisis encuentra el punto de inercia máximo (el punto de mayor similitud) para cada uno de los puntos del hiperespacio.

4.8 Cuello de botella, alelos nulos y relaciones de parentesco

Las poblaciones que han tenido reducciones drásticas y/o relativamente recientes en su tamaño poblacional efectivo presentan una disminución en el número de alelos de loci polimórficos y en su heterocigosidad. Sin embargo, la diversidad alélica se pierde más rápido que la diversidad genética, es decir, la heterocigosidad observada es mayor que la esperada a partir del número de alelos observados siempre y cuando exista un equilibrio entre deriva y mutación en los loci analizados (Luikart *et al.* 1998). Esto se ha demostrado para loci que evolucionan siguiendo el modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés) y no para el modelo de mutación paso a paso (SMM) donde no necesariamente se observa este exceso. Un modelo intermedio entre estos dos es el de mutación de dos fases (TPM), el cual es más recomendable para microsatélites (Di Rienzo *et al.*, 1994; Cornuet y Luikart, 1996). Para determinar si las poblaciones estudiadas pasaron por cuellos de botella se estimó la heterocigosidad observada y esperada bajo el modelo de TPM con un 90% de SMM y un 10% de IAM y una varianza de 10% (porque se ha observado que los microsatélites no se comportan 100% siguiendo el SMM) con el

programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996). De igual forma se emplearon los valores de *default* (70% SMM, 30% IAM y varianza de 10%), ambos con 10,000 replicaciones. Para determinar si la población presentó un exceso significativo de heterocigosidad se realizó una prueba de Wilcoxon ya que puede emplearse para pocos loci y sin importar el tamaño de muestra.

Como se mencionó anteriormente, las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg pueden deberse a diferentes aspectos en las poblaciones (endogamia, selección, efecto Wahlund, etc.), o alternativamente, pueden indicar la presencia de alelos nulos. En microsatélites, dichos alelos resultan de sustituciones en el DNA (regiones flanqueantes del microsatélite) que impiden que los primers puedan adherirse a éste (Callen *et al.*, 1993; Brookfield, 1996), por lo que los heterocigos con un alelo nulo son analizados como homocigos, lo que provoca un aparente exceso de homocigos bajo las proporciones de H-W. Para detectar la presencia de dichos alelos se empleó el programa Micro-Checker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), con un intervalo de confianza del 95% y 1000 repeticiones, el cual además corrige las frecuencias alélicas y genotípicas en caso de encontrar alelos nulos. El programa calcula dichas frecuencias con base en cuatro estimadores; se eligió el de Brookfield 1, ya que es el que mejor se adecua a los datos, el cual supone que no existen homocigotos con alelos nulos e ignora las muestras que no amplificaron debido a DNA degradado, errores en las lecturas o durante el PCR. La heterocigosidad observada se calculó como $n_2/(n_1+n_2)$, donde n_1 es el número de individuos con una sola banda y n_2 el número de individuos con dos bandas, mientras que la heterocigosidad esperada es la sumatoria del producto de las frecuencias alélicas observadas.

A pesar de que la presencia de estos alelos puede ser común (Lehaman *et al.*, 1996; Van Treuren, 1998; Shaw *et al.*, 1999; McGoldrick *et al.*, 2000), sus efectos en análisis genéticos han recibido poca atención, sin embargo se sabe que afectan los estimadores de F_{ST} y R_{ST} , así como los análisis de parentesco.

Con el programa Free-Na se estimó la F_{ST} de Weir (1996) mediante el método de ENA (Chapuis y Estoup, 2007), el cual corrige cualquier efecto provocado por la presencia de alelos nulos. Por otro lado, con el método de INA (Chapuis y Estoup, 2007) se obtuvo una base de datos con los genotipos corregidos a partir de la cual se estimó la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) en el programa GeneClass 2.

Los datos genéticos frecuentemente son usados para estimar la relación genealógica entre individuos con ancestros desconocidos (e.g. Blouin, 2003). Matemáticamente, esto se representa como la probabilidad de que los genotipos de los individuos compartan cero, uno o dos alelos idénticos por descendencia (e.g. Lynch y Walsh, 1998; Blouin, 2003; Buckleton *et al.*, 2005). Con el programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.*, 2006) se estimó la relación de parentesco entre individuos. La ventaja de este programa es que se basa en pruebas de máxima verosimilitud e incluye alelos nulos, por lo que no es necesario eliminar loci (Wagner *et al.*, 2006).

V.- RESULTADOS

Se analizaron un total de 52 individuos provenientes de las localidades de El Potrero, Mpo. Tenango de Doria, Hidalgo (11) y de Puerto de la Soledad, Mpo. Teotitlán, Oaxaca (41) (Anexo 1). Sólo fue posible obtener resultados con 10 de los 12 loci de microsatélite que se probaron, ya que al no ser específicos no se logró la correcta amplificación y lectura de dos de ellos.

5.1 Diversidad genética

5.1.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En los resultados de la prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1) se encontró que para la población de Hidalgo, los loci Pml03 y Pml08 se encontraron fuera del equilibrio debido a una deficiencia de heterocigos, con valores significativos ($p \leq 0.05$), lo que indica que las frecuencias observadas difirieron de las esperadas por lo que se rechazó la hipótesis nula. En la población de Oaxaca los loci Pml03, Pml06, Pml09, Pml11 y Pml12 se encontraron fuera del equilibrio por deficiencia de heterocigos, mientras que el locus Pml05 por un exceso. Los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) según el cálculo de Weir y Cockerham variaron desde -0.008 a 0.861. El método de Fisher, que toma en cuenta los 10 loci, indicó que tanto la población de Hidalgo como la de Oaxaca se encuentran fuera del equilibrio de H-W.

Tabla 1. Equilibrio de Hardy-Weinberg y coeficientes de endogamia de Weir y Cockerham (W&C) para cada locus por población de *Habromys simulatus*.

<i>Población</i>	<i>Locus</i>	<i>p</i>	<i>W&C</i>	<i>Población</i>	<i>Locus</i>	<i>p</i>	<i>W&C</i>
Hidalgo	Pml01	1	-0.096	Oaxaca	Pml01	0.1527	0.144
	Pml03	0.0002	0.861		Pml03	0.0000	0.638
	Pml04	0.0963	0.140		Pml04	0.5601	0.064
	Pml05	0.4987	0.111		Pml05	0.0000	-0.008
	Pml06	0.0484	0.655		Pml06	0.0000	0.404
	Pml08	0.0002	0.560		Pml08	0.4620	-0.052
	Pml09	0.0421	0.372		Pml09	0.0000	0.529
	Pml10	0.1672	0.241		Pml10	0.0108	0.230
	Pml11	1	-0.053		Pml11	0.0000	0.104
	Pml12	0.0711	0.191		Pml12	0.0020	0.171

Valores significativos en negritas ($p \leq 0.05$) con corrección de Bonferroni secuencial.

5.1.2 Desequilibrio de ligamiento

Con la prueba de desequilibrio de ligamiento se encontró que de las 45 comparaciones posibles entre los 10 loci, ninguna presentó desequilibrio para la población de Hidalgo ($p \leq 0.05$, con corrección de Bonferroni secuencial), mientras que para la población de Oaxaca el par Pml09-Pml11 y Pml04-Pml11 sí presentaron valores significativos ($p < 0.001$), por lo que se rechazó la hipótesis nula.

El análisis para cada par de loci, tomando en cuenta a las dos poblaciones, indicó solamente desequilibrio de ligamiento significativo para el par Pml09-Pml11.

5.1.3 Distribución y frecuencias alélicas

Se observaron un total de 110 alelos para los 10 loci analizados de *H. simulatus* (Anexo 9), y en general cada locus presentó un alto número de alelos que varió entre 6 y 19 (Figura 2). De igual forma todos los loci presentaron alelos exclusivos para cada población, el mayor número de ellos fue para el locus Pml11 y el menor para el locus Pml05 con 15 y 3 alelos, respectivamente. La frecuencia de los alelos exclusivos varió entre 0.012 y 0.409. El locus Pml05 fue el que presentó el mayor número de alelos compartidos (7) cuyas frecuencias variaron entre 0.024 y 0.402, además de que fue el único locus que no tuvo

alelos exclusivos en la población de Hidalgo. Por otro lado, el locus Pml11 fue el que presentó el menor número de alelos comunes (1), cuya frecuencia en Hidalgo fue de 0.863 y de 0.061 en Oaxaca.

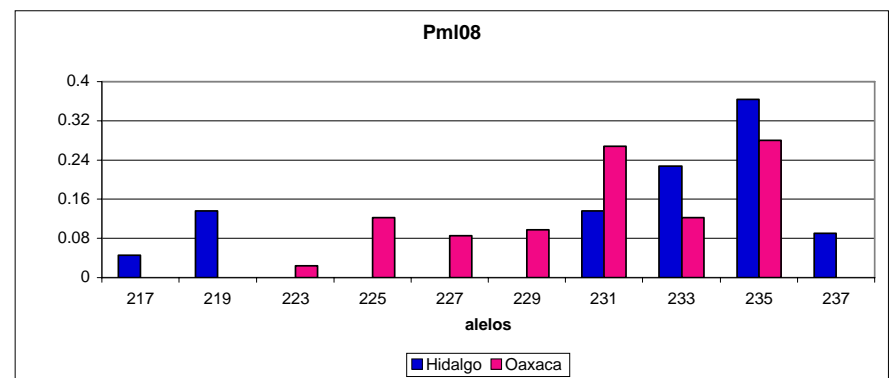
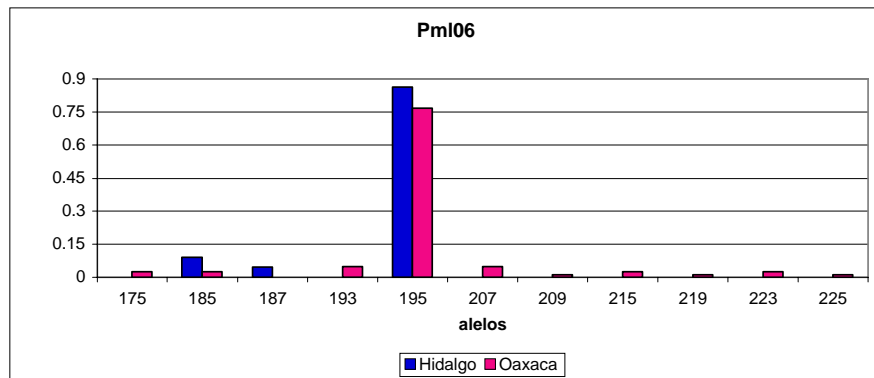
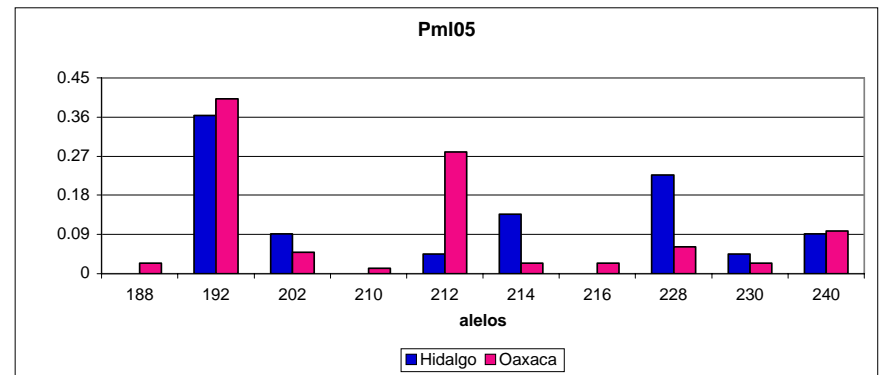
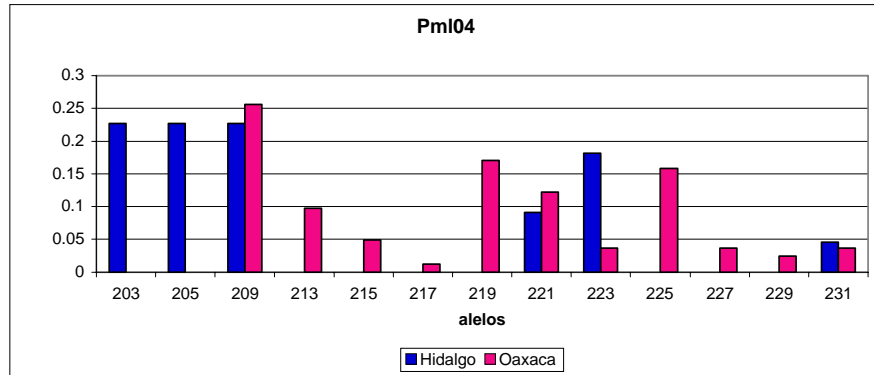
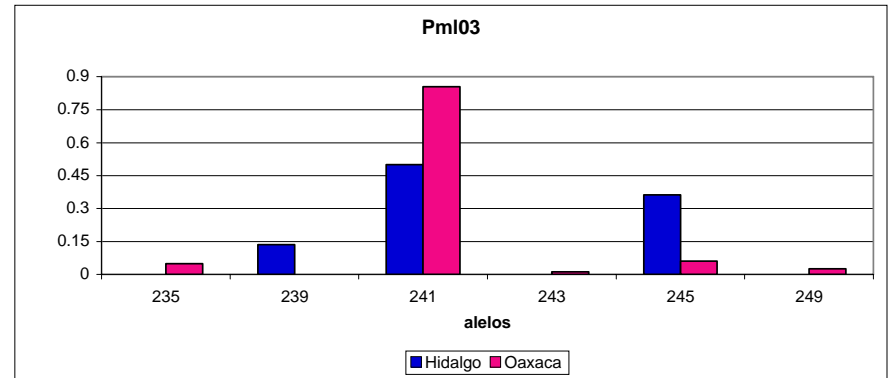
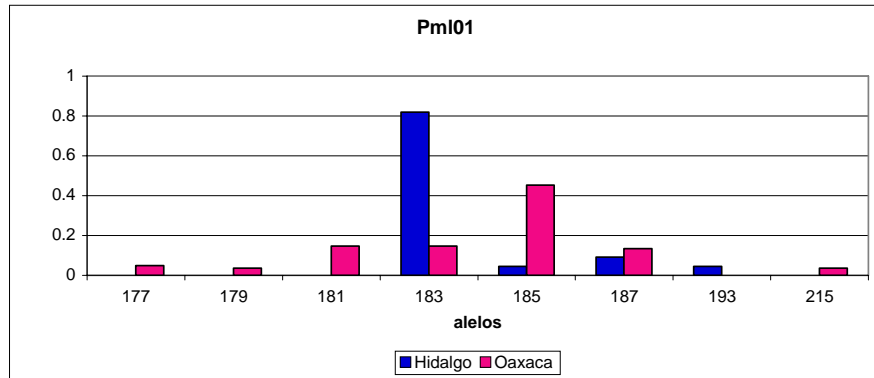
Se encontró que la población de Oaxaca presentó 58 alelos exclusivos, mientras que la de Hidalgo sólo incluyó 21, sin embargo ambas compartieron 31 alelos cuyas frecuencias variaron entre 0.012 y 0.863.

