



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

FILOGEOGRAFÍA DE LA RATA
ARROCERA (*Oryzomys couesi*)
UTILIZANDO MARCADORES NUCLEARES
(MICROSATÉLITES)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

TANIA GARRIDO GARDUÑO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ
DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 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 28 de Septiembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **GARRIDO GARDUÑO TANIA** con número de cuenta **98265327** con la tesis titulada **"FILOGEOGRAFÍA DE LA RATA ARROCERA (*Oryzomys couesi*) UTILIZANDO MARCADORES NUCLEARES (MICROSATÉLITES)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**:

Presidente: DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
Vocal: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Secretario: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Suplente: DR. VÍCTOR SÁNCHEZ-CORDERO DÁVILA
Suplente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de Noviembre de 2009.


Dr. Juan Néñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la oportunidad que me brindó para llevar a cabo la realización de mi proyecto de tesis de Maestría y por lo tanto la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante la elaboración del proyecto de Maestría, así como el apoyo de los proyectos PAPIIT (215205 y 219707) y CONACYT (No. 89451) el cual otorgaron financiamiento para la elaboración de este proyecto.

A mi comité tutorial, Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dr. Daniel Piñero Dalmau y Víctor Sánchez Cordero por el asesoramiento, apoyo y comprensión que me brindaron durante la realización de este trabajo.

A los revisores de tesis, Dra. Livia León Paniagua y Adolfo Navarro Siguenza, por realizar las correcciones correspondientes a mi trabajo en tan poco tiempo para que este mejorara.

Al Biól. Gerardo Rodríguez Tapia, por su apoyo en cuestiones técnicas y logísticas, así como sus comentarios que ayudaron a mejorar mi trabajo.

A Laura Márquez por su enseñanza y paciencia en el laboratorio, además por prestar las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular (Instituto de Biología, UNAM) para llevar a cabo las técnicas moleculares requeridas.

A Jazmín Arrivilla y al Laboratorio de Genética de Poblaciones de la Universidad Simón Bolívar en Venezuela por recibirme amablemente durante la estancia de investigación.

Agradecimientos especiales

A las personas más importantes de mi vida, mis padres (Ricardo y Bertha), que me han apoyado en todas las decisiones que he tomado y han sido cómplices de mis caprichos. Que me han enseñado a trabajar y me han mostrado que los esfuerzos valen la pena. A mi hermana Yuriko por apoyarme, aconsejarme, protegerme, preocuparse por mí y estar en mis travesuras.

En esta etapa apareció una persona especial, algo así como un ángel, la cual me enseñó que las cosas son mejores cuando se hacen con amor, me enseñó que tenemos una misión en esta vida, solo que se va descubriendo poco a poco, que cada una de las vivencias tienen un por qué y un para qué, solo hay que descubrirlas. Me enseñó que la paciencia es un arma importante al igual que la humildad. Me enseñó que lo más importante es quererse y que la felicidad solo depende de uno mismo. Que me ha ayudado a conocerme y a ser una persona con decisión. Gracias por ser la persona que me ha dado la mano cuando he querido tirar la toalla o cuando siento que los días son grises, tú haces que se vean nuevamente de colores por medio de tus palabras aunque a veces sean rudas. Gracias por ser mi amiga, mi consejera, mi paño de lágrimas y mi alma durante estos dos años. Gracias a tí, Mary Ventura. Recordemos, siempre hay que tener ideas positivas.

A la Dra. Ella Vázquez por dar me la oportunidad de trabajar en el mundo de la genética y brindarme la confianza para llevar a cabo este proyecto. Gracias por guiarme durante estos dos años y transmitirme tus conocimientos.

A mis amigos de generación Marianis, Alejandro, Héctor, Nallely y Julieta (aclaro, el orden de los factores no altera el producto, je!) que hemos estado ya juntos por 8 años, que no sean solo estos, si no más años, compartiendo logros, alegrías y tristezas, que la distancia y cambios en nuestra vida no rompan nuestras amistades.

A mi amiga Lizeth por ser un dulce y estar conmigo cuando la necesito, por escucharme. A Manuel García por su sinceridad. A mi coach José Juan Fernández que me ha enseñado a no olvidar mis raíces y siempre a dar hasta el último esfuerzo, no solo en la cancha sino en la vida. A Paola Triana "la gorda" por enseñarme que la vida por muy dura que sea, se puede seguir adelante si uno quiere, de verdad muchas gracias. A todas aquellas personas que han aparecido durante estos dos años (Ricardo, Carlos, Vale, Gris) con las cuales he compartido nuevas aventuras y han contribuido con palabras de aliento en mi vida así como a mi nuevo coach Choco el cual me enseñó que cuando uno está cansado hay que luchar por encima del cansancio y dejarlo a un lado..

A mis amigos Venezolanos, Marianela, por mostrarme que es lindo soñar y a Raúl por haber sido mi guía en aquellas tierras lejanas.

A mis compañeros de laboratorio Lorena, Marco, Tania, Arturo, Sunny, Suset, Rebeca, David y a los compañeros del otro laboratorio, Marlin, Gisel, Coni, Erick, Israel, Mariana y Meli por compartirme su conocimiento en las largas horas de trabajo y sonrisas a la hora de la comida.

**Dedicado aquellas mujeres que me han enseñado que a pesar de las
adversidades se puede seguir adelante.**

Mi mamá, mi hermana, Ma. Ventura, Lizzeth, Marianis, La Nay, Julieta, Paola,
Ella, Lorena y Marlin.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Filogeografía	1
1.2 Marcadores moleculares	2
1.3 Microsatélites	3
1.4 <i>Oryzomys couesi</i>	3
1.5 Geografía y geología de México y Centroamérica	4
1.6 Origen de los Sigmodontinos	5
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivo específico	6
3. HIPÓTESIS	7
4. MÉTODOS	
4.1 Obtención de muestras	7
4.2 Extracción de ADN	7
4.3 Microsatélites (Estandarización de PCR)	8
4.4 Microsatélites (Secuenciación y lectura de los microsatélites)	8
4.5 Determinación de las poblaciones	9
4.6 Análisis genéticos	9
4.6.1 Diversidad genética	9
4.6.2 Estructura genética	10
5. RESULTADOS	
5.1 Definición de las poblaciones	12
5.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg y ligaje de desequilibrio	13
5.3 Estructura genética	19
6. DISCUSIÓN	
6.1 Diversidad y estructura genética	23
6.2 Filogeografía, biogeografía y geología	24
6.3 <i>Oryzomys couesi</i>	27
6.4 Microsatélites y estudios filogeográficos	28
7. REFERENCIAS	29
8. ANEXOS	35

RESUMEN

La filogeografía es el estudio de la genealogía de genes a lo largo de la distribución geográfica de una especie, a través de la cual también se pueden evaluar diferentes procesos como flujo genético, cuellos de botella, expansión de la población, vicarización y dispersión. México y Centroamérica están conformadas por dos regiones biogeográficas (Neártica y Neotropical) que son producto de la fisiografía, la geología y la historia geológica. La rata arrocera (*Oryzomys couesi*) es un roedor de la familia Muridae que se distribuye desde el sur de Texas, EUA por el Golfo de México hasta la península de Yucatán; y por el Pacífico desde el sur de Sonora, México hasta Panamá, en Centro América. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de *O. couesi* en su área de distribución, así como los patrones filogeográficos para proponer los posibles eventos de diversificación de la especie, mediante el uso de nueve loci de microsatélites para 109 muestras de museo y 17 muestras frescas de 76 localidades. Se obtuvieron 13 poblaciones en las que se observaron 156 alelos, altos valores de heterocigocidad ($H_o = 0.515-0.889$; $H_{NEI} = 0.556-0.868$) y alta estructuración entre poblaciones ($F_{ST} = 0.311-0.011$). Asimismo, la distribución de la variación entre poblaciones y entre individuos dentro de las poblaciones fue baja (9.2% y 10.1% respectivamente) y mayor dentro de los individuos (80.7%). Se detectaron dos grupos filogeográficos principales, uno que incluye el sur de México, todo Centro América, parte del centro del país y el Golfo de México, y el otro con localidades pertenecientes a la zona del Pacífico. Por lo tanto, los microsatélites permitieron determinar la variación y estructura genética de las poblaciones de *O. couesi*, así como los grupos filogeográficos concordantes con diferentes barreras geográficas producto de procesos históricos, geológicos (e.g. Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Eje Transversal Neovolcánico, etc) y climáticos en México y Centroamérica.

Palabras clave: filogeografía, microsatélites, diversidad genética, estructura genética *Oryzomys couesi*, provincias biogeográficas.