Los resultados de la diferenciación alélica (Tabla 2) mostraron que la distribución alélica entre las poblaciones es homogénea solamente para el locus Pml05 y Pml06, el resto presentó un distribución heterogénea. Tomando en cuenta los 10 loci se encontró que tanto la población de Hidalgo como la de Oaxaca presentaron una distribución alélica diferente.

Tabla 2. Diferenciación alélica y genotípica observada por locus para el par de poblaciones de *Habromys simulatus* y su error estándar.

LOCUS	ALÉLICA		GENOTÍPICA	
	HIDALGO-OAXACA			
	<i>p</i>	EE	<i>p</i>	EE
Pml01	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000
Pml03	0.00004	0.00004	0.0051	0.0006
Pml04	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000
Pml05	0.03475	0.00209	0.1972	0.0056
Pml06	0.55901	0.00914	0.4288	0.0061
Pml08	0.00047	0.00019	0.0008	0.0002
Pml09	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000
Pml10	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000
Pml11	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000
Pml12	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000

Valores significativos en negritas ($p \leq 0.05$) con corrección de Bonferroni secuencial.



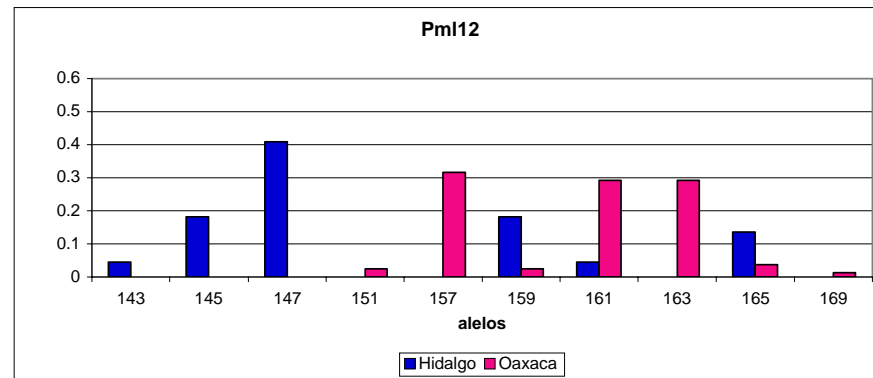
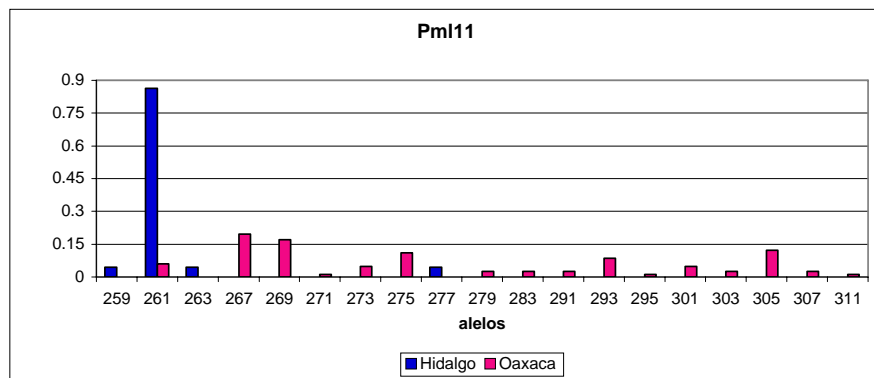
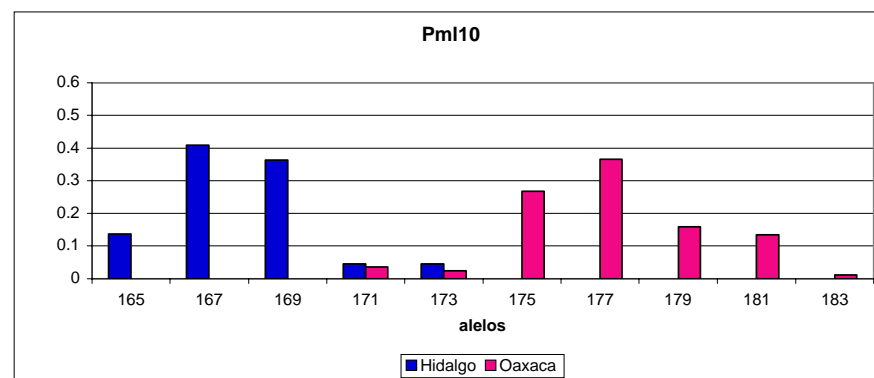
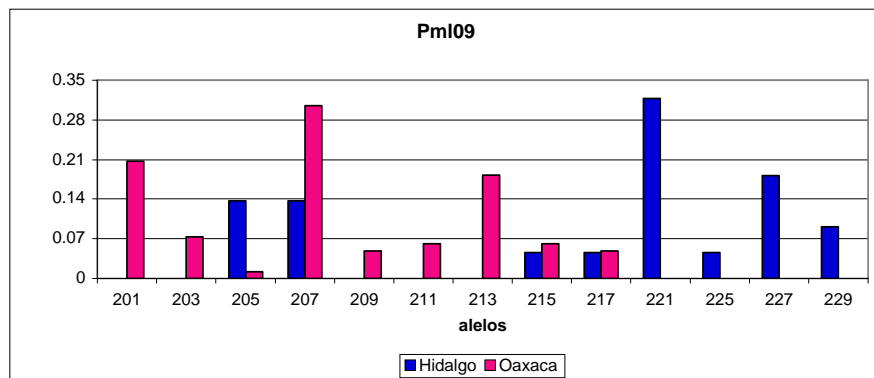


Figura 2. Frecuencias alélicas para cada uno de los loci en las poblaciones de *Habromys simulatus* en Hidalgo y Oaxaca.

5.1.4 Distribución y frecuencias genotípicas

Se encontraron un total de 201 genotipos para los 10 loci de *H. simulatus* (Anexo 10). El número de genotipos por locus varió entre 8 y 33 genotipos para los loci Pml03 y Pml04, respectivamente. El Locus Pml04 fue el que presentó el mayor número de genotipos heterocigotos (27), mientras que el locus Pml03 fue el que presentó el menor número de ellos (3). Por otro lado, el número de genotipos homocigotos varió entre 3 y 11 en el locus Pml06 y Pml09, respectivamente.

La diferenciación genotípica (Tabla 2) indicó que la distribución de los genotipos en cada locus sólo fue homogénea en los loci Pml05 y Pml06, mientras que en el resto de los loci fue diferente ($p \leq 0.05$, con corrección de Bonferroni). Al tomar en cuenta los 10 loci se encontró que la distribución de los genotipos entre las dos poblaciones es heterogénea.

5.1.5 Heterocigosidad

Los 10 loci analizados fueron 100% polimórficos para las dos poblaciones de *H. simulatus*. El mayor número promedio de alelos observados y efectivos fue para la población de Oaxaca (8.9 y 4.4, respectivamente), mientras que en la población de Hidalgo se encontraron 5.2 y 3.2 alelos, respectivamente. La media de estos valores para el total de las poblaciones fue de 11 alelos observados y 5 efectivos. En la población de Hidalgo el valor más pequeño de alelos observados y efectivos por locus se encontró en Pml06 (3 y 1.3, respectivamente), mientras que el mayor valor se encontró en el locus Pml09 (8 y 5.3, respectivamente). En el caso de la población de Oaxaca los mismos resultados fueron para el locus Pml03 con valores de 5 y 1.3 alelos y para el locus Pml11 con valores de 16 y 8.8 alelos.

Los valores promedio de la heterocigosidad observada fueron de 0.436 para Hidalgo, 0.578 para Oaxaca y 0.548 para el total (Tabla 3). Los intervalos de este mismo valor dentro de cada población y el total fueron de 0.090 a 0.727 en Hidalgo, de 0.097 a 0.853 en Oaxaca y de 0.096 a 0.788 en ambas poblaciones.

Los valores de heterocigosidad esperada promedio de Levene y de Nei, fueron de 0.627 y 0.599 en la población de Hidalgo, de 0.704 y 0.696 en Oaxaca y de 0.739 y 0.732 en el total de las poblaciones.

En términos de heterocigosidad, los loci que presentaron menor y mayor diversidad genética por población fueron los loci Pml06 y Pml04 en Hidalgo, mientras que en Oaxaca fueron el locus Pml03 y los loci Pml04, Pml08 y Pml11, respectivamente. Finalmente, para el total de las poblaciones los valores más pequeños de heterocigosidad se presentaron en los loci Pml03 y Pml06, mientras que los valores más altos se encontraron en los loci Pml04 y Pml11.

5.2 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones

El valor de la distancia genética de Nei entre ambas poblaciones fue de 0.621. Los índices de fijación de Wright por locus para el total de las poblaciones se muestran en la Tabla 4. Los valores positivos de F_{IS} indican que en todos los loci hay una deficiencia de heterocigos sobre todo en el locus Pml03. El intervalo de los valores de F_{ST} fue de -0.012 a 0.314, lo que indica que en la mayoría de los loci las frecuencias alélicas no son semejantes, sobre todo en el locus Pml01.

Tabla 4. Índices de fijación según Weir y Cockeharm (1984).

LOCUS	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Pml01	0.122	0.314	0.398
Pml03	0.707	0.217	0.770
Pml04	0.098	0.073	0.164
Pml05	0.023	0.033	0.056
Pml06	0.433	-0.012	0.426
Pml08	0.093	0.026	0.117
Pml09	0.489	0.105	0.543
Pml10	0.241	0.294	0.430
Pml11	0.107	0.310	0.384
Pml12	0.179	0.221	0.360
Total	0.214	0.169	0.347

Tabla 3. Valores de diversidad genética por locus para cada una de las poblaciones y para el total de *Habromys simulatus*.

POBLACIÓN		LOCI										MEDIA	N
		Pml01	Pml03	Pml04	Pml05	Pml06	Pml08	Pml09	Pml10	Pml11	Pml12		
HIDALGO	H_o	0.363	0.090	0.727	0.727	0.090	0.363	0.545	0.545	0.272	0.636	0.436	11
	H_e	0.333	0.627	0.839	0.813	0.255	0.805	0.852	0.710	0.259	0.779	0.627	
	H_{NEI}	0.318	0.599	0.801	0.776	0.243	0.768	0.814	0.677	0.247	0.743	0.599	
	n_o	4	3	6	7	3	6	8	5	4	6	5.2	
	n_e	1.4	2.4	5	4.4	1.3	4.3	5.3	3.1	1.3	3.9	3.2	
OAXACA	H_o	0.634	0.097	0.804	0.756	0.243	0.853	0.390	0.585	0.804	0.609	0.578	41
	H_e	0.739	0.267	0.859	0.750	0.407	0.812	0.822	0.758	0.897	0.734	0.704	
	H_{NEI}	0.730	0.264	0.848	0.741	0.402	0.802	0.812	0.749	0.886	0.725	0.696	
	n_o	7	5	11	10	10	7	9	7	16	7	8.9	
	n_e	3.7	1.3	6.6	3.8	1.6	5	5.3	3.9	8.8	3.6	4.4	
TOTAL	H_o	0.576	0.096	0.788	0.750	0.211	0.750	0.423	0.576	0.692	0.615	0.548	52
	H_e	0.758	0.378	0.879	0.773	0.376	0.819	0.867	0.836	0.886	0.818	0.739	
	H_{NEI}	0.751	0.375	0.871	0.765	0.372	0.811	0.859	0.826	0.878	0.810	0.732	
	n_o	8	6	13	10	11	10	13	10	19	10	11	
	n_e	4	1.6	7.7	4.2	1.5	5.2	7.1	5.8	8.2	5.2	5	

H_o : Heterocigosidad observada, H_e : Heterocigosidad esperada (Levene, 1949), H_{NEI} : Heterocigosidad esperada de Nei, n_o : número observado de alelos, n_e : número efectivo de alelos y N : tamaño de muestra.

Los valores pareados de F_{ST} y R_{ST} (valores significativos), así como el número de migrantes calculado a partir de cada estimador fueron de $F_{ST}=0.178$ con un $Nm=0.196$ y $R_{ST}=0.322$ con un $Nm=0.388$.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), con base en los valores de F_{ST} (Tabla 5), indicó que el mayor porcentaje de la diversidad se atribuye a la variación que existe dentro de las poblaciones (82%), mientras que solamente el 18% de la variación se debe a la que existe entre las poblaciones.

Los resultados del AMOVA, con base en los valores de R_{ST} (Tabla 6) indicaron una vez más, que el mayor porcentaje de la variación se atribuye a la que existe dentro de las poblaciones (68%) y no a la que se da entre poblaciones (32%), a pesar de que los valores variaron con respecto a los obtenidos con la F_{ST} . En ambos casos el índice de diferenciación fue significativo ($p \leq 0.05$).

Tabla 5. Análisis de varianza molecular con base en los valores de F_{ST} para las poblaciones de *Habromys simulatus*.

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
ENTRE poblaciones	1	29.392	0.747 Va	17.84
DENTRO de poblaciones	102	351.397	3.445 Vb	82.16
TOTAL	103	380.788	4.192	
Índice de fijación	F_{ST} : 0.178		p : 0.00000	

Tabla 6. Análisis de varianza molecular con base en los valores de R_{ST} para las poblaciones de *Habromys simulatus*.

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
ENTRE Poblaciones	1	12137.436	329.859 Va	32.22
DENTRO de poblaciones	102	70771.295	693.836 Vb	67.78
TOTAL	103	82908.731	1023.696	
Índice de fijación	$R_{ST}:0.322$		$p:0.00000$	

El análisis de asignación indicó que el 100% de los individuos fueron asignados a la población a la que pertenecían originalmente, es decir, no se encontró que los genotipos de los individuos presentes en la población de Hidalgo pudieran corresponder a las frecuencias alélicas de la población de Oaxaca y viceversa. El intervalo del porcentaje con el que cada individuo fue asignado a su población de origen varió entre 97 y 100%.

El análisis factorial de correspondencias (Figura 3) permitió visualizar la formación de dos grupos (Hidalgo y Oaxaca), lo que indica que los genotipos de los individuos presentes en la población de Hidalgo no tienen similitud con los que se encuentran en la población de Oaxaca y viceversa. En este caso el primer eje es el que aporta el 100% de la inercia total.

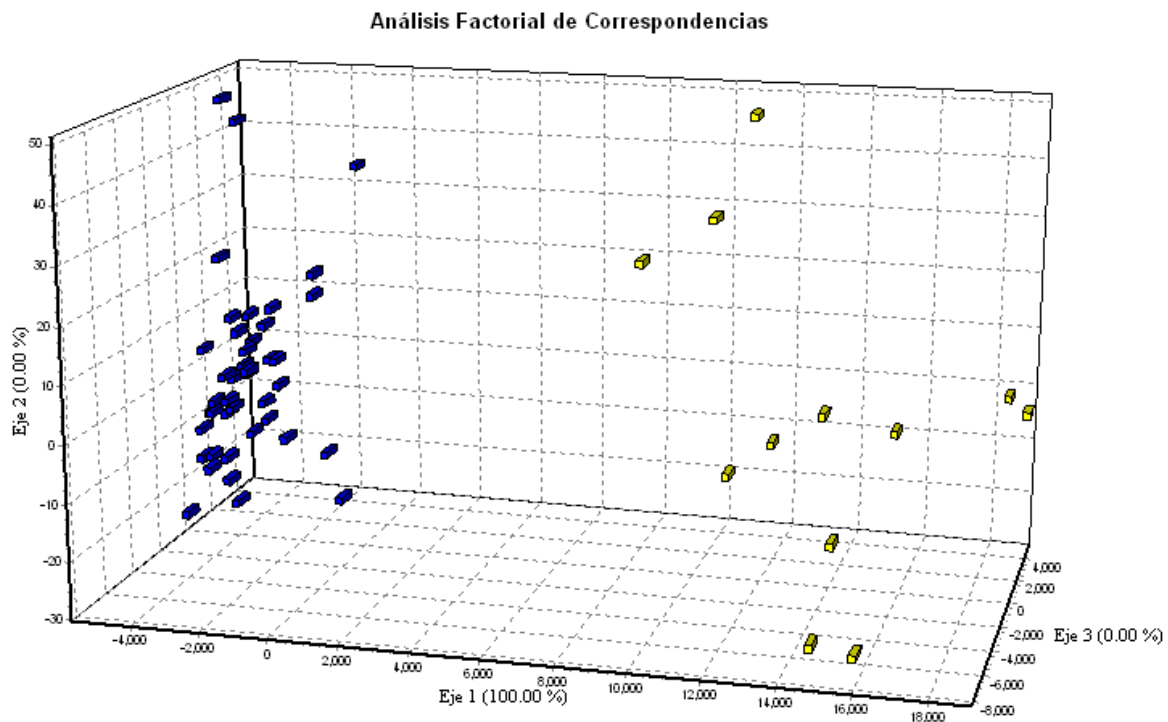


Figura 3. Proyección del análisis factorial de correspondencias para *Habromys simulatus*.

5.3 Cuello de botella, alelos nulos y relaciones de parentesco

Los resultados de Bottleneck mostraron que no existe evidencia de cuellos de botella asociados a un exceso de heterocigosidad, en ninguna de las dos poblaciones de *H. simulatus*. Bajo el modelo de TPM (90% de SMM, 10% de IAM y una varianza de 10%), se encontró que para la población de Hidalgo el locus Pml11 mostraba una deficiencia de heterocigosidad significativa (con corrección de Bonferroni secuencial), mientras que para la población de Oaxaca lo presentaban los loci Pml03 y Pml06. Al hacer el modelo de TPM más semejante al modelo de alelos infinitos (70% SMM, 30% IAM y varianza de 10%) se encontraron los mismos resultados, lo que confirma que no existe un cuello de botella reciente.

Los resultados de Micro-Checker indicaron la presencia de alelos nulos en cada una de las poblaciones al ser analizadas por separado y en el total (Tabla 7). De igual forma se obtuvieron las frecuencias alélicas corregidas con base en Brookfield 1 (Anexo 11).

Tabla 7. Presencia de alelos nulos por loci en cada una de las poblaciones de *Habromys simulatus* y en el total.

LOCUS	ALELOS NULOS		
	HIDALGO	OAXACA	TOTAL
Pml01	No	No	Si
Pml03	Si	Si	Si
Pml04	No	No	No
Pml05	No	No	No
Pml06	No	Si	Si
Pml08	Si	No	No
Pml09	Si	Si	Si
Pml10	No	Si	Si
Pml11	No	No	Si
Pml12	No	No	Si

La F_{ST} que se obtuvo en el programa Free-Na con corrección de ENA fue de 0.169 y la F_{ST} sin corrección fue de 0.173, la diferencia entre ellas no fue significativa. Por otro lado la distancia genética de Cavalli-Sforza, obtenida a partir de la base de datos corregida de alelos nulos, fue de 0.171, mientras que la que se obtuvo con la base de datos normal fue de 0.193, la diferencia entre ellas tampoco fue significativa.

Los resultados de ML-RELATE indicaron que no existe ninguna relación de parentesco entre los individuos de la población de Hidalgo con respecto a los individuos de la población de Oaxaca. El análisis para cada población indicó que tanto para la población de Hidalgo (55 combinaciones posibles entre individuos) como para la de Oaxaca (820 combinaciones posibles), la mayoría de los individuos no se encontraban relacionados, seguidos del parentesco de medios hermanos, hermanos y finalmente la de padres e hijos (Tabla 8).

Tabla 8. Relaciones de parentesco dentro de cada población en porcentaje.

PARENTESCO	HIDALGO	OAXACA
No relacionados	82%	83%
Medios hermanos	14%	13%
Hermanos	2%	3%
Padres e hijos	2%	1%

VI.-DISCUSIÓN

6.1 Diversidad genética

En este trabajo se presenta el primer estudio sobre la variabilidad genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica de México y restringida al bosque mesófilo de montaña, sobre la cual se desconoce mucho de su biología e historia de vida. A pesar de haber trabajado con loci de microsatélites diseñados para otra especie (*Peromyscus maniculatus*), fue posible amplificar 10 de los 12 primers utilizados (83%). Esto concuerda con el trabajo de Chirhart *et al.* (2005), quienes emplearon los mismos primers para evaluar cuatro especies de peromícinos (*P. keeni*, *P. polionotus*, *P. melanotis* y *P. leucopus*), y pudieron amplificar 11 de éstos. Cabe mencionar que el primer que no amplificó en estas especies funcionó para *H. simulatus*. Este alto nivel de conservación en los sitios del primer entre especies, incluso de diferentes géneros, se atribuye a un origen monofilético y una divergencia relativamente reciente entre estos grupos. León-Paniagua *et al.* (2007) encontraron que el tiempo de divergencia entre *Habromys* y *Peromyscus* es de 3.92 millones de años, lo que resulta relativamente reciente para roedores, además de ser un grupo monofilético. El mismo caso ha sido encontrado en algunas especies de pinnípedos (Arnason *et al.*, 1995; Coltman *et al.*, 1996; Gemmell *et al.*, 1997; Pastor *et al.*, 2004), en las que se han empleado primers no específicos en diferentes especies cuyos tiempos de divergencia son relativamente recientes.

Los resultados indicaron una desviación significativa de las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en las dos poblaciones de *H. simulatus*, debido en su mayoría a una deficiencia de heterócigos, lo que puede deberse a selección, alelos nulos, efecto Wahlund, deriva génica y endogamia (Hartl y Clark, 1997; Frankham *et al.*, 2005; Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007). Es importante mencionar que en la población de Oaxaca, uno de los locus en desequilibrio mostró un exceso de heterócigos, lo que se ha encontrado en poblaciones pequeñas de plantas o animales con sexos separados (Kirby, 1975; Brown, 1979; Allendorf y Luikart, 2007). Una causa común de la deficiencia de heterócigos es la presencia de alelos nulos (Frankham *et al.*, 2005; Allendorf y Luikart, 2007), que como se había mencionado anteriormente, son alelos que no amplifican durante el PCR debido a mutaciones en el DNA que impiden que el primer pueda adherirse a la región flanqueante del locus (Brookfield, 1996), por lo que algunos

heterocigos pueden parecer homocigos al no amplificar ciertos alelos. La presencia de estos alelos es muy frecuente cuando se trabaja con primers diseñados para otras especies, ya que los tiempos de divergencia entre especies aumentan las mutaciones en las regiones flanqueantes del microsatélite (Paetkau y Strobeck, 1995). Así, es posible que la presencia de alelos nulos resulte en la deficiencia de heterocigos del locus Pml03 (fuera de equilibrio en las dos poblaciones), para el cual se observó una de las frecuencias más altas de alelos nulos (0.202). Sin embargo, aunque se sabe que la presencia de alelos nulos puede provocar una sobrestimación de la diferenciación poblacional debido a la reducción en la estimación de la diversidad genética dentro de las poblaciones (Paetkau y Strobeck, 1995; Chapuis y Estoup, 2007), se eligió no eliminar este locus del resto de los análisis por dos razones: 1) no afectaron significativamente los valores de F_{ST} ni las distancias genéticas, lo que se ha encontrado en otros estudios (e.g. Brouat *et al.*, 2007) y 2) dado que el tamaño de muestra es pequeño, es muy importante tener el mayor número de loci posibles, ya que se ha comprobado que la certeza de los datos genéticos (e.g. heterocigosidad, distancia genética y F_{ST}) es más dependiente del número de loci analizados que del tamaño de muestra (Slatkin y Barton, 1989; Baverstock y Moritz, 1996; Selkoe y Toonen, 2006).

Otra posible explicación de la deficiencia de heterocigos es lo que se conoce como “efecto Wahlund”, que se presenta cuando la muestra que se considera como una sola población, en realidad se encuentra estructurada en varias subpoblaciones con frecuencias alélicas significativamente diferentes, ya sea por barreras ecológicas, físicas o temporales, lo que resulta en un exceso de homocigos con respecto a lo que se esperaría bajo equilibrio de H-W (Wahlund, 1928; Hedrick, 2005). Cabe mencionar que en el caso de *H. simulatus* dicha explicación es poco factible si se toma en cuenta el factor temporal, ya que las muestras de Oaxaca provienen del año 2000 y 2001, lo que correspondería aproximadamente a una generación, mientras que para el caso de Hidalgo corresponden a los años 2004 y 2006. En cuanto a las limitaciones dadas por factores espaciales, cabe mencionar que los individuos fueron capturados en árboles que se encontraban separados entre 5 y 10 metros aproximadamente a nivel de suelo, pero interconectados a nivel del dosel, por lo que no existen barreras espaciales. Es posible que algún factor ecológico o poblacional (e.g. estructura social, selección, etc.) limite el movimiento de individuos o la posibilidad de reproducirse aleatoriamente. Sin embargo, no existe información sobre la ecología y biología de esta especie, por lo que es difícil determinar la influencia que estos

factores podrían tener sobre la diversidad genética (Nevo, 1985; Lacey, 2001; Brouat *et al.*, 2007).

Finalmente, un decremento significativo en la heterocigosidad observada sugiere apareamiento no aleatorio y deriva génica (Loew, 2005), lo que causa fijación y pérdida de alelos al azar dentro de las poblaciones e incrementa la diferenciación entre ellas. En el caso de *H. simulatus*, los valores de F_{IS} y de F_{ST} indican que existe divergencia en las frecuencias alélicas y cierto grado de endogamia, lo que se ve reflejado en el valor de F_{IT} . El hecho de que se observara desequilibrio de ligamiento en dos pares de loci apoya lo anterior, ya que una de las causas por las que se presenta desequilibrio es cuando hay deriva génica y apareamiento no aleatorio (Hartl y Clark, 1997). Es importante mencionar que esto es común en especies amenazadas, cuyos tamaños poblacionales son pequeños (Frankham *et al.*, 2005). Aunado a lo anterior, la distribución genética y alélica en las poblaciones de *H. simulatus* es discontinua, lo que puede explicarse también en términos de deriva génica ya que en poblaciones pequeñas y fragmentadas las frecuencias alélicas se ven fuertemente influenciadas por eventos azarosos, lo que resulta en una alta diferenciación entre fragmentos a lo largo del tiempo (Paetkau *et al.*, 1995; Frankham *et al.*, 2005; Loew *et al.*, 2005).

A pesar de tener un tamaño de muestra pequeño y de las características propias de la especie (endémica, restringida, aislada, etc.), se encontró una diversidad genética mayor a la que se esperaba. Dada la alta variación reportada para los microsatélites en muchas especies con poca diversidad genética (Hughes y Queller, 1993), se ha sugerido que dichos marcadores son una herramienta útil para el monitoreo de la pérdida de variación en poblaciones aisladas o remanentes (Paetkau y Strobeck, 1994). Todos los loci estudiados fueron polimórficos (100%) y las medias de los valores de diversidad genética fueron altas ($H_o=0.548$, $H_e=0.739$, $H_{NEF}=0.732$ y $n_o=11$). Sin embargo, se han observado valores generalmente mayores de estos índices en especies con amplia distribución y sin fragmentación, tal es el caso de *P. maniculatus* ($H_o=0.50$, $H_e=0.91$ y $n_o=13.8$, Chirhart *et al.*, 2005.), *Mastomys natalensis* y *Mastomys erythroleucus* ($H_o=0.50-0.70$ y $0.77-0.82$, $H_e=0.63-0.72$ y $0.79-0.86$ $n_o=13$ y 23 , respectivamente, Brouat *et al.*, 2007) y *Peromyscus leucopus* ($H_e=0.810-0.940$, Mossman y Waser, 2001). También se han encontrado valores altos en algunas especies que se encuentran amenazadas o en peligro y cuya distribución es fragmentada, por ejemplo el marsupial *Burramys parvus*, restringido a las zonas alpinas de Australia, presenta altos niveles de diversidad genética ($H_o=0.577-0.716$, $H_e=0.596-$

0.687, Mitrovski *et al.*, 2007). La rata canguro *Dipodomys ingens*, cuyo hábitat fragmentado se ha reducido al 3% de su distribución histórica, también presenta altos niveles de diversidad genética ($H_e=0.69-0.72$, $n_o=14.5$, Loew *et al.*, 2005). La rata canguro cola de bandera (*Dipodomys spectabilis*) es una especie que ha pasado por varios cuellos de botella y a pesar de ello mantiene altos niveles de diversidad genética ($H_o=0.63-0.73$, $n_o=6.5-7.37$, Busch *et al.*, 2007). Una posible explicación de esta diversidad es el flujo genético que hay entre las poblaciones de dichas especies, por muy limitado que éste sea. Sin embargo, en *H. simulatus* no existe flujo genético entre las dos poblaciones ($Nm=0.196$). Otra posible explicación es que la fragmentación sea reciente y/o que el tamaño poblacional efectivo haya sido mayor en el pasado, esto es importante ya que la alta diversidad genética de *H. simulatus* puede estar perdiendo debido a reducciones recientes en el tamaño poblacional efectivo y la fragmentación del hábitat, lo que incrementaría los niveles de endogamia y deriva génica (Mitrovski *et al.*, 2007). A pesar de que no se pudo estimar el tamaño poblacional efectivo es muy probable que éste se haya reducido en los últimos años debido a la drástica fragmentación y pérdida del hábitat, así como al aislamiento poblacional que ya presentan las poblaciones de *H. simulatus*. Un ejemplo de lo anterior es el caso de la foca monje del Mediterráneo *Monachus monachus* (Pastor *et al.*, 2007), una especie críticamente amenazada con dos poblaciones remanentes que no mantienen flujo génico ($Nm=0.047$), cuyos valores de diversidad genética son bajos ($H_o=0.23-0.35$, $H_e=0.32-0.38$, $n_o=2.62-2.85$) y en la que el tamaño poblacional se ha reducido drásticamente desde el siglo XVII por la cacería y la destrucción del hábitat (Marchessaux, 1989; Pastor *et al.*, 2004).