ABSTRACT

Phylogeography is the study of genealogical lineages and long geographical distribution of a species, though it also can evaluate different processes as gene flow, inbreeding, expansion, vicariance and dispersion. Mexico and Central America are conformed for two biogeographical regions (Nearctic and Neotropical); product of physiographic, geology and geological history. Rice rat (*Oryzomys couesi*) is a mouse of family Muridae, it has a distribution since south of Texas, USA for Mexican Gulf until the Yucatan peninsula; and for Pacific since south of Sonora, México until Panama. The aim of this study was to determine levels of diversity and genetic structure into and between populations of *O. couesi* in its geographical distribution as well as patterns phylogeographic for to propose possible diversification events of the species based with nine nuclear microsatellite DNA loci from 109 samples of museum collection and 17 fresh samples, encompassing a total from 76 localities. Thirteen populations were obtained which was seen 156 alleles, high values of heterozygosity ($H_o = 0.515-0.889$; $H_{NEI} = 0.556-0.892$), high structure between populations along geographical distribution ($F_{ST} = 0.311-0.011$). Also, variability distribution between populations and between individuals into populations was low (9.2 % and 10.1% respectively) and major into individuals (80.7%). It was detected two principal groups phylogeographic, one that include south of Mexico, all Central America, part of center Mexico and Mexican Gulf, the other group belong localities of the Pacific zone. So, the microsatellites allowed to determine the genetic variation and structure of population of *O. couesi*, as well as groups phylogeographic agree with different geographic barriers product of historic, geologic (i. e. Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Transversal Neovolcanic Axis, etc.) and climatic processes in Mexico and Central America.

Keywords: phylogeography, microsatellites, genetic diversity, structure diversity, *Oryzomys couesi*, biogeographical province.

INTRODUCCIÓN

Filogeografía

El primer trabajo con un enfoque filogeográfico fue realizado por Avise *et al.*, (1979) en el que evaluaron la genética de poblaciones de *Geomys pinetis* (roedor del sureste de Estados Unidos) en un contexto geográfico. Utilizaron seis enzimas de restricción, técnica molecular novedosa para esa época; y encontraron 23 haplotipos, los cuales tenían una relación filogenética que sobrepondriase con asombrosa concordancia en el área de distribución, obtuvo dos grupos de haplotipos, uno en el este y el otro al oeste de la distribución del roedor. Fue en 1987 que Avise acuñó el término de filogeografía y resultó la fusión de esta como la unión de los procesos microevolutivos y macroevolutivos. Más tarde, Avise (2000) define a la filogeografía como “el estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes de genes entre especies cercanamente relacionadas”, la cual tienen dos ejes principales; el tiempo y el espacio”.

La filogeografía está considerada como una subdisciplina de la biogeografía o ecología molecular, esta última definida como la aplicación de marcadores genéticos moleculares que permiten responder preguntas en ecología y evolución (Vázquez-Domínguez, 2007). La filogeografía integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise, 2000). Permite evaluar procesos como flujo genético, cuellos de botella, hibridación, expansión demográfica y geográfica y su relación con la distribución de especies. Asimismo también ha permitido hacer propuestas de nuevas especies y grupos intraespecíficos (subespecies, poblaciones, ecotipos), o estimar tiempos de divergencia, eventos de vicarianza y dispersión en un contexto histórico (e.g. geológicos y evolutivos) (Arbogast y Kenagy, 2001; Newton, 2003; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009). Por ejemplo, en un estudio con *Peromyscus furvus*, roedor mexicano de la Sierra Madre Oriental. Harris *et al.*, (2000) obtuvieron un filograma (ADNmt y aloenzimas) con cinco filogrupos, uno de ellos representado por la población más sureña; dicho filogrupo fue diferente al resto de las poblaciones, con lo que los autores sugieren que podría ser una nueva especie. Un ejemplo de expansión demográfica asociado al clima (principalmente humedad) es el trabajo realizado con *Mastomys huberti* (roedor africano), donde se obtuvo una estructuración geográfica representada por cuatro filogrupos, con una separación de millones de años (0.95-0.17)

de separación entre ellos, relacionados al clima del Cuaternario (Mouline *et al.*, 2008). Estos autores pudieron descubrir que el proceso de colonización de *M. huberti* fue de oeste a este, donde las poblaciones del este son más recientes, así como eventos de expansión hacia el sur.

Para llevar a cabo este tipo de trabajos filogeográficos es importante el uso de un marcador molecular, y el que se ha utilizado más ha sido el ADN mitocondrial (ADNmt). Sin embargo, recientemente se ha empleado cada vez más el ADN nuclear; particular el caso de trabajos con microsatélites, en su mayoría también incluyen análisis con ADNmt, ya que el uso combinado permite tener una mejor interpretación de los patrones filogeográficos, dado las características particulares de cada marcador. Tal es el caso del trabajo con *Thymallus thymallus*, un pez de Europa en el que encontraron una estructuración geográfica (tres clados: noreste, noroeste-centro y sur); el análisis con ADNmt sugiere que las poblaciones del sur no contribuyen a la diversidad genética de las poblaciones del norte, mientras que el trabajo realizado con microsatélites sugiere que las poblaciones del sur son ancestrales (Koskinen *et al.*, 2002). Comúnmente permite distinguir resultados asociados con su tasa de diversificación por ejemplo, en *Phacochoerus africanus* (el jabalí verrugoso de África) se encontraron tres grupos geográficamente distintos (sur, oeste y este) con ambos marcadores, sin embargo, se observó baja diversidad genética pero alta diferenciación con ADNmt y alta diversidad genética pero baja diferenciación con los microsatélites (Muwanika *et al.*, 2003).

Otro ejemplo en el que se emplearon ambos marcadores es el trabajo con el género *Falco* (halcones que habitan en Europa, Asia y África) que no presentan un patrón filogeográfico de acuerdo con los haplotipos de ADNmt, ya que la variación genética está compartida entre especies y no hay una clara diferenciación entre grupos, por lo que se sugiere que *Falco cherrug* en particular es un grupo reciente. Ambos marcadores confirman que el origen del género fue en África y que existe un proceso de hibridación antiguo (finales de la última glaciación) (ADNmt) y reciente (microsatélites) (Nittinger, 2007).

Marcadores moleculares

El uso de marcadores moleculares ha permitido el estudio de la variabilidad genética de poblaciones y especies, así como sus relaciones filogenéticas y posible origen

(Vázquez-Domínguez *et al.*, 2001), además de reconstrucciones evolutivas (Avice, 2000) y determinación de especies y poblaciones prioritarias para conservación (Smith y Wayne, 1996). Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que cumplen con ciertas características dependiendo de cual se trate, tales como: amplia distribución en el genoma, con una estructura genética sencilla, ausencia de secuencias repetidas, polimórficos y codominantes. Dos son las moléculas de ADN que mayormente se han utilizado en estudios filogeográficos en mamíferos: el ADN mitocondrial (ADNmt) (Sullivan *et al.*, 2000) y el ADN nuclear (Muwanika *et al.*, 2003). El ADN nuclear es de herencia biparental, tiene tasas de mutación lentas en comparación con el ADNmt y es recombinante.

Microsatélites

Los microsatélites (Simple Sequence Repeats; SSR) se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma y son uno de los marcadores más utilizados hoy en día, principalmente en trabajos de genética poblacional. El uso de microsatélites involucra la detección de fragmentos específicos de ADN, con los que es posible obtener una medida (tamaño) de los alelos (en pares de bases, pb) (Arenguen-Méndez *et al.*, 2005). Los microsatélites son repeticiones de secuencias nucleotídicas cortas (1-6pb), codominantes, y generalmente en regiones no codificantes, heredados de forma mendeliana (Goldstein y Schötterer, 2000; Selkoe y Toonen, 2006), altamente variables (Montaño-Pérez *et al.*, 2006), dicha variabilidad está caracterizada por una alta heterocigocidad y por la presencia de alelos múltiples (Ellegren, 2004; Selkoe y Toonen, 2006). La gran variabilidad da como resultado un alto grado de polimorfismo en los microsatélites, debido principalmente a dos procesos: la replicación y la recombinación, donde ocurren los procesos de mutación (You-Chun *et al.*, 2002).

Se han propuesto diferentes modelos para explicar las mutaciones y por lo tanto el origen de nuevas variantes en microsatélites. El modelo más aceptado es el modelo de mutación paso a paso (Kimura y Ohta, 1978), que implica que cada mutación crea un alelo nuevo, ya sea mediante una adición o delección. La mayoría de los microsatélites tienen altas tasas de mutación (entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación y en promedio 5×10^{-4}) lo que genera altos niveles de diversidad genética esenciales para estudios en escalas de tiempo cortas (Schlötterer, 2000). Cada locus de microsatélite tiene una secuencia externa conservada y generalmente

neutral que flanquea a una serie de motivos de nucleótidos (Brohede y Ellegren, 1999), lo cual permite el desarrollo de primers específicos.

Oryzomys couesi

La familia Muridae es la más diversa dentro de los mamíferos y la de mayor distribución dentro de los roedores; representa a las ratas y ratones del Viejo y Nuevo mundo (Ceballos y Oliva, 2005). Dentro de esta familia se encuentra la subfamilia Sigmodontinae, que contiene 79 géneros (Musser y Carleton, 1993), uno de los cuales es *Oryzomys*.

Descripción. *Oryzomys couesi* es conocida como rata arrocera de pantano. Es una especie de tamaño mediano a grande, con las orejas pequeñas y cubiertas por pelo. El pelaje de la región dorsal es de color grisáceo-café y en la región ventral es blanco o amarillo claro. La cola es bicolor, oscura en la parte dorsal y clara en la ventral. La característica más importante para distinguirla de otras especies es la cola es bicolor, oscura en la parte dorsal y clara en la ventral (Ceballos y Miranda, 2000; Ceballos y Oliva, 2005)

Historia natural y ecología. Es de hábitos nocturnos, terrestre y con gran habilidad para nadar ya que tiene la capacidad de flotar o bucear, mantener los ojos abiertos bajo el agua y usar las ondulaciones de su cola como forma de propulsión. Estas características le permiten dispersarse a través de grandes extensiones de agua (Cook *et al.*, 2001), por lo que es muy abundante en humedales y manglares. Son omnívoros y se alimentan de semillas, frutas, hierbas, peces pequeños, crustáceos y otros invertebrados. Se reproducen todo el año y llegan a tener hasta ocho crías (Ceballos y Miranda, 2000; Ceballos y Oliva, 2005).

Hábitat. Habita en selva baja caducifolia, selva mediana subperennifolia, bosque de pino-encino, bosque templado caducifolio, bosque espinoso, selva tropical caducifolia y perennifolia, manglares y vegetación riparia. Es común en cultivos, pastizales, plantíos de árboles frutales y cocotales (Ceballos y Oliva, 2005). Se les encuentra desde el nivel del mar hasta 2300 msnm (Hall, 1981).

Distribución. Abarca desde el sur de Texas hasta el noroeste de Colombia (Hershkovitz, 1987; Musser y Carleton, 2005). En México se distribuye desde el sureste de Sonora hasta Chiapas, por el Océano Pacífico; desde Nuevo León, Tamaulipas hasta Yucatán por el Golfo de México; en la parte central se encuentra desde los

estados de Jalisco, Colima, Guanajuato, Tlaxcala y sur de San Luis Potosí, y en Isla Cozumel en el Mar Caribe. Con una población alopatrica en Sonora, Chiapas y en el sur de la península de Baja California (Ceballos y Oliva, 2005). Cabe mencionar que la población de Baja California posiblemente esté extinta de acuerdo con Álvarez-Castañeda, 1994).

Subespecies. Hay 13 subespecies reportadas para México (Ceballos y Oliva 2005), tres para Centroamérica y uno para Sudamérica (Hall, 1981).

Geografía y geología de México y Centroamérica

La distribución de *O. couesi* cubre dos regiones biogeográficas: la región Neártica y la Neotropical. La región Neártica básicamente comprende las áreas templado-frías de América del Norte, en Canadá, Estados Unidos y el norte de México (Cabrera y Willink, 1973). La región Neotropical incluye los trópicos americanos, desde el norte de México hasta el centro de la Argentina (Morrone, 2001).

Estas regiones están representadas por grandes relieves que caracterizan a México y Centroamérica: tales como la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, el Altiplano Mexicano, el Eje Neovolcánico, la Sierra Madre del Sur, la Sierra de Chiapas y la Plataforma Yucateca para México; y en América Central (Istmo de Tehuantepec-Panamá) se encuentra el Núcleo Centroamericano en el que se incluye (Chiapas, Guatemala, Honduras, el Salvador y norte de Nicaragua); al sur la Sierra de Salamanca (Costa Rica y Panamá) y entre ambos macizos está localizada la depresión Nicaragüense (Halfter, 2003).

Dichas formaciones pasaron por eventos geológicos importantes; la Sierra Madre Occidental (SMO) es el resultado de diferentes episodios magmáticos y tectónicos durante el Cretácico-Cenozoico, asociados a la subducción de la placa Farallón debajo de la placa de Norteamérica y a la apertura del Golfo de California (Ferrari, *et al.* 2005). La más relevante en México durante la era Cenozoica, fue la formación del sistema orogénico de la Sierra Madre Oriental que inició el proceso de plegamiento de esta Sierra en el Paleoceno y finalizado en el Eoceno. Al mismo tiempo esta formación se conjugó al sur con la Sierra del Istmo y la Sierra Madre de Chiapas.

A partir del Plioceno (4.5ma a 0.5ma), el margen continental de México se desplazaba hacia el noreste hasta separarse casi totalmente, lo que dio como resultado la actual península de Baja California y su mar interior (Golfo de California), a causa del rompimiento y el desplazamiento de la Placa de Norteamérica hacia el occidente. Por

otro lado, debido a la subducción de la placa de Cocos debajo de la Norteamericana, se formó el Eje Neovolcánico Transversal (ENT), teniendo una mayor actividad magmática durante el Plioceno-Pleistoceno (Aguayo y Trápaga, 1996).

Todo este gran complejo es uno de los más ricos topográficamente de América, además de que tiene una historia biogeográfica importante (León-Paniagua *et al.*, 2006) la cual incluye eventos tales como el gran intercambio biótico americano (GABI, por sus siglas en inglés), que implicó la conexión del norte de América con el sur de América mediante el Istmo de Panamá en Plioceno-Pleistoceno, hace 4ma (Iturralde-Vinent y MacPhee, 1999). Dicha conexión permitió una gran diversificación y especiación (Harris *et al.*, 2000; León-Paniagua *et al.*, 2006), por el intercambio entre el norte y el sur de la fauna, por ejemplo la de los mamíferos.

Origen de los Sigmodontinos

Esta gran polémica sobre cómo ingresaron los Muridos al sur de América es incierto (Pardiñas *et al.*, 2002), y no solo para este grupo en particular sino para otros mamíferos. Así el arribo y la diversificación de los sigmodontinos es controversial; Engel (1998) propone tres hipótesis que tratan de explicar esta problemática: la primera hipótesis denominada de “arribo temprano”, propone que los sigmodontinos arribaron a Sudamérica hace 20ma (Mioceno temprano) antes de la formación del istmo de Panamá (4ma, aproximadamente), posteriormente algunos grupos como *Oryzomys* y *Sigmodon* fueron capaces de regresar a Norteamérica después de la formación del istmo en el Plioceno tardío (Hershkovitz, 1972). Una segunda hipótesis es nombrada como “arribo tardío” y supone que los sigmodontinos son relativamente recientes en Sudamérica y viajaron al sur durante el gran intercambio biótico en el Plioceno-Pleistoceno, posterior a la formación del istmo. La tercera hipótesis dice que los sigmodontinos evolucionaron hace 7ma en Norteamérica, después invadieron Sudamérica (5-7ma) a través de Centroamérica, durante el descenso del nivel del mar, y que una vez establecidos tuvieron una radiación adaptativa dando pauta a la gran diversidad actual (Marshall, 1979).

De acuerdo con el trabajo realizado por Engel (1998) el origen de los Sigmodontinos (datado con ADNmt) se estima hace ~7.6 y 12.4ma, a partir del cual surge el linaje *Oryzomyinae* hace ~5.1 y 8.4ma, en Centroamérica. Por otro lado, el registro fósil en Norteamérica sugiere que tanto los sigmodontinos del norte y sur de América son descendientes de *Copemys*, presentes desde hace 9 y 16ma. Además otros

sigmodontinos que ahora son Neotropical se establecieron en el suroeste de Estados Unidos y México hace 4ma.

Considerando la información acerca de la compleja historia geológica del continente Americano y sobretodo de México y Centroamérica, aunada a la estructura y diversidad genética de *O. couesi*, evaluar la filogeografía de esta especie permitirá, relacionar y con ello apoyar algunas de las posibles explicaciones evolutivas e históricas propuestas que han determinado su distribución actual.

OBJETIVOS

- Determinar los niveles de diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de *Oryzomys couesi* en su área de distribución, mediante el uso de microsatélites.
- Evaluar los patrones filogeográficos de *Oryzomys couesi* en su área de distribución. Considerando la información genética y filogeográfica, proponer los posibles eventos de diversificación de la especie, en relación con la historia geológica de su distribución.

HIPÓTESIS

- ♦ Se esperaría que en las poblaciones de *Oryzomys couesi*, a lo largo de su distribución, presenten una alta estructuración genética.
- ♦ Bajo las perspectivas de las hipótesis del origen de los Sigmodontinos, se esperaría mayor flujo génico entre las poblaciones de Centroamérica y Sudamérica y menor entre Norteamérica y Sudamérica.
- ♦ *O. couesi* presentará patrones filogeográficos relacionados con la historia geológica de México, la península de Yucatán, Centroamérica y Sudamérica; que se relacionan con los procesos de vicarianza y dispersión que han determinado la distribución actual de la especie.