6.2 Estructura genética

Se encontró también una marcada estructuración y una alta diferenciación genética entre las dos poblaciones de *H. simulatus* (valores de $F_{ST}=0.178$ y $R_{ST}=0.322$). Cabe mencionar que dadas las características de este trabajo (tamaño poblacional pequeño y número de loci analizados) es mejor emplear el valor de F_{ST} , por lo que la discusión se basa en este índice (Gaggiotti *et al.*, 1999). Al emplear la corrección de ENA (Chapuis y Estoup, 2007) para obtener el valor de F_{ST} corregido por alelos nulos ($F_{ST}=0.169$), la diferencia respecto al valor no corregido no fue significativa e incluso, si se toma este valor, la diferenciación genética sigue siendo alta ya que normalmente valores mayores a 0.15 indican una

diferenciación significativa entre fragmentos (Wright, 1978; Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Frankham *et al.*, 2005). Por otro lado, la distancia genética de Nei ($D_{NEF}=0.621$) y la distancia de Cavalli-Sforza con corrección y sin corrección de alelos nulos ($D_{C-S}=0.171$ y $D_{C-S}=0.193$, diferenciación no significativa), también fueron altas. Estos valores se pueden comparar con los encontrados en poblaciones totalmente aisladas y sin flujo génico como en *M. monachus* ($D_{NEF}=0.740$), e incluso las que se presentan entre especies (*P. maniculatus*, *P. keeni*, *P. sejugis*, *P. polionotus*, *P. melanotis* y *P. leucopus*) que oscilan entre $D_{NEF}=0.15-0.94$ y $D_{C-S}=0.05-0.17$ (Chirhart *et al.*, 2005).

El análisis de varianza molecular indicó que solamente un pequeño porcentaje de la variación (18%) se explica en términos de la diferencia entre poblaciones, y que la mayor parte se debe a la que se encuentra dentro de cada una (82%). Lo anterior no resulta contradictorio a la alta diferenciación que existe entre poblaciones, ya que se encontró que los genotipos de cada uno de los 52 individuos son totalmente diferentes, es decir, son como una huella digital. Por ello, es de esperarse que el porcentaje de variación sea muy alto dentro de cada población. Por otro lado, se debe enfatizar que además existe una alta diferenciación entre los genotipos dentro de cada población, lo que se observa claramente en el análisis de asignación, donde el 100% de los individuos fue asignado a la población de origen. De igual forma, el análisis factorial mostró que los individuos se agrupan en dos poblaciones. En este análisis también se puede apreciar que a pesar de que la muestra de Hidalgo es más pequeña que la de Oaxaca, existe una mayor diferenciación entre los individuos. Un dato más que apoya esta diferenciación es el que se obtuvo con el análisis de parentesco, donde no se detectó ningún tipo de parentesco entre los individuos de una población respecto a la otra. Sin embargo, las proporciones del grado de parentesco entre individuos dentro de cada población fueron similares, donde el porcentaje más alto (82% y 83% para Hidalgo y Oaxaca, respectivamente) fue de individuos no relacionados, seguido por los medios hermanos, los hermanos y finalmente padres e hijos.

La diferenciación genética presente en *H. simulatus* se puede explicar en términos de fragmentación y de aislamiento por distancia. La distancia que existe entre sus dos poblaciones es de 300 km en línea recta; asimismo en roedores es común que presenten un ámbito hogareño restringido, por ejemplo, *Zygodontomys brevicauda* se mueve aproximadamente 70 metros (Giuggioli *et al.*, 2006), *Peromyscus maniculatus*, cuya distribución es amplia, se desplaza aproximadamente 100 metros (Abramson *et al.*, 2006) y *Liomys pictus* no se mueve más allá de 10 m (Vázquez-Domínguez *et al.*, 1999). Así, es

de esperarse que *H. simulatus* se desplace distancias cortas, sobre todo por ser una especie arborícola estricta. Se espera que en especies con distribución fragmentada y/o con limitaciones de dispersión, ya sea por barreras físicas, geográficas o de vagilidad, la diferenciación genética se incremente conforme a la distancia geográfica (Slatkin, 1993; Rousset, 1997). Por otra lado, existe un aislamiento geográfico significativo del bosque mesófilo de la Sierra Mazateca, en donde se encuentra la población de Oaxaca, asociado a la aridez de la región de Tehuacán, Puebla, que separa a esta sierra del resto de la Sierra Madre Oriental, en donde se encuentra la población de Hidalgo (León-Paniagua, 2007).

Se sabe que la alteración del hábitat, en este caso el bosque mesófilo de montaña, restringe la distribución de las especies, ya que las poblaciones remanentes generalmente se encuentran fragmentadas (Frankham *et al.*, 2005; Loew *et al.*, 2005; Allendorf y Luikart, 2007). Por ejemplo, a partir de 1960 las poblaciones de la rata canguro *Dipodomys ingens* se han fragmentado y aislado considerablemente debido a la pérdida de su hábitat, el cual ha sido sustituido por zonas de agricultura, como consecuencia de esto su distribución histórica potencial se ha restringido a menos del 3%, además de incrementar la diferenciación genética entre sus poblaciones (Loew *et al.*, 2005). El impacto genético que se presenta en las poblaciones fragmentadas varía de insignificante a severo, dependiendo de la estructura poblacional resultante y de los patrones de migración entre fragmentos (Frankham *et al.*, 2005), lo que a su vez se relaciona con la distancia geográfica, la topografía y las condiciones ecológicas (Wade y McCauley, 1988). Sewall Wright (1969) encontró que un solo migrante por generación es suficiente para evitar una completa diferenciación o fijación de alelos en las poblaciones. Más tarde Lacy (1987) sugirió un mínimo de cinco migrantes, mientras que Mills y Allendorf (1996) y Vucetich y Waite (2000) sugirieron 10 migrantes por generación. En el caso de *H. simulatus*, su estructura consiste de poblaciones fragmentadas totalmente aisladas, sin flujo génico (islas), lo que representa una fragmentación muy severa, ya que dicho aislamiento tiene efectos significativamente deletéreos como endogamia, pérdida de diversidad genética, aumento de la deriva génica con riesgos de extinción asociados principalmente a la pérdida del potencial adaptativo de las poblaciones frente a cambios ambientales y a la disminución de la adecuación individual (Goodman, 1987; Shaffer, 1987; McCauley, 1991; Harrison y Hastings, 1996; Hedrick *et al.*, 1996; Woodworth, 1996; Sachaccheri *et al.*, 1998; Bijlsma *et al.*, 1999, 2000; Bryant *et al.*, 1999; Mitrovski *et al.*, 2007). Una medida

para contrarrestar estos efectos es el flujo génico, ya que por muy escaso que sea ayuda a mantener la variación genética mucho más que el apareamiento aleatorio (Lacy, 1987; Harrison y Hastings, 1996). El tipo de aislamiento y fragmentación observados en *H. simulatus* es semejante al de poblaciones en las islas oceánicas (Kim *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 2005).

6.3. Cuello de botella

En poblaciones fragmentadas es común observar cuellos de botella, detectados principalmente mediante el empleo de marcadores moleculares de microsatélites y aloenzimas (Waples, 1989; Cornuet y Luikart, 1996; Beaumont, 1999; Mitrovski *et al.*, 2007). En *H. simulatus* no se detectó un cuello de botella reciente, incluso al emplear diferentes modelos mutacionales sólo se encontró un exceso de heterocigosidad en tres de los diez loci analizados, sin embargo, estos resultados deben de interpretarse con cuidado. Por ejemplo, *Dipodomys spectabilis* es una especie que ha pasado por varios cuellos de botella, lo cual que ha sido documentado con estudios demográficos realizados por más de 25 años. Sin embargo, la especie no muestra una reducción drástica en los niveles de heterocigosidad observada y diversidad alélica, a pesar de que las muestras se tomaron durante o inmediatamente después de la disminución poblacional (Bush *et al.*, 2007). Esto se puede explicar en relación con ciertas propiedades biológicas de las poblaciones de roedores (*e.g.* alta tasa de mutación, inmigración no detectada o fluctuaciones demográficas aleatorias), las cuales pueden eliminar los rasgos genéticos propios de un cuello de botella (Busch *et al.*, 2007). Existen otros trabajos con roedores en los que no se detectó ninguna señal genética de cuello de botella a pesar de que se habían registrado disminuciones poblacionales (*e.g.* *Clethrionomys glareolus*, Redeker *et al.*, 2006; *Lemmus lemmus*, Ehrich y Jorde, 2005). Otros trabajos con mamíferos incluyen especies de liebres y ardillas (*e.g.* *Lepus americanus*, Burton *et al.*, 2002; *Sciurus vulgaris*, Trizio *et al.*, 2005).

Una posible explicación para *H. simulatus* sería que exista algún tipo de inmigración no detectada y que sea ésta la que elimina cualquier rastro genético de un cuello de botella, ya que se ha documentado que en poblaciones pequeñas es suficiente un número muy reducido de inmigrantes para eliminar cualquier evidencia de un cuello de botella en dos o tres generaciones (*e.g.* *Melospiza melodia*, Keller *et al.*, 2001). Esto implicaría que

existen más poblaciones de *H. simulatus*, las cuales hasta el momento no se han encontrado (León-Paniagua et al., 2007; Rogers et al., 2007). Carleton et al. (2002) consideran que *H. simulatus* se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de las laderas de la Sierra Madre Oriental (Hidalgo y Veracruz), en pequeños fragmentos de bosque mesófilo. Sin embargo, para la población de Oaxaca resulta más difícil pensar en inmigración, ya que se encuentra completamente aislada por las zonas áridas de Tehuacán, Puebla y por cañadas extremadamente abruptas (León-Paniagua et al., 2007). Además los resultados de diferenciación encontrados no apoyarían la inmigración. Otra explicación y más probable es que el cuello de botella aún no sea detectable, si por ejemplo la población ancestral tenía un tamaño grande y no estaba fragmentada, lo que es de suponerse cuando los bosques mesófilos tenían una distribución continua. En este estudio se puede ver que a pesar de que se detectó un alto número de alelos por locus, muchos de ellos tienen frecuencias muy bajas (<0.15), por lo que se observa la tendencia de que varios alelos se están fijando, lo que sugiere deterioro genético y demográfico, que seguramente es resultado del aislamiento y la disminución poblacional.

6.4 Conservación

La marcada estructuración y la alta diferenciación poblacional que se encontró en *H. simulatus* corresponde a lo que observaron León-Paniagua et al. (2007), quienes proponen que estas dos poblaciones sean consideradas como especies diferentes, con base en datos moleculares (DNA_{mt}, genes ND3 y ND4), morfológicos y biogeográficos. Los autores proponen un ancestro norteño para *Habromys*, el cual expandió su área de distribución durante los periodos húmedos-fríos del Pleistoceno hacia el sur, cuando los bosques mesófilos ocupaban diferentes estratos altitudinales (Rzendowski y McVaugh, 1966; Rzendowski, 1996). Establecen que *H. simulatus* es la especie basal del género, la cual divergió del resto de los *Habromys* hace aproximadamente 3.14 millones de años. Encuentran además que esta especie se divide en dos clados uno de la Sierra Madre Oriental y el otro de la Sierra Mazateca, cuyo tiempo de divergencia es reciente (0.73 millones de años). El análisis morfológico también sustenta esta diferenciación, ya que *H. simulatus* de Hidalgo es de menor tamaño que *H. simulatus* de Oaxaca, con respecto a caracteres cráneo-mandibulares. Dado que en la base de los cladogramas aparece una especie pequeña, León-Paniagua et al. (2007) y Rogers et al. (2007) suponen que la

dirección de cambio en el tamaño del cuerpo fue de menor a mayor, por lo que la población ancestral sería la que se encuentra en Tenango de Doria, Hidalgo. Asimismo, Vargas *et al.* (comunicación personal) han encontrado que el número fundamental en el cariotipo de *H. simulatus* de la Sierra Madre Oriental es de 80, mientras que el de la Sierra Mazateca es de 78, además de encontrar diferencias significativas en la conformación de los cariotipos.

Dadas las diferencias antes mencionadas, aunadas a las encontradas en este trabajo, es posible que las poblaciones de *H. simulatus* sean verdaderamente independientes una de la otra, además de que cada población es una fuente de diversidad genética única, ya que cada una presentó un alto porcentaje de alelos exclusivos. Así sean o no especies diferentes, si desaparece cualquiera de ellas reduciría significativamente la diversidad genética de la especie y del género. Es evidente que uno de los problemas más graves que enfrenta *H. simulatus* es la pérdida de su hábitat, el bosque mesófilo de montaña. Este tipo de bosque es uno de los ecosistemas más diversos del mundo y con mayor grado de endemismo, por lo que se le clasifica como centros de diversificación y endemismo (Halffer, 1992; Sánchez-Cordero *et al.*, 2005). En general, los roedores que habitan estos tipos de vegetación suelen ser utilizados como modelos que reflejan la evolución de las áreas, ya que existe un alto grado de endemismo entre ellos (León-Paniagua, 2007). Por lo tanto una de las estrategias de conservación más importante para esta especie es la recuperación o reforestación de dichos bosques.