MATERIALES Y MÉTODO

Obtención de muestras

Las muestras que obtuve fueron donaciones de diferentes museos nacionales e internacionales y algunas muestras ya se tenían de salidas al campo en el año 2006. Con el objetivo de incrementar el tamaño de muestra y tratar de cubrir toda la distribución de la especie realizamos dos salidas al campo, la primera fue del 10-17 de mayo del 2008 a Yucatán y Campeche y del 22 al 30 de noviembre del 2008 a Nayarit y Sinaloa. Las muestras adquiridas fueron de diferentes tejidos como: piel (preservadas en seco), hígado y oreja (preservadas en alcohol al 70% y buffer).

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de tejido fresco y muestras de museo de hígado las realicé con el kit AquaPure Genomic DNA (Biorad) (Anexo 1); para algunas muestras hice re-precipitación de proteínas (Anexo 2) o re-extracción para que el ADN fuera más limpio. Para las muestras de piel y falange de museo utilicé el kit DNAsy Blood and Tissue (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del proveedor (Anexo 3).

La cuantificación del ADN la lleve a cabo en geles de agarosa al 1%, éstos los revelé en bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y los visualice con UV. También utilicé el espectrofotómetro Eppendorf (BioPhotometer 6131) para obtener la concentración de ADN en (ng/μl).

Microsatélites (Estandarización de PCR)

Trabajé con nueve loci de microsatélites de *O. couesi* (Wang *et al.*, 2000), con primers marcados con fluorescencia (5'HEX, FAM, NED) (Tabla 1). La estandarización de los productos de PCR consistió en modificar las concentraciones de MgCl₂ y de primer. El volumen final de las reacciones de PCR fue 5 μl (Anexo 4). Las amplificaciones de las muestras las realicé en un termociclador MJ Research modelo PTC 100. Cada uno de los programas utilizados para la amplificación, se detallan en el Anexo 5.

Dado que algunas muestras presentaron problemas para la lectura de alelos, se tuvo que mejorar el producto de PCR adicionando BSA (Bovien Serum Albumin; 2μg/μl), que es una proteína que mejora el rendimiento y la especificidad de la PCR.

Tabla 1. Loci amplificados por nueve primers de microsatélites para *Oryzomys couesi*

Locus	Número de repeticiones	Temperatura de alineación	Tamaño de los alelos	Fluorescencia
Ory 3	16	55	96-150	FAM
Ory 10	14	53	117-189	HEX
Ory 16	11	50	84-135	HEX
Ory 21	16	55	147-201	HEX
Ory 26	13	50	87-156	FAM
Ory 28	16	55	93-144	FAM
Ory 40	13	55	102-165	NED
Ory 60	11	53	111-168	FAM
Ory 64	11	50	63-117	FAM

Microsatélites (Secuenciación y lectura de los microsatélites)

La lectura de los genotipos de microsatélites los realicé de dos formas indistintamente: 1) en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM con el secuenciador ABI Prism-Hitachi 3100 Analyzer (Applied Biosystems), en el que utilicé una mezcla de 1µl de producto de PCR diluido previamente a diferentes concentraciones más 9.5µl de formamida y 0.5µl de GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems) y 2) con el servicio de secuenciación de la Universidad de Illinois analizados en un secuenciador ABI Prism 3730xl Analyzer (Applied Biosystems) con la escalera ROX 500. Para la visualización del tamaño de cada uno de los alelos utilicé el programa GeneMapper 3.8, calibrando con la escalera (ROX-500).

Determinación de las poblaciones

Realicé la agrupación de las muestras obtenidas con el programa Genland 3.14 (Guillot *et al.* 2005a, 2005b, Guillot 2009), que permite detectar el número de poblaciones (K) presentes en una determinada área, así como la ubicación de discontinuidades genéticas entre las mismas. Este programa está basado en una combinación de diferentes algoritmos tipo MCMC (Monte Carlo-Cadena de Markov), lo que permite la asignación de individuos a partir de sus coordenadas geográficas y de los genotipos multilocus de cada individuo. Para determinar el valor de K realicé 5 corridas, cada una de 100,000 iteraciones, *thinking* = 100 y un *burnin* = 100, utilizando una $K=20$ y $K=15$. Una vez fijado el valor de K ($K=15$) se asignaron los individuos a

cada una de las poblaciones por medio de 10 corridas independientes, un *thinking* = 100 y *burnin* = 1,000. Finalmente para la obtención de los gráficos y mapas, se empleó la opción de 100 pixeles para el eje x y 100 pixeles para el eje y.

Análisis genéticos

Diversidad genética

Debido a que en los microsatélites puede haber mutaciones en las regiones flanqueantes, los primers pueden no unirse y en consecuencia no amplifican, generando que los heterocigotos sean considerados como homocigotos. Por ello, realicé la evaluación de presencia de alelos nulos por población (*sensu* resultados Geneland) con el programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), con un intervalo de confianza del 95% y 1000 repeticiones.

El modelo de Hardy-Weinberg (H-W) es un modelo teórico en genética de poblaciones en el que establece que los apareamientos ocurren al azar, la población es de tamaño infinito, no hay mutación, migración y selección, y que las frecuencias genotípicas de un locus permanecen constantes, características de una población ideal (Lessa, 2004 y Hedrick, 2005). Bajo estos supuestos estimé la desviación del equilibrio de H-W para los nueve loci por población, a través de una prueba exacta basado en el algoritmo de cadenas de Markov, en el que consideré los siguientes criterios: 10 000 dememorizaciones, 200, "bach" y 1000 iteraciones en el programa GENEPOP versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995). En este mismo análisis obtuve los coeficientes de endogamia F_{IS} de Weir y Cockerham (1984) para cada una de las poblaciones por locus, con la finalidad de obtener el exceso (valor negativo) o deficiencia (valor positivo) de heterocigotos. Estimé también el desequilibrio de ligaje, combinando todos los pares de loci utilizados en este trabajo, con la finalidad de ver si estos se encontraban o no ligados genéticamente. Para todos los análisis antes mencionados apliqué corrección de Bonferroni secuencial. Este tipo de análisis se realiza cuando se tienen comparaciones múltiples además de ajustar el error tipo 1 (rechazar una hipótesis cuando en realidad ésta es verdadera), por lo tanto permite evaluar la significancia de los valores P a partir de un nivel de significancia dado ($\alpha = 0.05$) respecto a un número k de comparaciones. La corrección de Bonferroni secuencial tiene el siguiente procedimiento: 1) ordenar los valores de P de menor a mayor ($P_1 < P_2 < \dots < P_i$) y 2). Si $P_1 \leq \alpha/k$, se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el segundo valor más pequeño y así sucesivamente hasta que se acepte la hipótesis (Rice, 1989; Hedrick, 2005).

Con el programa GenAlEx v.6 (Peckham y Smouse 2006) calculé la diversidad genética por población. Los parámetros considerados fueron: el número observado de alelos (n_o), número efectivo de alelos (n_e), heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e) y heterocigocidad de Nei (H_{NEI}).

El número efectivo de alelos es el número de alelos frecuentes en una población ideal y se calcula como el inverso de la homocigocidad esperada:

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

La heterocigocidad observada (H_o) es una de las medidas que mejor describe la variación genética de una población (Allendorf y Luikart, 2007), y está dada por:

$$H_o = \sum_{i < j}^n p_{ij}$$

donde p_{ij} es la frecuencia del genotipo ij .

La heterocigocidad esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg se calcula como:

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

Por otro lado, Nei (1978) propuso que para poblaciones pequeñas la heterocigocidad esperada tendría que tener una corrección apropiada por lo tanto se tiene que:

$$H_{NEI} = 2N/2N-1(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2)$$

donde N es el tamaño de muestra y p_i^2 es la proporción de homocigos (Hedrick, 2005).

Estructura genética

Una manera de evaluar la estructura genética es por medio de los estadísticos de F propuestos por Wright en 1951 en el que define tres coeficientes distintos. El primero es F_{ST} (coeficiente de fijación), que permite evaluar la diferencia entre subpoblaciones, los valores van de 0 (no hay diferencia o estructura) a 1 (completamente diferentes); el segundo es F_{IS} (coeficiente de endogamia) determina el exceso o deficiencia de heterocigocidad de los individuos al interior de las subpoblaciones ($F_{IS}=0$, no hay endogamia; $F_{IS}=1$, hay endogamia); finalmente F_{IT} (coeficiente de endogamia total de un individuo) que mide la reducción de heterocigocidad del individuo con respecto al resto de la población (Wright 1969, Hedrick 2005, Allendorf y Luikart 2007). Estos coeficientes los calculé con el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet *et al.* 2002).

Para evaluar el aislamiento por distancia hice una prueba de Mantel (correlación parcial entre un grupo o conjunto de dos o tres matrices de distancias), en el cual utilicé la distancia genética de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards 1967). Dicha

distancia es la representación de dos poblaciones sobre la superficie de una hiperesfera multidimensional, toma en cuenta las frecuencias alélicas y no considera las mutaciones (Cavalli-Sforza y Edwards 1967). Además es una de las mejores medidas para microsatélites en la construcción de árboles de distancia (Takezaki y Nei 1996). Cabe mencionar que este análisis lo realicé para cada población detectada por Geneland. Las distancias genéticas las estimé entre localidades para cada una de las poblaciones, utilizando GeneClass v.2 (Piry et al. 2004); obtuve las distancias geográficas entre localidades (en km) para cada una de las poblaciones, medidas con la herramienta *Measure* del programa Google Earth. Finalmente para el análisis de Mantel con las dos matrices (genética y geográfica) utilicé el programa XLSTAT 2009.5.

La evaluación a niveles jerárquicos (diferencia entre poblaciones y entre los individuos) la hice por medio de un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992), con el programa Arlequín 3.1 (Excoffier et al., 2005), utilizando 30,000 permutaciones. El AMOVA utiliza métodos permutacionales no paramétricos para analizar la distribución de la varianza genética de manera jerárquica, mediante la partición de la varianza en componentes de covarianza. Con Arlequin evalué también la estructura genética entre poblaciones con los estimadores pareados de F_{ST} (Weir y Cockerham 1984, Michalakis y Excoffier 1996), con corrección de Bonferroni para cada una de las comparaciones.

Finalmente construí un árbol de distancias de Neighbour-Joining (N-J) con el programa MEGA (Tamura et al., 2007) a partir de las distancias genéticas de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards 1967) como forma de 'inspeccionar' la relación genética existente entre las poblaciones. La estimación de bootstrapping se elaboró a partir de los programas Seqboot (R (replicas) = 10000), Gendist (M (análisis múltiples) = 10000), Neighbor (grupo externo = población D y M=10000) y Consense, todos implementados en Phylip versión 3.69 (Felsenstein, 1989).

Resultados

Definición de las poblaciones

El número total de individuos utilizados en este estudio fue de 126 (109 muestras de museo y 17 muestras frescas) (Fig. 1), de 76 localidades diferentes.

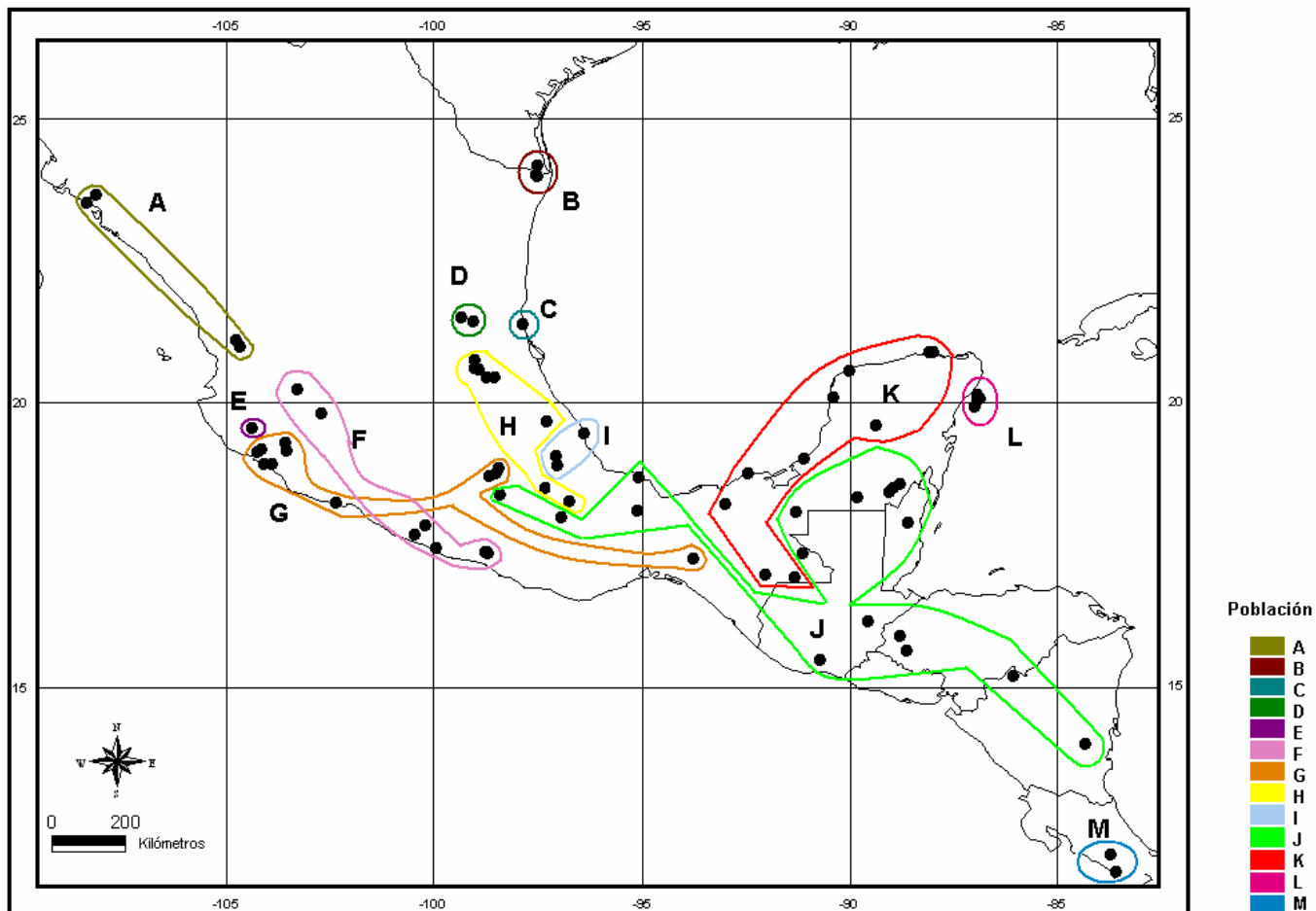


Figura 1. Se muestran las 76 localidades de las 126 muestras de *Oryzomys couesi* en colores cada una de las poblaciones agrupadas por el programa Geneland.

Con el programa Geneland observé que de las 10 corridas realizadas, una de ellas fue la de mayor probabilidad a posteriori (29.9%) en la que se asignaron 11 poblaciones en total (Figura 2). Sin embargo, por la gran extensión territorial y porque algunas localidades tuvieron pocos individuos, hubo algunas diferencias entre corridas, por lo que separé dos grupos de localidades, basado en coherencia geográfica, tipo de vegetación y de número de individuos. Así, finalmente obtuve 13 poblaciones (Figura 1 y Tabla 2), denominadas A, B, C... hasta M.

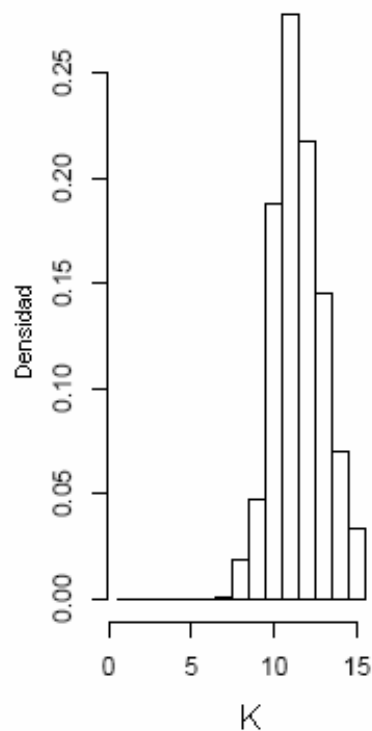


Figura 2. Gráfica que muestra el número estimado de “poblaciones” a partir de Geneland

Equilibrio de Hardy-Weinberg y ligaje de disequilibrio

En la prueba de desviación de equilibrio de Hardy-Weinberg por locus por población (Anexo 6) se observó que sólo los loci Ory10 (para G), Ory 16 (J), Ory 21 (F y J), Ory 28 (G), Ory 60 (B) y Ory 64 (F) estuvieron fuera de equilibrio con valores significativos ($P \leq 0.05$) después de corrección de Bonferroni. Los valores de F_{IS} según Cockerman variaron entre -0.013 a 0.872 y se encontraron valores negativos para la población A (Ory 10, 16 y 64), B (Ory 10 y 21), C (Ory 40 y 64), D (Ory 16, 21 y 28), F (Ory 3, 26 y 28), G (21 y 26), H (Ory 3, 21, 26, 28, 60), I (26 y 28), J (Ory 26, 60), K (26), L (Ory 26, 40 y 64) y M (Ory 21, 26, 40, 60) lo cual nos indica un exceso de heterocigotos, ninguna de las 36 comparaciones posibles mostró ligaje significativo después de corrección de Bonferroni (datos no mostrados).