Otra estrategia de conservación es establecer poblaciones *ex situ* en cautiverio, de cada una de las poblaciones de *H. simulatus* y mantener cierto grado de migración entre ellas para evitar una diferenciación posterior. Este programa de reproducción en cautiverio se ha probado con el murciélago *Pteropus rodricensis* (O'Brien *et al.*, 2007), una especie en peligro y endémica de la isla Rodríguez en el Océano Índico. En dicho estudio se probó que el efecto fundador que pudieran presentar los individuos en cautiverio no fue significativo, ya que las poblaciones en cautiverio permitieron mantener la diversidad genética de las poblaciones originales, además de que se generó flujo génico entre ellas para mitigar la divergencia entre la población en cautiverio y la silvestre. Sin embargo, tendría que evaluarse que dada la diferenciación tan significativa que existe entre las dos poblaciones estudiadas, la traslocación de individuos entre éstas no tuviera consecuencias negativas, particularmente depresión exogámica, en la que la adecuación de los individuos

disminuye y que ha sido reportada para diferentes especies (Turcek, 1951; Bernischke y Kumamoto, 1991; Frankham, 1995; Marshall y Spalton, 2000).

Finalmente, cabe mencionar que en México las especies del género *Habromys* se han considerado como especies que deberían de estar en alguna categoría de riesgo (Bailie, 1996; Carleton *et al.*, 2002; Sánchez-Cordero *et al.*, 2005; León-Paniagua *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna está considerada en la NOM-059-ECOL-2001 (Semarnat, 2002), por lo que se sugiere que los datos obtenidos en este trabajo, aunados a los que se han mencionado anteriormente, son suficientes para incluir a *H. simulatus* en la Norma Oficial Mexicana. Para lo anterior se recomienda seguir el Método de evaluación de riesgo de extinción de especies silvestres en México (MER), para determinar la categoría de riesgo de extinción a la que puede ser asignada esta especie.

VII.-CONCLUSIÓN

Habromys simulatus es una especie endémica que presenta niveles relativamente altos de diversidad genética y alélica. Sin embargo, dadas las características de la especie, como son una distribución geográfica restringida y altamente fragmentada, con únicamente dos poblaciones remanentes completamente aisladas, además de la pérdida acelerada del bosque mesófilo y la alta especificidad que tiene la especie por dicho hábitat que es uno de los tipos de vegetación más amenazados en la actualidad, es muy posible que dicha diversidad se pierda o disminuya drásticamente. Aunado a lo anterior, la alta diferenciación que se encontró entre las dos poblaciones aumenta el peligro de conservación de la especie, ya que cada población es una fuente de diversidad genética única, por lo que se sugiere que sean tomadas en cuenta como dos unidades evolutivas diferentes con propósitos de conservación (Moritz, 1995).

Es evidente así que *H. simulatus* se encuentre en grave peligro por lo que es urgente emprender estrategias de conservación para evitar su extinción, debida principalmente a la pérdida de su hábitat.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, G., L. Giuggioli, V. M. Kenkre, J.W. Dragoo, R.R. Parmenter, C.A. Parmenter y T.L. Yates. 2006. Diffusion and home range parameters for rodents: *Peromyscus maniculatus* in New Mexico. *Ecological Complexity*. 3(1):64-70.
- Allendorf, F. W. y R. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: *Conservation Biology: The Science of scarcity and diversity*. (Soulé, E.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Pp.57-76.
- Allendorf, F.W. y G. Luikart. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. USA.
- Arnason, U., K. Bodin, A. Gullberg, C. Ledje y S. Mouchaty. 1995. A molecular view of pinniped relationships with particular emphasis on the true seals. *Journal of Molecular Ecology*. 40:78-85.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and evolution*. Chapman y Hall. USA.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, MA, USA.
- Bailie, J. 1996. *Habromys simulatus*. En IUCN 2004. 2004 IUCN red list of threatened species.
- Balloux, F., y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11:155-165.
- Baverstock, P.R. y C. Moritz. 1996. Project desings. In: *Molecular Systematics* (eds. Hillis D.M., C. Moritz y B.K. Mable), pp. 7-27. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Beaumont, M.A. 1999. Detecting populations expansion and decline using microsatellites. *Genetics*. 153:2013-2029.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Arrufaste y F. Bonhomme. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benzécri, J.P. 1973. L'Analyse des données; T. 2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- Bernischke, K. y A.T. Kumamoto. 1991. Mammalian cytogenetics and conservation of species. *Journal of Heredity*. 82:187-191.
- Bijlsma, R., J. Bongaard, W. Van Putten. 1999. Environmental dependence of inbreeding depression and purging in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*. 12: 1125-1137.
- Bijlsma, R., J. Bongaard, A. Boerema. 2000. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*. 13: 502-514.
- Blouin, M.S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 18:503-511.
- Brookfield, J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*. 5:453-455.
- Brouat, C., A. Loiseau, M. Kane, K. Ba y J. M. Duplantier. 2007. Population genetic structure of two ecologically distinct multimammate rats: the comensal *Mastomys natalensis* and the wild *Mastomys erythroleucus* in southeastern Senegal. *Molecular Ecology*. 16:2985-2997.
- Brown, A.H.D. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology*. 15:1-42.
- Bryant, E.H., V.L. Backus, M.E. Clark y D.H. Reed. 1999. Experimental test of captive breeding for endangered species. *Conservation Biology*. 13:1487-1496.
- Bubb, P., I. May, L. Miles y J. Sayer. 2004. *Cloud Forest Agenda*. UNEP-WCMC. Cambridge, Reino Unido. Disponible en: <http://www.unep-wcmc.org>.
- Buckleton, J., C.M. Trigos y S.J. Walsh. 2005. *Foresic DNA evidence interpretation*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Burton, C., C. Krebs y E.B. Taylor. 2002. Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. *Molecular Ecology*. 11:1689-1701.
- Busch, J., P. M. Waser y A. DeWoody. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology*. 16:2450-2462.

- Callen, D.F., A.D. Thompson, Y. Shen, H. Phillips, R.I. Richards, J.C. Mulley y G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origino of the null alleles in (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*. 52:922-927.
- Carleton, M. D. 1980. Phylogenetic relationship in neotomine-peromyscine rodents (Muroidea) and a reappraisal of the dichotomy within New World Cricetinae. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology. University of Michigan*. 157: 1-146 pp.
- Carleton, M. D. 1989. Systematics and Evolution. 7-141 pp *in* *Advances in the study of Peromyscus* (Rodentia), G. L. Kirkland Jr., y J. N. Layne, editors. Texas tech University Press, Lubbock, vi + 367 pp.
- Carleton, M. D. , O. Sánchez y G. Urbano - Vidales. 2002. A new species of *Habromys* (Muroidea: Neotominae) from México, with generic review of species definitions and remarks on diversity patterns among Mesoamerican small mammals restricted to humid montane forest. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 115(3): 488-533.
- Cavalli-Sforza, L.L. y A.W.F. Edwards.1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. 19:233-257.
- Ceballos, G. y J. H. Brown. 1995. Global patterns of mammalian diversity, endemism, and endangerment. *Conservation Biology*. 9: 559-568.
- Ceballos, G., J. Arroyo-Cabrales, R. A. Medellín, L. Medrano-González y G. Oliva. 2005. Diversidad y Conservación de los mamíferos de México. pp. 21-66. En: Ceballos, G. y G. Oliva. (eds.) *Los mamíferos silvestres de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica. Hong Kong. Pp. 986.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. *Pasado, Presente y Futuro*. México: Conabio-UNAM-Sierra Madre.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24(3):621-631.
- Chirhart, S.E., R.L. Honeycutt y I.F. Greenbaum. 2000. Microsatellite markers for the deer mouse *Peromyscus maniculatus*. *Molecular Ecology Notes*. 9:1669-1671.
- Chirhart, S.E., R.L. Honeycutt y I.F. Greenbaum. 2005. Microsatellite variation and evolution in the *Peromyscus maniculatus* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 34:408-415.
- Coltman, D.W., W.D. Bowen y J.M. Wriyth. 1996. PCR primers for harbour seals (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci in other pinniped species. *Molecular Ecology*. 5:161-163.
- Cornuet, J.-M. Y G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144:2001-2014.
- Cornuet, J.M., S. Piry, G. Luickart, A. Estoup y M. Solignac. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. 153:1989-2000.
- Coyne, J.A. y H.A. Orr.1989. Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution*. 43:362-381.
- Crozier, R. H. 1997. Preserving the information Content of species. Genetic diversity, Phylogeny, and Conservation worth. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 28: 243-268.
- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J.C. Garza, A.M. Valdes, M. Slatkin y N.B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in humans populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 91:3166-3170.
- Duellman, W. 1966. The Central American herpetofauna: an ecological perspective. *Copeia*. 4: 700-719.
- Ehrich, D. Y P.E. Jorde. 2005. High genetic variability despite high amplitude population cycles in lemmings. *Journal of Mammalogy*. 86:380-385.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5:535-545.
- Escalante, P., A. Navarro-Sigüenza, A. G. Peterson. 1993. A geographic, ecological and historical analysis of land bird diversity in Mexico. In: Ramammoorthy, T., R. Bye, A. Lot, J. Fa (eds.) *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distributions*. Oxford University Press, New York. Pp.281-307.

- Escofier, B. y J. Pagès. 1990. *Analyses factorielles simples et multiples*. Paris: Dunod.
- Estoup, A. y B. Angers. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: *Advances in molecular ecology* (ed. Carvalho, G.) NATO Press. Amsterdam, the Netherlands, pp.55-86.
- Excoffier, L., P.M. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479-491.
- Frankham, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology*. 9:792-799.
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology*. 12: 665-675.
- Frankham, R., J. Ballou, D. Briscoe. 2005. *Introduction to conservation genetics*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gaggiotti, O.E., O. Lange, K. Rassmann y C. Gliddons. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*. 8:1513-1520.
- García-Moreno, J., A.G. Navarro Sigüenza, A.T. Peterson y L.A. Sánchez-González. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the Common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33:488-498.
- Garner, A., J. Rachlow y L. Waits. 2005. Genetic diversity and population divergence in fragmented habitats: Conservation of Idaho ground squirrels. *Conservation Genetics*. 6: 759-774.
- Gemmell, N.J., P.J. Allen, S.J. Goodman y J.Z. Reed. 1997. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. *Molecular Ecology*. 6:661-666.
- Giuggioli, L., G. Abramson, V. M. Kenkre, G. Suzán, E. Marcé y T. L. Yates. 2006. Difusión and home range parameters from rodent population measurements in Panama. *Bulletin of Mathematical Biology*. 67(5):1135-1149.
- Goodman, D. 1987. The demography of chance extinctions. In: *Viable populations for conservation*. (ed. Soulé, E.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Goudet, J., M. Raymond, T. De Meeüs y F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*. 144:1933-1940.
- Halffter, G. 1987. Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual Reviews of Entomology*. 32-95.
- Halffter, G. 1992. Diversidad biológica y cambio global. *Ciencia y Desarrollo*. 18 (104): 33-38.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Harris, D., D. S. Rogers y J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus fuvvus* (Rodentia:Muridae) based on citocromo *b* sequence data. *Molecular Ecology*. 9: 2129-2135.
- Harrison, S. y A. Hastings. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution*. 11(4):180-183.
- Hedrick, P. 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts.
- Hedrick, P., R. Lacy, F. Allenford, M. Soulé. 1996. Directions in conservation biology; comments on Caughly. *Conservation Biology*. 10: 1312-1320.
- Hooper, E.T., 1968. Classification. In King, J.A., (Ed.), *Biology of Peromyscus* (Rodentia). American Society of Mammalogist., Spec. Publ. 27-74.
- Hooper, E.T. y G.G. Musser. 1964. Notes on classification on the rodent genus *Peromyscus*. *Occasional Papers Museum of Zoology University of Michigan*. 635:1-13.
- Hughes, C.R. y D.C. Queller. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology*. 2:131-137.
- Kalinowski, S., A. P. Wagner y M. L. Taper. 2006. ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*. 6:576-579.
- Kashi, Y., D. King y M. Soller. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet*. 13: 74-78.
- Keller, L.F., K.J. Jeffery y P. Arcese. 2001. Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 268:1387-1394.

- Kim, I., J. Phillips, J. Monjeau, E. Birney, K. Noack, D. Pumo, R. Sikes y J. Dole. 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology*. 7: 667-678.
- Kimura, M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allele frequencies in a finite populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 75:2868-2872.
- Kirby, G.C. 1975. Heterozygote frequencies in small populations. *Theoretical Population Biology*. 8:31-48.
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham y F. H. Sheldon. 2000. Relations among Cave Swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparison of microsatellite and cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 4, No. 1, pp.107-121.
- Lacey, E. A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*. 86:628-637.
- Lacy, R. C. 1987. Loss of genetic diversity from manager populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*. 1:143-158.
- Landry, P.A., M.T. Koskinen y C.R. Primmer. 2002. Deriving evolutionary relationships among populations using microsatellites and $\Delta\mu^2$: all loci are equal, but some are more equal than others. *Genetics*. 161:1339-1347.
- Lehaman, T., W.A. Hawley y F.H. Collins. 1996. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*. 144:1155-1163.
- León-Paniagua, L. 2007. Sistemática y Biogeografía del género *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae). Tesis para obtener el grado académico de Doctora en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- León-Paniagua, L. y E. Romo. 2005. *Habromys simulatus*. En: Ceballos, G. y G. Oliva. (eds.) Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica. Hong Kong. Pp. 986.
- León-Paniagua, L., A. G. Navarro-Sigüenza, B. Hernández-Baños y J. C. Morales. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42: 653-664.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *The annals of Mathematical Statistics*. 20:91-94.
- Li, Y. C. A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles y E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11:2453-2465.
- Lima-Rosa, A., M. Hutz, L. Oliveira, J. Andrades-Miranda y M. Mattevi. 2000. Heterologous amplification of microsatellite loci from Mouse and rat in Orizomyine and Thamasomyine South American Rodents. *Biochemical Genetics*. 38 (3/4): 97-108.
- Loew, S.S., D.F. Williams, K. Ralls, K. Pilgrim y R.C. Fleischer. 2005. Population structure and the genetic variation in the endangered Giant Kangaroo Rat (*Dipodomys ingens*). *Conservation Genetics*. 6:495-510.
- Luikart, G., B. Sherwin, B.M. Steele y F. Allendorf. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottleneck via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*. 7:963-974.
- Luikart, G. y P. England. 1999. Statistical análisis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution*. 14:253-256.
- Luna, I., L. Almeida, L. Villers y L. Lorenzo. 1988. Reconocimiento florístico y consideraciones fitogeográficas del bosque mesófilo de montaña de teocelo, Veracruz. *Boletín de la Sociedad de Botánica. México*. 48: 35-63.
- Luna, I., S. Ocegueda y O. Alcántara. 1994. Florística y notas biogeográficas del bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie Botánica*. 65: 31-62.
- Luna, I., O. Alcántara, D. Espinoza y J. Morrone. 1999. Historical relationship of the Mexican cloud forests: a preliminary vicariance model applying Parsimony Analysis of Endemicity to vascular plant taxa. *Journal of Biogeography*. 26: 1299-1305.