Tabla 2. Se muestra cada individuo asignado a la “población” correspondiente de acuerdo al análisis de Geneland, así como la localidad a la que pertenece, número de catálogo de museo, año, tipo de tejido y lugar de procedencia.

Población	N	Estado	Localidad	# de Catálogo	Latitud	Longitud	Tejido	Año	Procedencia
A	5	Sinaloa	La Angostura	14845	25.3781	-108.1300	Piel	1975	CNMA- IBIOL UN
		Sinaloa	Damasco	14846	25.1981	-108.0911	Piel	1975	CNMA- IBIOL UN
		Sinaloa	Cárdenas	14847	25.1981	-108.0911	Piel	1975	CNMA- IBIOL UN
		Nayarit	Arroyo de los bueyes	35073	21.8634	-104.7483	Piel	1991	CNMA- IBIOL UN
		Nayarit	El colorado de la mora	35074	21.7100	-104.6483	Piel	1992	CNMA- IBIOL UN
B	4	Tamaulipas	Matamoros	2229	25.8544	-97.5307	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Tamaulipas	Soto la Marina	2199	25.8420	-97.4977	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Tamaulipas	Soto la Marina	2197	25.8420	-97.4977	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Texas	Los Fresnos	2764	26.0716	-97.4763	Hígado	1985	ASNHC/ASK
C	4	Tamaulipas	Ciudad Madero	2190	22.2475	-97.8481	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Tamaulipas	Ciudad Madero	2192	22.2475	-97.8481	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Tamaulipas	Ciudad Madero	2193	22.2475	-97.8481	Hígado	1985	ASNHC/ASK
		Tamaulipas	Ciudad Madero	2195	22.2475	-97.8481	Hígado	1985	ASNHC/ASK
D	3	San Luis Potosí	Rancho el Estribo	21128	22.4378	-99.3056	Piel	1984	CNMA- IBIOL UN
		San Luis Potosí	Rancho el Estribo	22031	22.4378	-99.3056	Piel	1984	CNMA- IBIOL UN
		San Luis Potosí	Salto del agua	3089	22.3413	-99.0386	Piel	1949	CNMA- IBIOL UN
E	1	Jalisco	Autlán	12344	19.7681	-104.3625	Piel	1991	UAMI
F	11	Jalisco	Melaque	6111	20.6793	-103.2668	Oreja	1981	MZFC
		Jalisco	Melaque	6127	20.6793	-103.2668	Oreja	1981	MZFC
		Guerrero	Puente de Lugardo	3263	17.3420	-100.2520	Oreja	1984	MZFC
		Guerrero	Puente de Lugardo	3262	17.3420	-100.2520	Oreja	1984	MZFC
		Guerrero	Nueva Delhi	3269	17.4200	-100.2040	Oreja	1984	MZFC
		Guerrero	Nueva Delhi	3268	17.4459	-100.1801	Oreja	1984	MZFC
		Guerrero	Faisanal	3274	17.4140	-100.2090	Oreja	1984	MZFC
		Guerrero	Jolotichan	6726	16.7592	-98.6853	Oreja	1980	MZFC
		Guerrero	Jolotichan	6730	16.7956	-98.7117	Oreja	1980	MZFC
		Guerrero	San Luis Acatlán	6725	16.8077	-98.7278	Oreja	1980	MZFC
		Guerrero	Venustiano Carranza	999	20.1181	-102.6917	Piel	1978	UAMI
G	22	Michoacán	Carranza	999	20.1181	-102.6917	Piel	1978	UAMI
		Michoacán	Playa azul	1749	17.9804	-102.3499	Piel	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1750	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1752	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1755	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1756	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1757	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1758	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1760	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Michoacán	Playa azul	1765	17.9804	-102.3499	Hígado	1985	ASK
		Colima	Quesería	1916	19.3867	-103.5715	Hígado	1985	ASK
		Colima	Quesería	1917	19.3867	-103.5715	Hígado	1985	ASK
		Colima	Alzada	2036	19.2500	-103.5167	Hígado	1985	ASK
		Colima	Tecomán	2103	18.9129	-103.8721	Hígado	1985	ASK
Colima	Cuyutlan	2123	18.9295	-104.0652	Hígado	1985	ASK		

		Colima	Cuyutlan	2124	18.9295	-104.0652	Hígado	1985	ASK
		Colima	30 km de Manzanillo	2141	19.2755	-104.1399	Hígado	1985	ASK
		Colima	18 km de Manzanillo	2164	19.1953	-104.2228	Hígado	1985	ASK
		Colima	Manzanillo	2165	19.1953	-104.2228	Hígado	1985	ASK
		Chiapas	Cintapala	231	16.5278	-94.1844	DNA	1995	ECO-SC-M
		Puebla	Atlepeztzingo	8102	18.7061	-98.4872	Piel	1986	UAMI
		Puebla	Atlixco	8103	18.8356	-98.4042	Piel	1986	UAMI
		Puebla	Tepexco	9503	18.6369	-98.6458	Piel	1988	UAMI
H	9	Hidalgo	San Pedro Huazalingo	5902	20.9799	-98.5075	Oreja	1992	MZFC
		Hidalgo	Huazalingo	5901	20.9799	-98.5075	Oreja	1992	MZFC
		Hidalgo	Chapulhuacan	13850	21.1789	-98.8958	Piel	1995	UAMI
		Hidalgo	Otongo	13853	20.9647	-98.7058	Piel	1995	UAMI
		Hidalgo	Pisaflores	13855	21.2006	-99.0061	Piel	1993	UAMI
		San Luis Potosí	Xilitla	16243	21.3843	-98.9904	Piel	2003	UAMI
			San Bartolomé						
		Oaxaca	Ayautla	38101	18.0306	-96.6997	Piel	1990	CNMA- IBIOL UN
		Puebla	Ajalpan	5276	18.3333	-97.2833	Piel	1984	UAMI
		Veracruz	Tlapacoyan	13869	19.9211	-97.2747	Piel	1994	UAMI
I	5	Veracruz	La Mancha	7654	19.6377	-96.3981	Hígado	2003	LSUMZ
		Veracruz	La Mancha	7655	19.6377	-96.3981	Hígado	2003	LSUMZ
		Veracruz	La Mancha	7656	19.6377	-96.3981	Hígado	2003	LSUMZ
		Veracruz	Coscomatepec	13858	19.1006	-97.0308	Piel	1994	UAMI
		Veracruz	Orizaba	13861	18.8933	-97.0069	Piel	1994	UAMI
J	27	Veracruz	Achotal	7796	17.7955	-95.1142	Hígado		LSUMZ
		Veracruz	Achotal	7797	17.7955	-95.1142	Hígado		LSUMZ
		Veracruz	Balzapote	6737	18.6000	-95.0665	Oreja	1984	MZFC
		Veracruz	Balzapote	6734	18.6000	-95.0665	Oreja	1984	MZFC
		Oaxaca	Cuicatlán	38103	17.6347	-96.8986	Piel	1990	CNMA- IBIOL UN
		Puebla	Axutla	4909	18.1842	-98.3842	Piel	1983	UAMI
		Chiapas	Ocosingo	225	16.7667	-91.1333	DNA	1994	ECO-SC-M
		Chiapas	Ocosingo	223	16.7667	-91.1333	DNA	1994	ECO-SC-M
		Chiapas	Ocosingo	224	16.7667	-91.1333	DNA	1994	ECO-SC-M
		Tabasco	Ruinas de Acalán	135	17.7667	-91.2833	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	Ruinas de Acalán	136	17.7667	-91.2833	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	Ruinas de Acalán	141	17.7667	-91.2833	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	Ruinas de Acalán	153	17.7667	-91.2833	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	Ruinas de Acalán	143	17.7667	-91.2833	Hígado	1985	ASK
		Quintana Roo	Río Bravo	29961	18.3481	-88.9414	Hígado	1990	ASNHC
		Quintana Roo	Río Bravo	29962	18.3481	-88.9414	Hígado	1990	ASNHC
		Quintana Roo	Tres garantías	7188	18.2333	-89.0167	Hígado	1990	ASNHC
		Quintana Roo	Tres garantías	7187	18.2333	-89.0167	Hígado	1990	ASNHC
		Quintana Roo	Kohunlich	7173	18.4201	-88.7865	Hígado	1990	ASNHC
		Belice	Big Falls	583074	17.5059	-88.5829	Piel	1985	Smithsonian
		Guatemala	Izabal	565124	15.1162	-89.5591	Piel	1984	Smithsonian
		Guatemala	Guanagazapa	565129	14.1892	-90.6959	Piel	1984	Smithsonian
		Honduras	Copan	565477	14.7752	-88.7736	Piel	1987	Smithsonian
		Honduras	Lempira	565478	14.4202	-88.6054	Piel	1987	Smithsonian
		Nicaragua	Nueva Fegovia	555693	13.8174	-86.0359	Piel	1990	Smithsonian
		Nicaragua	El Recreo	337782	12.1718	-84.3190	Piel	1963	Smithsonian

K	27	Campeche	Calakmul	37343	18.1000	-89.8000	DNA	1994	CNMA- IBIOL UN
		Campeche	El Remate	31708	20.5070	-90.3842	DNA	1990	CNMA- IBIOL UN
		Campeche	El Remate	31711	20.5069	-90.3842	DNA	1990	CNMA- IBIOL UN
		Campeche	Champotón	30753	19.0500	-91.1000	DNA	1989	CNMA- IBIOL UN
		Campeche	Champotón	30751	19.0500	-91.1000	DNA	1989	CNMA- IBIOL UN
		Tabasco	El Triunfo	2514	17.9618	-92.9878	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	El Triunfo	2516	17.9618	-92.9878	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	El Triunfo	2517	17.9618	-92.9878	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	El Triunfo	2518	17.9618	-92.9878	Hígado	1985	ASK
		Tabasco	El Triunfo	2527	17.9618	-92.9878	Hígado	1985	ASK
		Campeche	Centla	30752	18.6833	-92.4333	DNA	1988	CNMA- IBIOL UN
		Yucatán	Las Coloradas	7194	21.6100	-87.9862	Hígado	1990	ASNHC
		Yucatán	Las Coloradas Laguna	7195	21.6100	-87.9862	Hígado	1990	ASNHC
		Yucatán	Becanchen	6273	19.8216	-89.3380	Hígado	1989	ASNHC
		Yucatán	Las Palmas	Oc02	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Las Palmas	Oc24	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Las Palmas	Oc28	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Las Palmas	Oc29	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Las Palmas	Oc31	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Las Palmas	Oc1	21.1322	-90.0083	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc13	21.5764	-88.0753	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc15	21.5764	-88.0753	Oreja	2006	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc1bis	21.5764	-89.0753	Oreja	2008	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc3	21.5764	-89.0753	Oreja	2008	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc4	21.5764	-89.0753	Oreja	2008	IE
		Yucatán	Camino a las Coloradas	Oc2	21.5764	-89.0753	Oreja	2008	IE
		Chiapas	La independencia Maravilla	493	16.2521	-92.0215	DNA	1996	ECO-SC-M
Chiapas	Tenejapa Basurero	1319	16.1911	-91.3081	DNA	2002	ECO-SC-M		
L	5	Cozumel	Mezcalitos 1	3 Oc	20.4481	-86.8561	Cola	2006	IE
		Cozumel	Potabilizadora 1	20 Oc	20.5377	-86.8956	Cola	2006	IE
		Cozumel	CAPA eje 8 c8N	11 Oc	20.4281	-86.9222	Sangre	2007	IE
		Cozumel	Manglar 1	340	20.5515	-86.9161	Sangre	2007	IE
		Cozumel	Faro	300	20.2726	-86.9880	Sangre	2007	IE
M	3	Costa Rica	San José	1828	9.5144	-83.7008	Hígado	1984	LSUMZ
		Costa Rica	Puntaneras	1830	9.0847	-83.5747	Hígado	1984	LSUMZ
		Costa Rica	Puntaneras	1831	9.0847	-83.5747	Hígado	1984	LSUMZ

ASK y **ASNHC** (Ange lo Sta te Natural H istory Co llection); **ECO-SC-M** (Colegio F rontera Sur); **MZFC** (Museo d e Z oología Alfons o L. Herrera, F acultad de C iencias); **CNMA-BIOL** (Col ección N acional de Mamíferos- Instituto de Biol ogía UNAM); **LSUMZ** (Louisi ana State Univ ersity Mus eum Z oology); **UAM-I** (Colección de Mamíferos de la Sierra Volcánica Transversal de México-Universidad Autónoma de México plantel Iztapalapa); **IE** (Instituto de Ecología).

Diversidad genética

Los nueve microsatélites utilizados en este análisis fueron polimórficos para todas las poblaciones, con 156 alelos en total. Se encontraron 31 alelos privados; la población que presentó un mayor número de alelos privados fue J (Ory3, un alelo; Ory10, 3; Ory28, 1; Ory 40, 3; Ory 60, 1 y Ory 64 3). Las poblaciones que no presentaron alelos privados fueron B, E, F e I.

También se encontró un alto número de alelos por locus (22 a 27; Tabla 3). Cabe mencionar que para cada una de las poblaciones el número de alelos por locus observado fue desde dos (las poblaciones con pocas localidades y número de individuos) hasta 16 alelos (poblaciones con varias localidades y varios individuos) (Tabla 3). Los valores de heterocigocidad observada y esperada fueron altos en general para todas las poblaciones; la población F fue la que presentó valores más bajos de heterocigocidad observada y los valores más altos fueron en la población J (Tabla 3). Los valores promedio de diversidad genética de Nei fueron relativamente altos, entre 0.604 - 0.851 por locus; Los valores por población variaron entre 0.556 y 0.868 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de diversidad genética por población por locus y para el total de las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

		Locus									
Población		Ory3	Ory10	Ory16	Ory21	Ory26	Ory28	Ory40	Ory60	Ory64	Promedio
A	Na	7	6	8	6	6	6	4	6	2	5.667
	Ne	6.3	4.5	7.1	4.2	5.0	5.0	3.6	5.0	2.0	4.742
	Ho	0.800	1.000	1.000	0.800	0.600	0.800	0.800	0.800	1.000	0.844
	He	0.840	0.780	0.860	0.760	0.800	0.800	0.720	0.800	0.500	0.762
	H_{NEI}	0.933	0.867	0.956	0.844	0.889	0.889	0.800	0.889	0.556	0.847
	AP			1							
B	Na	5	5	3	3	3	4	4	6	3	4.000
	Ne	4.0	4.5	1.7	2.1	2.1	2.9	3.6	5.3	1.7	3.104
	Ho	0.500	1.000	0.500	0.750	0.250	0.500	0.750	0.750	0.250	0.583
	He	0.750	0.778	0.406	0.531	0.531	0.656	0.719	0.813	0.406	0.621
	H_{NEI}	0.857	0.933	0.464	0.607	0.607	0.750	0.821	0.929	0.464	0.715
	AP										
C	Na	5	5	3	7	3	5	4	4	3	4.333
	Ne	4.6	3.2	2.1	6.4	1.7	4.6	2.9	2.9	2.5	3.427
	Ho	0.750	0.750	0.500	0.750	0.250	0.750	1.000	0.750	0.750	0.694
	He	0.781	0.688	0.531	0.844	0.406	0.781	0.656	0.656	0.594	0.660
	H_{NEI}	0.893	0.786	0.607	0.964	0.464	0.893	0.750	0.750	0.679	0.754
	AP				1						

D	Na	4	3	4	4	5	5	2	4	3	3.778
	Ne	3.0	2.6	3.6	3.6	4.5	4.5	2.0	3.0	2.6	3.260
	Ho	0.667	0.667	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.667	1.000	0.889
	He	0.667	0.611	0.722	0.722	0.778	0.778	0.500	0.667	0.611	0.673
	HN_{EI}	0.800	0.733	0.867	0.867	0.933	0.933	1.000	0.800	0.733	0.852
	AP	1			1	1					
E	Na	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1.556
	Ne	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.556
	Ho	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.556
	He	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.278
	HN_{EI}	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.556
	AP										
F	Na	9	5	3	4	5	5	4	9	3	5.222
	Ne	5.4	1.6	2.1	1.6	2.0	3.7	1.5	5.3	2.2	2.825
	Ho	0.909	0.182	0.909	0.091	0.636	0.818	0.182	0.818	0.091	0.515
	He	0.814	0.388	0.533	0.384	0.504	0.731	0.318	0.810	0.541	0.558
	HN_{EI}	0.853	0.407	0.558	0.403	0.528	0.766	0.333	0.848	0.567	0.585
	AP										
G	Na	8	8	14	13	12	8	7	11	3	9.333
	Ne	5.4	1.8	9.0	5.7	4.4	5.0	2.3	7.3	1.5	4.729
	Ho	0.773	0.227	0.773	0.909	0.818	0.591	0.409	0.818	0.045	0.596
	He	0.816	0.456	0.888	0.825	0.774	0.801	0.567	0.864	0.340	0.703
	HN_{EI}	0.835	0.466	0.909	0.845	0.792	0.819	0.580	0.884	0.348	0.720
	AP			3					1		
H	Na	8	7	6	7	5	6	8	8	6	6.778
	Ne	5.2	2.5	2.5	5.1	1.8	4.9	5.6	5.8	3.2	4.066
	Ho	1.000	0.444	0.667	0.889	0.556	0.889	0.778	1.000	0.556	0.753
	He	0.809	0.599	0.593	0.802	0.457	0.796	0.821	0.827	0.691	0.711
	HN_{EI}	0.856	0.634	0.627	0.850	0.484	0.843	0.869	0.876	0.732	0.752
	AP	1	3				1	3	1	4	
I	Na	5	6	5	4	5	4	7	7	6	5.444
	Ne	4.2	5.0	4.2	3.8	3.1	2.9	4.5	6.3	5.0	4.338
	Ho	0.600	0.400	0.600	0.200	1.000	0.800	0.800	0.800	0.800	0.667
	He	0.760	0.800	0.760	0.740	0.680	0.660	0.780	0.840	0.800	0.758
	HN_{EI}	0.844	0.889	0.844	0.822	0.756	0.733	0.867	0.933	0.889	0.842
	AP										
J	Na	13	18	10	16	10	11	16	13	14	13.444
	Ne	9.2	11.1	4.9	8.1	2.8	8.1	9.3	9.7	8.4	7.951
	Ho	0.815	0.778	0.778	0.667	0.667	0.852	0.808	0.926	0.778	0.785
	He	0.891	0.910	0.795	0.877	0.646	0.877	0.893	0.896	0.881	0.852
	HN_{EI}	0.908	0.927	0.810	0.893	0.658	0.893	0.910	0.913	0.897	0.868
	AP	1									
K	Na	9	15	9	13	10	9	10	12	10	10.778
	Ne	4.9	9.5	4.9	9.1	1.8	5.5	7.0	8.1	7.3	6.470
	Ho	0.778	0.741	0.519	0.778	0.481	0.815	0.667	0.852	0.778	0.712
	He	0.796	0.895	0.798	0.890	0.441	0.818	0.857	0.877	0.863	0.804