- Luna, I., y O. Alcántara. 2004. Florística del Bosque mesófilo de montaña de Hidalgo. En: Luna, I., J. J. Morrone y D. Espinosa. Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. CONABIO-UNAM-Las Prensas de Ciencias. México. 169-183.
- Lynch, M., B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Marchessaux, D. 1989. distribution and status of the monk seal population *Monachus monachus* (Hermann, 1779). *Mammalia*. 53:621-642.
- Marshall, T.C. y J.A. Spalton. 2000. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced Arabian oryx. *Animal Conservation*. 3:241-248.
- McCauley, D.E. 1991. Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends in Ecology and Evolution*. 6:5-8.
- McGoldrick, D.J., D. Hedgecock, L. English, P. Baoprasertkul y R.D. Ward. 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*. 19:779-788.
- Michalakis, Y. y L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 142:1061-1064.
- Mills, L.S. y F.W. Allendorf. 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*. 10:1509-1518.
- Mitrovski, P., D. A. Heinze, L. Broome, A. Hoffman y R. Weeks. 2007. High levels of variation despite genetic fragmentation in populations of the endangered mountain pygmy-possum, *Burramys parvus*, in alpine Australia. *Molecular Ecology*. 16:75-87.
- Mossman, A. y P.M. Waser. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Canadian Journal of Zoology*. 79:285-295.
- Moritz, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 349:113-118.
- Musser, G.G. 1969. Notes on *Peromyscus* (Muridae) of Mexico and Central America. *American Museum Novitates*, 2357: 1-23.
- Navarro-Sigüenza, A., A. T. Peterson, E. López-Medrano y D. Benítez. 2001. Species limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* toucanets. *Wilson Bulletin*. 113: 363-372.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89:583-590.
- Nevo, E. 1985. Ecological and populational correlatos of allozyme polymorphisms in mammals. *Acta Zoológica Fennica*. 170:25-29.
- O'Brien, J., G.F. McCracken, L. Say y T. Hayden. 2007. Rodrigues fruit bats (*Pteropus rodricensis*, Megaptera: Pteropodidae) retain genetic diversity despite population declines and founder events. *Conservation Genetics*. 8:1073-1082.
- O'Connell, N. y Slatkin, M. 1993. High mutation rate loci in a subdivided population. *Theoretical Population Biology*. 44: 110-127.
- Ohta, T. y M. Kimura. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Resources*. 22:201-204.
- Ortega, F. y G. Castillo. 1996. El bosque mesófilo de montaña y su importancia forestal. *Ciencias*. 43: 32-39.
- Osgood, W. H. 1904. Thirty new mice of the genus *Peromyscus* from Mexico and Guatemala. *Proceedings of the biological Society of Washington*, 17: 55-77.
- Paetkau, D. y C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bears populations. *Molecular Ecology*. 3:489-495.
- Paetkau, D. y C. Strobeck. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*. 4:519-520.
- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling y C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in the Canadian polar bears. *Molecular Ecology*. 4:347-354.
- Paetkau, D., L.P. Waits, P.L. Clarkson, L. Craighead y C. Strobeck. 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*. 147:1943-1957.

- Pastor, T., J.C. Garza, P. Allen, W. Amos y A. Aguilar. 2004. Low genetic variability in the highly endangered mediterranean monk seal. *Journal of Heredity*. 95(4):291-300.
- Pastor, T., J.C. Garza, A. Aguilar, E. Tounta y E. Androukaki. 2007. Genetic diversity and the differentiation between the two remaining populations of the critically endangered Mediterranean monk seal. *Animal Conservation*. 10:461-469.
- Peterson, A. T., P. Escalante y A. Navarro. 1992. Genetic variation and differentiation in Mexican populations of Common bush-tanagers and Chestnut-capped Brush-Finches. *Condor*. 92:24-253.
- Piry, S., A. Alapetite, J-M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin y A. Estoup. 2004. GeneClass 2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 95:536-539.
- Primack, R., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo. 2001. *Fundamentos de Conservación Biológica: Perspectivas Latinoamericanas*. FCE. México. Pp.797.
- Puig, H. 1976. *Végétation de la Huasteca, Mexique*. Mission Archéologique et Ethnologique Française aun Mexique. México. 531 pp.
- Puig, H. 1989. Análisis filogeográfico del bosque mesófilo de Gómez Farías. *Biotam*. 1:34-53.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86:248-249.
- Redeker, S., L.W. Andersen y C. Pertoldi. 2006. Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Mammalian Biology*. 71:144-158.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*. 43(1):223-225.
- Robertson, P. B. y G. G. Musser. 1976. A new species of *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae), and a new specimen of *Peromyscus simulatus* from southern Mexico, with comments on their ecology. *Occasional Papers Museum of Natural History, University of Kansas*, 47: 1-8.
- Rogers, D.S., C.C.Funk, J.R. Miller y M.D. Engstrom. 2007. Molecular phylogenetic relationships among crested-tailed mice (Genus *Habromys*). *Journal of Mammalian Evolution*. 14:37-55.
- Romo-Vázquez, E., L. León-Paniagua y O. Sánchez. 2005. A new species of *Habromys* (Rodentia: Neotominae) from Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 118 (3): 605-618.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*. 145:1219-1228.
- Ruiz-Jiménez, C., J. Meave y J.L. Contreras. 2000. El bosque mesófilo de la región de Puerto de la Soledad (Oaxaca), México. *Análisis Estructural*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 65:23-37.
- Rzendowski, J. y McVaugh. 1966. La vegetación de Nueva Galicia. *Contributions of the University of Michigan Herbarium*. 9:1-123.
- Rzendowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Rzendowski, J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de México. *Acta Botánica Mexicana*. 35: 25-44.
- Sachaccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, V. Vikman, W. Fortelius, I. Haski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*. 392: 491-494.
- Sánchez-Cordero, V., P. Illoldi-Rangel, M. Linaje, S. Sarkar y A. T. Peterson. 2005. Deforestation and extant distributions of Mexican endemic mammals. *Biological Conservation*. 126: 465-473.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109: 365-371.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequín: a software for population genetics data analysis. Ver.2.000. Genetics and Biometry Lab, Dep. of Anthropology, University of Geneva.
- Selkoe, K. y R. Toonen. 2006. Microsatellite for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615-629.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna

- silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 6 de marzo de 2002, 1-56.
- Shaffer, M. 1987. Minimum viable populations: coping with uncertainty. In: Viable populations for conservation. (ed. Soulé, E.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Sharp, A. J. y Z. Iwatsuki. 1965. A preliminary statement concerning mosses common to Japan and Mexico. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 52(3): 452-456.
- Shaw, P.W., G.J. Pierce y P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology.* 8:407-417.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution.* 47:264-279.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision base on microsatellite allele frequencies. *Genetics.* 139:457-462.
- Slatkin, M. y N.H. Barton. 1989. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution.* 43:1349-1368.
- Sullivan, J., E. Arellano y D. Rogers. 2000. Comparative Phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climat fluctuations. *The American Naturalist* 155: 755:768.
- Tautz, D., M. Trick y G. Drover. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature.* 322: 652-656.
- Templeton A., B. Read. 1994. Inbreeding: One word, several meanings, much confusion. In: Conservation Genetics (eds. Loeschcke V., J. Tomiuk y S. K. Jain) pp. 91-105. Birkhäuser Verlag, Basal, Switzerland.
- Tóth, G., Z. Gáspári y J. Jurka. 2000. Microsatellite in different eukaryotic genomes: survey and análisis. *Genome research.* 10: 967-981.
- Trizio, I., B. Crestanello y Galbusera. 2005. Geographical distance and physical barriers shape the genetic structure of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in the Italian Alps. *Molecular Ecology.* 14:469-481.
- Turcek, F.J. 1951. Effects of introductions of two game populations in Czechoslovakia. *Journal of Wild Life Management.* 15:113-114.
- Van De Zande, L., R. C. Van Apeldoorn, A. F. Blijdenstein, D. De Jong, W. Van Delden y R. Bijlsma. 2000. Microsatellite análisis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology.* 9: 1651-1656.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes.* 4:535-538.
- Van Treuren, R. 1998. Estimating null allele frequencies at microsatellite locus in the oystercatcher (*Haematopus ostralegus*). *Molecular Ecology.* 7(10):1413-1417.
- Van Treuren, R., R. Bijlsma, W. Van Delden, N. Ouborg. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity.* 66: 181-189.
- Van Treuren, R., R. Bijlsma, N. Ouborg, W. Van Delden. 1993. The significance of genetic erosion in the process of extinction. III. Inbreeding depression and heterosis effects due to selfing and outcrossing in *Salvia pratensis* and *Scabiosa*. *Evolution,* 47: 1669-1680.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Piñero y G. Ceballos. 1999. Linking heterozygosity, demography and fitness of tropical population of *Liomys pictus*. *Journal of Mammalogy.* 80: 810-822.
- Velázquez, A., V. M. Toledo e I. Luna. 2000. Chapter 15. Mexican Temperate Vegetation. En: Barbour, M.G. y W. D. Billings. North American Terrestrial Vegetation. Cambridge University Press. U.S.A. 573-592.
- Villa, B. y F. Cervantes. 2003. Los mamíferos de México. Ed. Grupo Editorial Iberoamericana. Instituto de Biología, UNAM. México. Pp.140.
- Vucetich, J.A. y T.A. Waite. 2000. Is one migrant per generation sufficient for the genetic management of fluctuating populations. *Animal Conservation.* 3:261-266.

- Wade, M.J. y D.E. McCauley. 1988. Extinction and colonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*. 42:995-1005.
- Wagner, A. P., S. Creel, S. T. Kalinowski. 2006. Estimating relatedness and relationship using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*. 93:504-509.
- Wahlund, S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*.11:65-106.
- Waples, R.S. 1989. A generalized-approach for estimating effective population-size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*. 121:379-391.
- Wenink, K., A. J. Baker, H. Rosen y M. G. J. Tilanus. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holartic breeding (*Calidris alpina*). *Evolution*. 50(1): 318-330.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data análisis II. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Weir, B. S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.
- Wilson, D. E. y D. M. Reeder (eds). 1993. Mammals species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference. Segunda edición. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Woodworth, L.M. 1996. Population size in captive breeding programs. PhD thesis. Macquarie University, Sydney, Australia. NSW, Australia.
- Wright, S, 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16:97-159.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15:323-354.
- Wright, S. 1969. Evolution and the genetics of populations, vol.2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Wright, S. 1978. Evolution and genetics of population, variability within and among populations. Vol.4. The University of Chicago Press. Chicago. USA.
- Yeh, F. C., R.C. Yang, T. Boyle, Z-H. Ye y J. Mao. 1997. POPGENE, te user-friendly shareware for population genetic análisis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Ejemplares utilizados de *Habromys simulatus*.

<i>Muestra</i>	<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Fecha</i>	<i>Sexo</i>	<i>Número de Catálogo en el MZFC</i>
HBR001	Hidalgo	El Potrero, Mpo. Tenango de Doria	17-Mar-2004	M	023HBR/TDM017
HBR002			17-Mar-2004	M	024HBR/TDM018
HBR003			17-Mar-2004	H	025HBR/TDM019
HBR008			08-Mar-1995	M	39686 IBUNAM
HBR026			12-Abr-2006	H	TDM030
HBR027			12-Abr-2006	M	TDM031
HBR028			12-Abr-2006	H	TDM032
HBR029			14-Abr-2006	M	Liberado
HBR030			14-Abr-2006	M	Liberado
HBR031			17-Abr-2006	H	Liberado
HBR032			17-Abr-2006	H	Liberado
HBR004	Oaxaca	Puerto de la Soledad, Mpo. Teotitlán	16-Jul-2001	M	155HBR
HBR005			16-Jul-2001	H	159HBR
HBR006			16-Jul-2001	M	161HBR
HBR007			18-Jul-2001	M	183HBR
HBR009			18-Jul-2001	H	184HBR
HBR011			18-Jul-2001	M	185HBR
HBR013			17-Jul-2001	M	171HBR
HBR014			17-Jul-2001	H	179HBR
HBR015			17-Jul-2001	H	172HBR
HBR016			16-Jul-2001	M	158HBR
HBR018			18-Jul-2001	H	186HBR
HBR019			16-Jul-2001	M	161HBR
HBR020			15-Jul-2001	M	148HBR
HBR021			17-Jul-2001	M	173HBR
HBR022			12-Jul-2001	H	117HBR
HBR023			12-Jul-2001	M	118HBR
HBR024			14-Jul-2001	M	130HBR
HBR025			17-Jul-2001	H	169HBR
HBR033			09-Jun-1993	M	238PBM
HBR034			12-Jul-2001	H	124HBR
HBR035			21-May-2000	H	038HBR
HBR036			21-May-2000	M	039HBR
HBR037			11-Jul-2001	H	094HBR
HBR038			16-Jul-2001	M	157HBR
HBR039			19-May-2001	H	008HBR
HBR040			11-Jul-2001	H	079HBR
HBR041			14-Jul-2001	M	134HBR
HBR042			11-Jul-2001	M	084HBR
HBR043			22-May-2000	H	037HBR
HBR044			15-Jul-2001	M	149HBR
HBR045			12-Jul-2001	H	119HBR
HBR046			14-Jul-2001	H	142HBR
HBR047			16-Jul-2001	H	176HBR
HBR048			17-Jul-2001	H	163HBR
HBR049			16-Jul-2001	H	160HBR
HBR050			17-Jul-2001	H	170HBR
HBR051			12-Jul-2001	M	114HBR
HBR052			17-Jul-2001	M	175HBR
HBR053			11-Jul-2001	H	083HBR
HBR054			15-Jul-2001	H	145HBR
HBR055			17-Jul-2001	H	177HBR

Anexo 2. Extracción de DNA con BIORAD

Componentes del kit

Genomic DNA Lysis solution 35 ml, Protein precipitation solution 12 ml, DNA Hydration solution 10 ml, RNase A solution 250 µl y Proteinase K solution 175 µl.

Material extra

Isopropanol 100% y Etanol 70%.

Protocolo

1.-Lisis celular

- Cortar un pedazo pequeño (5-10 mg) de tejido, si está en etanol al 95%, secarlo un poco sobre papel absorbente y colocarlo en un tubo de 1.5 ml.
- Añadir 300 µl de Genomic DNA Lysis solution y agitar en el vortex.
- Añadir 1.5 µl de Proteinase K (20mg/ml) a la solución de lisis y agitar en el vortex. Incubar a 55 °C de tres a cinco horas o incubar una hora y dejar a temperatura ambiente durante la noche (esto puede variar dependiendo del tipo de tejido). Mientras están en incubación, agitar los tubos periódicamente. Si el pedazo de tejido continuara intacto después de la incubación, se puede añadir un poco más de Proteinasa K (1-1.5 ul). Dejar enfriar a temperatura ambiente.

2.-Tratamiento con RNase

- Añadir 1.5 ul de RNase A (4mg/ml) a la solución de lisis.
- Agitar la muestra en el vortex e incubar a 65°C por 45 minutos.

3.-Precipitación de proteínas

- Dejar que la muestra se enfríe a temperatura ambiente. Una vez frías añadir 100 µl de Protein precipitation solution.
- Mezclar las muestras en el vortex durante 20 segundos.
- Centrifugar a 14000 rpm durante cinco minutos. Las proteínas precipitadas deberán formar un pellet. Si éste no es visible, volver a mezclar en el vortex e incubar en hielo por 5 minutos y repetir la centrifugación.

4.-Precipitación de DNA

- Vaciar el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 ml; agregar 300 µl de isopropanol (2-propanol 100%), cuidando de que el pellet se quede en el tubo viejo.
- Mezclar la muestra invirtiéndola gentilmente 50 veces.
- Centrifugar a 14,000 rpm por tres minutos, es posible que el DNA sea visible en forma de un pellet blanco pequeño.
- Quitar el sobrenadante y secar brevemente el tubo en un papel absorbente. Añadir 300 µl de etanol 70%, invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet.
- Centrifugar a 14,000 por tres minutos. *Cuidadosamente quitar el etanol, lentamente para que no arrastre el pellet (DNA) y se pierda.*
- Poner el tubo inclinado boca abajo (sin que salga el pellet) sobre una papel absorbente y dejar secar durante 10-15 min, o hasta que el etanol se evapore. Se puede lavar el pellet cuantas veces se considere necesario.

5.-Hidratación del DNA

- Añadir 100 µl de DNA Hydration buffer o de H₂O ultrapura. (la cantidad que se añada depende de que tan concentrado se desea el DNA, se recomienda de 30 a 50 µl para piel de museo).

- Incubar la muestra a 65 °C por una hora para acelerar la hidratación y dejar reposar a -20°C durante toda la noche antes de cuantificarlo. Otra forma puede ser incubar a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Almacenar el DNA a 4 °C, o a -20 a -80 ° si es por largo tiempo.

Anexo 3. Extracción de DNA con QIAGEN

Componentes del Kit

DNeasy mini spin columns in 2 ml collection tubes (50), Buffer ATL 10 ml, Buffer AL 12 ml, Buffer AW1 19 ml (concentrado), Buffer AW2 13 ml (concentrado), Buffer AE 22 ml y Proteinasa K 1.25 ml.

Material extra

RNAsa A y Etanol 96-100% para diluir el Buffer AW1 y AW2.

Procedimiento

- Utilizar 25 mg de tejido, aproximadamente, y cortarlo en pequeños fragmentos. Colocarlo en un tubo de 1.5 ml y añadir 180 µl de buffer ATL. Si se trata de cola de ratón, usar aproximadamente 0.6 cm de largo de la cola. El tamaño utilizado depende del tipo de tejido que se emplea, por ejemplo si se trata de tejido fresco (hígado, corazón o riñón) el fragmento debe de ser más pequeño (10 mg).
- Agregar 20 µl de proteinasa K, mezclar en el vortex e incubar a 56°C hasta que el tejido esté completamente digerido. Vortexear ocasionalmente durante la incubación para homogeneizar el tejido. El proceso de lisis puede tardar de 1-3 horas, aunque depende del tipo de tejido. Se puede dejar toda la noche a temperatura ambiente o a 56°C, lo cual no afecta el proceso. Al final la solución puede ser viscosa pero no gelatinosa.
Opcional: Si se requiere DNA libre de RNA, se puede agregar 4 µl de RNasa A (100 mg/ml), mezclar en el vortex e incubar por dos minutos a temperatura ambiente. Este paso es recomendable cuando se trabaja con tejido fresco (hígado, corazón o riñón).
- Mezclar en el vortex 15 segundos, añadir 200 µl de buffer AL y 200 µl de etanol (96-200%), mezclar rápidamente en el vortex hasta que la solución sea homogénea. Es muy importante que este paso se haga rápidamente.
- Cambiar la muestra del tubo a la columna del kit (previamente colectada en un tubo colector de 2 ml). Centrifugar a 8,000 rpm durante un minuto y tirar la solución y el tubo colector.
- Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y agregar 500 µl de buffer AW1, centrifugar durante a un minuto a 8,000 rpm. Tirar la solución y el tubo colector.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml, añadir 500 µl de buffer AW2, centrifugar por tres minutos a 20,000 rpm. Tirar la solución y el tubo colector. Es recomendable volver a centrifugar durante un minuto a 14,000 rpm, para eliminar completamente el etanol ya que puede interferir con las siguientes reacciones.
- Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y agregar 200 µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a 8,000 rpm durante un minuto. En este paso es recomendable emplear solamente 50 ó 100 µl en cada tubo para aumentar la concentración de DNA, sobre todo si solamente se tiene un fragmento de muestra muy pequeño o si es piel de museo. Esto se puede repetir hasta completar los 200 µl propuestos.
- Almacenar el ADN a 4 °C o de -20 a -80 ° si es por largo tiempo.

Anexo 4. Cuantificación con el biofotómetro

Para la cuantificación se emplean cubetas de 60 μl de la marca eppendorf, en la que se colocan 10 μl de la muestra y 50 μl de agua destilada. Dicha cantidad puede variar, siempre y cuando se conserve la misma proporción y se especifique el tipo de dilución en el biofotómetro.

Lo primero que se hace es calibrar el biofotómetro con un blanco, el cual se prepara con la solución de hidratación de DNA del kit de extracción y agua destilada con la misma dilución (10:50). Si el DNA fue hidratado con una solución diferente, ésta es la que debe de emplearse en la calibración. Una vez que se introduce la cubeta con el blanco en el biofotómetro se oprime el botón de "blank" y el aparato queda calibrado.

Para cuantificar la muestra, se introduce la cubeta en el biofotómetro y se oprime el botón de "sample". El aparato da varios valores pero los principales son la cantidad de DNA en $\text{ng}/\mu\text{l}$ y el valor de corrección hecha de 260/280, que nos indica que tan limpio se encuentra el DNA con respecto a proteínas o RNA. El intervalo de valores ideales está entre 1.7 a 2.0, los valores por debajo de 1.7 indican contaminación por proteínas. Sin embargo, hasta con valores por debajo de 1.4 el DNA puede funcionar adecuadamente en el PCR; los valores por encima de 2.0 indican contaminación por RNA y el DNA puede ser tratado con Rnasa A (ver protocolos de extracción). El valor de 320 también debe de considerarse ya que es un valor de corrección con esa longitud de onda.

Anexo 5. Cuantificación e integridad con geles de agarosa

Materiales

Cámara de electroforesis, camas y peines de 15 pozos, micropipetas de 0.5 a 10 μl y puntas estériles.

Reactivos

TBE 0.5X, Agarosa al 1.5%, Loading buffer, Lambdas de DNA (5, 15 y 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$), escalera de 100 pb.

Preparación de reactivos

***TBE 10X**

Agregar 108 grs. de Tris Base en 40 ml de EDTA 0.5M (pH 8) y 55 grs. de ácido bórico.
Diluir a 0.5X el TBE con agua destilada (50 ml de TBE 10X + 950 ml de agua destilada).

***EDTA pH 8**

18.61 grs. De EDTA disueltos en 70 ml de agua destilada ajustando a pH 8 y aforar a 100 ml.

Preparación del gel de agarosa al 1.5%, corrimiento y tinción.

- Pesar 0.60 grs. de agarosa y añadir 40 ml de TBE 0.5X.
- Calentar por un minuto en el horno de microondas hasta que quede completamente transparente la solución.
- Dejar enfriar un poco y vertir en la cama del gel, donde previamente fue colocado el peine.
- En cada pozo se colocan 2 μl de DNA y 1 μl de loading.
- Para cuantificar se pueden usar 3 μl de cada lambda en cada pozo mediante la comparación de la intensidad y el grosor de las bandas o 1 μl de escalera de 100 pb más 2 μl de loading para estimar la degradación del DNA.

- El gel se corre a 120 volts por 45 minutos aproximadamente.
- Posteriormente se deja reposar en una solución con bromuro de etidio durante 20 minutos para que este se adhiera a las bandas y después se coloca en otra charola con agua destilada durante 1-2 minutos para eliminar el exceso de bromuro.

Anexo 6. Condiciones de PCR y programas en el termociclador utilizadas para *Habromys simulatus*, empleando Taq recombinante de Invitrogen y primers no fluorescentes.

	<i>Pml0</i> 1	<i>Pml0</i> 2	<i>Pml0</i> 3	<i>Pml0</i> 4	<i>Pml0</i> 5	<i>Pml</i> 06
<i>Concentración de MgCl₂</i>	4.9 mM	2.8 mM	3.4 mM	2.8 mM	3.1 mM	3.1 mM
H ₂ O	11.24 µl	11.88 µl	11.84 µl	12.08 µl	10.96 µl	11.9 µl
MgCl ₂						6 µl
Buffer	1.96 µl	1.12 µl	1.36 µl	1.12 µl	1.24 µl	1.24 µl
dNTP's (2 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer F (10 µM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer R (10 µM)	0.8 µl	0.9 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl
Taq (2.5 U)	0.8 µl	0.9 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	µl
DNA	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.8 µl
	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	0.2 µl
						1 µl
Volumen final	20 µl					

	<i>Pml0</i> 7	<i>Pml0</i> 8	<i>Pml0</i> 9	<i>Pml1</i> 0	<i>Pml1</i> 1	<i>Pml</i> 12
<i>Concentración de MgCl₂</i>	2.5 mM	3.4 mM	2.8 mM	3.4 mM	2.2 mM	3.4 mM
H ₂ O	12.2 µl	11.84 µl	12.08 µl	12.04 µl	12.32 µl	11.8 µl
MgCl ₂						4 µl
Buffer	1 µl	1.36 µl	1.12 µl	1.36 µl	0.88 µl	1.36 µl
dNTP's (2 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer F (10 µM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer R (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.7 µl	0.8 µl	0.8 µl
Taq (2.5 U)	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.7 µl	0.8 µl	µl
DNA	0.2 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.7 µl	0.8 µl	0.8 µl
	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	µl
		1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	0.2 µl
						1 µl

Volumen final	20 µl
---------------	-------

Nota: Entre paréntesis se muestra la concentración original de los reactivos.

Temperaturas de alineamiento durante el PCR

Primer	T° y número de ciclos
Pml01	50°C/35 ciclos
Pml02, Pml07, Pml09 y Pml10	52°C/35 ciclos
Pml03	51°C/10 ciclos 49°C/25 ciclos
Pml04	55°C/35 ciclos
Pml05 y Pml11	57°C/10 ciclos 55°C/10 ciclos 53°C/15 ciclos
Pml06 y Pml12	55°C/10 ciclos 52°C/10 ciclos 50°C/10 ciclos
Pml08	56°C/10 ciclos 54°C/10 ciclos 51°C/10 ciclos

Anexo 7. Geles de poliacrilamida

*Preparación de Acrilamida

En un vaso de precipitado (1000 ml) colocado en un agitador magnético agregar:

105 gr. de UREA 7M
 37.5 ml de acrilamida 40%
 25 ml de TBE 10 X y aforar a 250 ml con H₂O destilada.

Conservar a 4°C si se va a usar posteriormente.

*Preparación del gel

El gel debe de ser preparado minutos antes de ser utilizado, por cada mililitro de acrilamida se agregan 3 µl de persulfato al 10% (APS) y 0.83 µl de TEMED. Estas dos sustancias son las que hacen que se polimerice la acrilamida.

	Vidrio chico	Vidrio grande
Acrilamida al 6%	15 ml	60 µl
APS	45 µl	180 µl
TEMED	12.5 µl	50 µl

*Preparación de los vidrios

Lavar perfectamente ambos vidrios con agua y jabón, limpiar con papel absorbente y un poco de etanol al 70% para acelerar el secado de los vidrios. Una vez que estén perfectamente secos se añade una mezcla para pegado y otra para repeler el gel en los vidrios correspondientes.

Al vidrio donde se pega el gel se le agrega una solución que contiene:

	Vidrio chico	Vidrio grande
--	---------------------	----------------------

Etanol (96 ó 100%) frío	333µl	1332 µl
Bind Silene (Pharmacia biotech No. 17-1330-01)	1.25µl	6 µl
Ácido acético	83 µl	332 µl

La mezcla se distribuye en el vidrio homogéneamente con una toalla, formando carriles longitudinales sobre la superficie y se deja secar por 10 ó15 minutos.

El vidrio en el que no se pega el gel se trata con una capa homogénea de Rain-X anti fog (súper pinauto), el cual se aplica directamente sobre el vidrio formando carriles longitudinales y se deja secar de 10 a 15 minutos.

Una vez secos los vidrios, se empalman por los lados donde han sido tratados, colocando entre ellos los separadores y asegurándolos con clips a los lados. Una vez asegurados, se vacía la acrilamida y se coloca el peine invertido para marcar el espacio de los carriles donde correrán las muestras, fijándolo con clips. El gel puede ser preparado un día antes de ser utilizado, siempre y cuando sea cubierto con toallas humedecidas con TBE al 1% y colocado a 4°C.

**Carga y corrida del gel*

Ya que la acrilamida se encuentra polimerizada, el gel se puede montar en la cámara vertical de electroforesis, donde se quita el peine y se limpia la zona con en buffer de corrida (TBE 1%) para eliminar la acrilamida que podría obstruir el corrimiento de las muestras. Posteriormente se vuelve a colocar el peine con los picos hacia el frente para marcar los carriles. El gel se debe de precorrer 15 minutos al mismo voltaje con el cual correrá el gel con las muestras.

A los 20 µl del producto de PCR se le agregan de 6-7 µl de loading de dos frentes (Maniatis, 1989), dicha mezcla es desnaturalizada a 95°C por 10 ó 15 minutos, junto con la escalera preparada de 10 pb (2 µl escalera por cada 8 µl de loading). Posteriormente se colocan en hielo mientras se cargan. En cada pozo se colocan de 6-8 µl de muestra y 3µl de escalera, la cual servirá como referencia para la lectura de los microsátélites.

El gel pequeño se corre aproximadamente 3-4 horas a 500 volts, mientras que el gel grande se corre aproximadamente 4 horas a 1300 volts. Una vez que terminan de correr el gel, se separan los vidrios con una espátula y el vidrio donde se encuentra pegado el gel se coloca en ácido acético al 10%.

**Tinción con plata*

La tinción con plata consta de los siguientes pasos:

Paso	Solución	Sugerido	Intervalo
1.-Fijación	solución fijadora	30 minutos	de 30 minutos a 12 horas
2.-Lavado	H ₂ O destilada	5 minutos	sin opción
3.-Impregnación	solución de plata	25 minutos	25-35 minutos
4.-Enjuague	H ₂ O destilada	una pasada en la charola	10-15 segundos
5.-Revelado	solución reveladora	hasta ver bandas	sin opción
6.-Paro	solución de paro	15 minutos	5-20 minutos
7.-Enjuague	H ₂ O destilada	10 minutos	5-15 minutos

Nota: Todos los reactivos incluyendo el agua deben de estar fríos.

1.-Solución fijadora y de paro. Consiste en una mezcla de 1:10 de ácido acético glacial y agua destilada. Se requiere de 300 ml para el gel pequeño y 1 litro para el grande.

2.-Solución de plata. Se prepara en cada ocasión y por cada 100 ml de solución se requiere:
0.1 gr. de nitrato de plata (Silver nitrate, 100g, ACS Reagent, Cat. #09205 Research Org).

150 µl de Formaldehído al 37% (Formal sol al 37%, 1 litro, 2106-02 JT Baker).

La solución se mezcla sobre un agitador magnético. Debe de manejarse y desecharse con cuidado ya que es tóxica.

3.-Solución reveladora. Se prepara en cada ocasión y por cada 100 ml de agua se agregan:
3 grs. de carbonato de sodio (Sodium carbonate monohydrate, 1 kg. ACS Reagent, Cat. #09425).

150 µl de Formaldehído al 37%.

100 µl de Tiosulfato de Sodio (T de Na 0.1N sol volumétrica, 5637-02 JT Baker).

La solución se mezcla sobre el agitador magnético y es muy importante que el carbonato se agregue lentamente para evitar que se solidifique.

Anexo 8. Condiciones de PCR para *Habromys simulatus*, empleando HotStarTaq Mix (QIAGEN) y PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE) con primers fluorescentes

Con HotStarTaq Mix

	<i>Pml0</i> 1	<i>Pml0</i> 4	<i>Pml0</i> 5	<i>Pml0</i> 6	<i>Pml0</i> 8	<i>Pml1</i> 0	<i>Pml1</i> 1	<i>Pml1</i> 2
Concentración de MgCl ₂	4.5 mM	1.5 mM	2.75 mM	3.1 mM	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
HotStarTaq Mix	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer FF [2.5 µM]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer RF [2.5 µM]	0.8 µl	2 µl	1.5 µl	0.86 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	1.2 µl		0.5 µl	1 µl		1 µl	1 µl	1 µl
DNA				0.64 µl				
MgCl ₂ [25 mM]				0.5 µl				
Betaine								
Volumen total	10 µl							

El número de ciclos y la temperatura de alineamiento fueron los mismos que los que se usaron con los primers no fluorescentes. Sólo que al inicio del PCR se aumento un paso de 15 minutos a 95°C para activar HotStarTaq DNA polimerasa.

Con PCR Beads

	<i>Pml03</i>	<i>Pml09</i>
<i>Concentración de MgCl₂</i>	1.5 mM	1.5 mM
H ₂ O	16.9 µl	16.9 µl
Primer FF [10 µM]	0.8 µl	0.8 µl
Primer RF [10 µM]	0.8 µl	0.8 µl
Betaine	6 µl	6 µl
DNA	1 µl	0.5 µl
Volumen total	25 µl	

El número de ciclos y la temperatura de alineamiento fueron los mismos que se usaron con los primers no fluorescentes.

Anexo 9. Frecuencias alélicas observadas para los 10 loci de microsatélites en las dos poblaciones de *Habromys simulatus*.

LOCUS	ALELO (pb)	POBLACIONES		LOCUS	ALELO (pb)	POBLACIONES	
		HIDALGO	OAXACA			HIDALGO	OAXACA
Pml01	1 (177)	0	0.048	Pml03	1 (235)	0	0.048
	2 (179)	0	0.036		2 (239)	0.136	0
	3 (181)	0	0.146		3 (241)	0.5	0.853
	4 (183)	0.818	0.146		4 (243)	0	0.012
	5 (185)	0.045	0.451		5 (245)	0.363	0.061
	6 (187)	0.090	0.134		6 (249)	0	0.024
	7 (193)	0.045	0				
	8 (215)	0	0.036				

Pml04	1 (203)	0.227	0	Pml05	1 (188)	0	0.024
	2 (205)	0.227	0		2 (192)	0.363	0.402
	3 (209)	0.227	0.256		3 (202)	0.090	0.048
	4 (213)	0	0.097		4 (210)	0	0.012
	5 (215)	0	0.048		5 (212)	0.045	0.280
	6 (217)	0	0.122		6 (214)	0.136	0.024
	7 (219)	0	0.170		7 (216)	0	0.024
	8 (221)	0.090	0.122		8 (228)	0.227	0.061
	9 (223)	0.181	0.036		9 (230)	0.045	0.024
	10 (225)	0	0.158		10 (240)	0.090	0.097
	11 (227)	0	0.036				
	12 (229)	0	0.024				
	13 (231)	0.045	0.036				
Pml06	1 (175)	0	0.024	Pml08	1 (217)	0.045	0
	2 (185)	0.090	0.024		2 (219)	0.136	0
	3 (187)	0.045	0		3 (223)	0	0.024
	4 (193)	0	0.048		4 (225)	0	0.122
	5 (195)	0.863	0.768		5 (227)	0	0.085
	6 (207)	0	0.048		6 (229)	0	0.097
	7 (209)	0	0.012		7 (231)	0.136	0.268
	8 (215)	0	0.024		8 (233)	0.227	0.122
	9 (219)	0	0.012		9 (235)	0.363	0.280
	10 (223)	0	0.024		10 (237)	0.090	0
	11 (225)	0	0.012				
Pml09	1 (201)	0	0.207	Pml10	1 (165)	0.136	0
	2 (203)	0	0.073		2 (167)	0.409	0
	3 (205)	0.136	0.012		3 (169)	0.363	0
	4 (207)	0.136	0.304		4 (171)	0.045	0.036
	5 (209)	0	0.048		5 (173)	0.045	0.024
	6 (211)	0	0.061		6 (175)	0	0.268
	7 (213)	0	0.182		7 (177)	0	0.365
	8 (215)	0.045	0.061		8 (179)	0	0.158
	9 (217)	0.045	0.048		9 (181)	0	0.134
	10 (221)	0.318	0		10 (183)	0	0.012
	11 (225)	0.045	0				
	12 (227)	0.181	0				
	13 (229)	0.090	0				
Pml11	259	0.045	0	Pml12	143	0.045	0
	261	0.863	0.061		145	0.181	0
	263	0.045	0		147	0.409	0

267	0	0.195	151	0	0.024
269	0	0.170	157	0	0.317
271	0	0.012	159	0.181	0.024
273	0	0.048	161	0.045	0.292
275	0	0.109	163	0	0.292
277	0.045	0	165	0.136	0.036
279	0	0.024	169	0	0.012
283	0	0.024			
291	0	0.024			
293	0	0.085			
295	0	0.012			
301	0	0.048			
303	0	0.024			
305	0	0.122			
307	0	0.024			
311	0	0.012			

HIDALGO	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	1	2	0	0	11
OAXACA	1	3	1	1	19	1	1	0	1	1	4	1	0	0	1	1	0	1	1	3	41
TOTAL	1	4	1	2	20	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	3	1	3	52

Pml06

	GENOTIPO										
	185	175	185	187	195	207	195	195	193	219	
SITIO	185	193	195	195	195	207	209	215	223	225	TOTAL
HIDALGO	1	0	0	1	9	0	0	0	0	0	11
OAXACA	0	2	2	0	29	2	1	2	2	1	41
TOTAL	1	2	2	1	38	2	1	2	2	1	52

Pml08

	GENOTIPO																					
	217	219	225	227	225	227	229	223	225	227	231	225	231	233	225	227	229	231	233	235	237	
SITIO	219	219	227	227	229	229	229	231	231	231	231	233	233	233	235	235	235	235	235	235	237	TOTAL
HIDALGO	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2	0	3	1	11
OAXACA	0	0	1	1	1	1	1	2	3	1	2	1	4	1	4	2	4	8	3	1	0	41
TOTAL	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	2	1	5	3	4	2	4	10	3	4	1	52

Pml09

	GENOTIPO																						
	201	201	203	203	205	201	203	207	209	201	207	211	201	207	213	213	215	213	217	207	217	221	205
SITIO	201	203	203	205	205	207	207	207	209	211	211	211	213	213	213	215	215	217	217	221	221	221	227
HIDALGO	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
OAXACA	4	2	1	1	0	4	1	9	2	2	1	1	1	1	5	1	2	2	1	0	0	0	0
TOTAL	4	2	1	1	1	4	1	10	2	2	1	1	1	1	5	1	2	2	1	1	1	2	1
	GENOTIPO																						
	225	227	215	221																			
	227	227	229	229	TOTAL																		
HIDALGO	1	1	1	1	11																		
OAXACA	0	0	0	0	41																		
TOTAL	1	1	1	1	52																		

Pml10

	GENOTIPO																				TOTAL
	165	167	167	169	167	171	165	171	175	175	177	173	175	177	179	175	177	179	181	179	
SITIO	167	167	169	169	171	171	173	173	175	177	177	179	179	179	179	181	181	181	181	183	
HIDALGO	2	2	2	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OAXACA	0	0	0	0	0	1	0	1	5	7	8	1	1	4	2	4	3	2	1	1	
TOTAL	2	2	2	3	1	1	1	1	5	7	8	1	1	4	2	4	3	2	1	1	

Pml11

	GENOTIPO																						
	259	261	261	267	269	273	267	269	273	275	261	267	269	269	267	269	271	293	267	295	301	275	261
SITIO	261	261	263	269	269	273	275	275	275	275	277	279	279	291	293	293	293	293	301	301	301	303	305
HIDALGO	1	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OAXACA	0	2	0	5	1	1	2	2	2	1	0	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
TOTAL	1	10	1	5	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1

	GENOTIPO					TOTAL
	267	291	305	283	303	
HIDALGO	0	0	0	0	0	11
OAXACA	6	1	1	2	1	41
TOTAL	6	1	1	2	1	52

Pml12

	GENOTIPO																	TOTAL
	145	147	157	143	145	159	147	157	161	157	161	163	147	151	159	163	163	
SITIO	145	147	157	159	159	159	161	161	161	163	163	163	165	165	165	165	169	
HIDALGO	1	3	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	
OAXACA	0	0	7	0	0	1	0	7	4	5	9	4	0	2	0	1	1	
TOTAL	1	3	7	1	2	1	1	7	4	5	9	4	2	2	1	1	1	

ANEXO 11. Frecuencias alélicas corregidas de alelos nulos con base en Brookfield 1 para cada una de las poblaciones de *Habromys simulatus* y para el total.

Locus	Alelo	HIDALGO		OAXACA		TOTAL	
		Observadas	Brookfield 1	Observadas	Brookfield 1	Observadas	Brookfield 1
Pml01	177					0.038	0.346
	179					0.028	0.026
	181					0.115	0.103
	183					0.288	0.258
	185					0.365	0.329
	187					0.125	0.112
	193					0.009	0.008
	215					0.028	0.026
Pml03	235			0.048	0.042	0.038	0.030
	239	0.136	0.093			0.028	0.023
	241	0.5	0.341	0.853	0.741	0.778	0.620
	243			0.012	0.010	0.009	0.007
	245	0.363	0.248	0.061	0.052	0.125	0.099
	249			0.024	0.021	0.019	0.015
Pml06	175			0.024	0.021	0.019	0.017
	185			0.024	0.021	0.038	0.034
	187					0.009	0.008
	193			0.048	0.043	0.038	0.034
	195			0.768	0.681	0.788	0.696
	207			0.048	0.043	0.038	0.034
	209			0.012	0.010	0.009	0.008
	215			0.024	0.021	0.019	0.017
	219			0.012	0.010	0.009	0.008
	223			0.024	0.021	0.019	0.017
	225			0.012	0.010	0.009	0.008
Pml08	217	0.045	0.035				
	219	0.136	0.105				
	231	0.136	0.105				
	233	0.227	0.175				
	235	0.363	0.280				
	237	0.090	0.070				
Pml09	201			0.207	0.159	0.163	0.125
	203			0.073	0.056	0.057	0.044
	205	0.136	0.116	0.012	0.009	0.038	0.029
	207	0.136	0.116	0.304	0.233	0.269	0.206
	209			0.048	0.037	0.038	0.029
	211			0.061	0.046	0.048	0.036
	213			0.182	0.140	0.144	0.110
	215	0.045	0.038	0.061	0.046	0.057	0.044
	217	0.045	0.038	0.048	0.037	0.048	0.036
	221	0.318	0.271			0.067	0.051

	225	0.045	0.038		0.009	0.007
	227	0.181	0.154		0.038	0.029
	229	0.090	0.077		0.019	0.014
Pml10	165				0.028	0.024
	167				0.086	0.074
	169				0.076	0.066
	171		0.036	0.033	0.038	0.033
	173		0.024	0.022	0.028	0.024
	175		0.268	0.243	0.211	0.182
	177		0.365	0.331	0.288	0.248
	179		0.158	0.143	0.125	0.107
	181		0.134	0.121	0.105	0.091
	183		0.012	0.011	0.009	0.008
Pml11	259				0.009	0.008
	261				0.230	0.207
	263				0.009	0.008
	267				0.153	0.138
	269				0.134	0.121
	271				0.009	0.008
	273				0.038	0.034
	275				0.086	0.078
	277				0.009	0.008
	279				0.019	0.017
	283				0.019	0.017
	291				0.019	0.017
	293				0.067	0.060
	295				0.009	0.008
	301				0.038	0.034
	303				0.019	0.017
	305				0.096	0.086
	307				0.019	0.017
	311				0.009	0.008
Pml12	143				0.009	0.008
	145				0.038	0.034
	147				0.086	0.077
	151				0.019	0.017
	157				0.250	0.223
	159				0.057	0.051
	161				0.240	0.214
	163				0.230	0.205
	165				0.057	0.051
	169				0.009	0.008