	HN_{EI}	0.811	0.912	0.813	0.907	0.449	0.834	0.874	0.894	0.879	0.819
	AP		1					1			
L	Na	5	5	6	5	2	7	3	2	5	4.444
	Ne	3.1	3.6	5.0	3.6	1.5	5.6	1.9	1.5	3.1	3.193
	Ho	0.600	0.800	0.800	0.800	0.400	0.600	0.600	0.000	0.800	0.600
	He	0.680	0.720	0.800	0.720	0.320	0.820	0.460	0.320	0.680	0.613
	HN_{EI}	0.756	0.800	0.889	0.800	0.356	0.911	0.511	0.356	0.756	0.681
	AP						2				
M	Na	3	4	6	3	5	3	4	5	5	4.222
	Ne	2.6	3.0	6.0	2.0	4.5	3.0	3.0	4.5	4.5	3.675
	Ho	1.000	0.667	1.000	0.667	1.000	1.000	1.000	1.000	0.667	0.889
	He	0.611	0.667	0.833	0.500	0.778	0.667	0.667	0.778	0.778	0.698
	HN_{EI}	0.733	0.800	1.000	0.600	0.933	0.800	0.800	0.933	0.933	0.837
	AP			1		2				1	
Total	Na	6.3	6.8	6.0	6.7	5.5	5.8	5.8	6.8	5.0	6.077
	Ne	4.5	4.2	4.2	4.4	2.8	4.4	3.8	5.1	3.5	4.103
	Ho	0.707	0.589	0.696	0.715	0.589	0.801	0.753	0.783	0.655	0.699
	He	0.709	0.638	0.655	0.700	0.547	0.745	0.651	0.742	0.630	0.668
	HNEI	0.775	0.704	0.719	0.800	0.604	0.851	0.778	0.847	0.726	0.756

Na: Alelos observados; **Ne:** Alelos esperados; **Ho:** Heterocigotidad observada; **He:** Heterocigotidad esperada; **H_{NEI}:** Heterocigotidad corregida de Nei; **AP:** alelos privados.

Estructura genética

Respecto a los estadísticos F de Wright, los valores positivos de F_{IS} indican una deficiencia de heterocigotos para los loci excepto para Ory 26 (exceso de heterocigotos). Los valores de F_{ST} variaron de 0.019-0.151, es decir que hay diferencia en las frecuencias alélicas.

Tabla 4. Índices de fijación de Weir y Cockerham (1984)

	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Ory 3	0.075	0.030	0.103
Ory 10	0.231	0.132	0.332
Ory 16	0.099	0.069	0.162
Ory 21	0.146	0.083	0.217
Ory 26	-0.021	0.183	0.166
Ory 28	0.080	0.019	0.098
Ory 40	0.146	0.151	0.275
Ory 60	0.052	0.032	0.082
Ory 64	0.208	0.151	0.328
Total	0.196	0.093	0.114

Las pruebas de Mantel por población mostraron que no existe una correlación entre la distancia genética y la geográfica, ya que de las ocho poblaciones evaluadas (no se evaluaron las otras cinco poblaciones por falta de datos), sólo una presentó una correlación negativa significativa.

La diferenciación genética entre las poblaciones basada en F_{ST} varió de 0.044-a 0.311, donde sólo 25 de las 78 comparaciones (21.8%) fueron significativas después de corrección de Bonferroni. De acuerdo con la literatura, se ha reportado que los valores de F_{ST} entre 0-0.05 indican poca diferenciación, de 0.05- 0.15 una diferenciación intermedia y de 0.15 a 0.25 alta diferenciación (Wright, 1978; Ballouex y Lugon-Moullin, 2002), por lo tanto las poblaciones con mayor diferenciación fueron entre F (Jalisco, Guerrero, Michoacán) y L (isla Cozumel) ($F_{ST}=0.311$), seguida de G (Michoacán, Colima, Chiapas y Puebla) y L (isla Cozumel) ($F_{ST}= 0.244$); las de menor diferencia fueron entre la población H (Hidalgo, San Luis Potosí, Oaxaca, Puebla y Veracruz) y J (Veracruz, Oaxaca, Puebla, Chiapas, Tabasco, Quintana Roo, Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Campeche) ($F_{ST}= 0.011$) y entre H (Hidalgo, San Luis Potosí, Oaxaca, Puebla y Veracruz) y K (Campeche, Tabasco, Campeche, Yucatán y Chiapas) ($F_{ST}= 0.039$) (Tabla 5 y Figura 1).

Tabla 5. Valores pareados de F_{ST} entre las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A	-												
B	0.1405	-											
C	0.1340	0.0908	-										
D	0.0445	0.0934	0.1346	-									
E	0.0882	0.2334	0.1153	0.1397	-								
F	0.2109	0.2229	0.2696	0.2132	0.2461	-							
G	0.1064	0.1293	0.1700	0.1067	0.1333	0.0903	-						
H	0.1081	0.0928	0.0579	0.0926	-0.042	0.1555	0.0894	-					
I	0.0799	0.0805	0.0456	0.0700	0.0449	0.2125	0.1241	0.0508	-				
J	0.0643	0.0558	0.0433	0.0516	0.0362	0.1406	0.0974	0.0445	0.0129	-			
K	0.0874	0.0596	0.0437	0.0775	0.0716	0.1866	0.1318	0.0485	0.0216	0.0113	-		
L	0.1793	0.2014	0.1629	0.1916	0.1758	0.3114	0.2436	0.1536	0.1015	0.0923	0.0769	-	
M	0.0829	0.1087	0.1124	0.0729	0.1570	0.1590	0.1204	0.1032	0.0056	0.0388	0.0783	0.1691	-

Valores significativos en negritas ($P \leq 0.05$)

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para todas las poblaciones basado en F_{ST} , mostró que la variación entre poblaciones y entre individuos dentro de las poblaciones fue baja (9.2%, $P \leq 0.001$; 10.1%, $P \leq 0.001$), pero significativas, y que el mayor porcentaje está dado dentro de los individuos (80.7% $P \leq 0.001$) (Tabla 6).

Tabla 6. AMOVA con base en valores de F_{ST}

Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación	P
Entre las poblaciones	12	122.9	0.35291 Va	9.16	0.00000
Entre los individuos dentro de las poblaciones	113	439.592	0.38954 Vb	10.11	0.00000
Dentro de los individuos	126	392	3.11111 Vc	80.73	0.00000
Total	251	954.492	3.85356		

Índice de fijación $F_{ST} = 0.09158$

De acuerdo al árbol de Neighbor-Joining se observa una cierta concordancia geográfica entre las poblaciones, aunque con baja resolución, no inesperada dado que son microsatélites y que las poblaciones están muy ampliamente distribuidas (Figura 3). Pueden apreciarse dos grupos de poblaciones: el grupo más 'basal' (poblaciones B-D y A-F-G), que tienen una distribución nortea (las primeras) y a lo largo del Pacífico norte y centro (las segundas). El otro grupo lo conforman las poblaciones M-I y L-K-J, distribuidas en el centro y del sur-sureste (hasta Centro América); la población H es preponderantemente central (Figura 1 y 3).

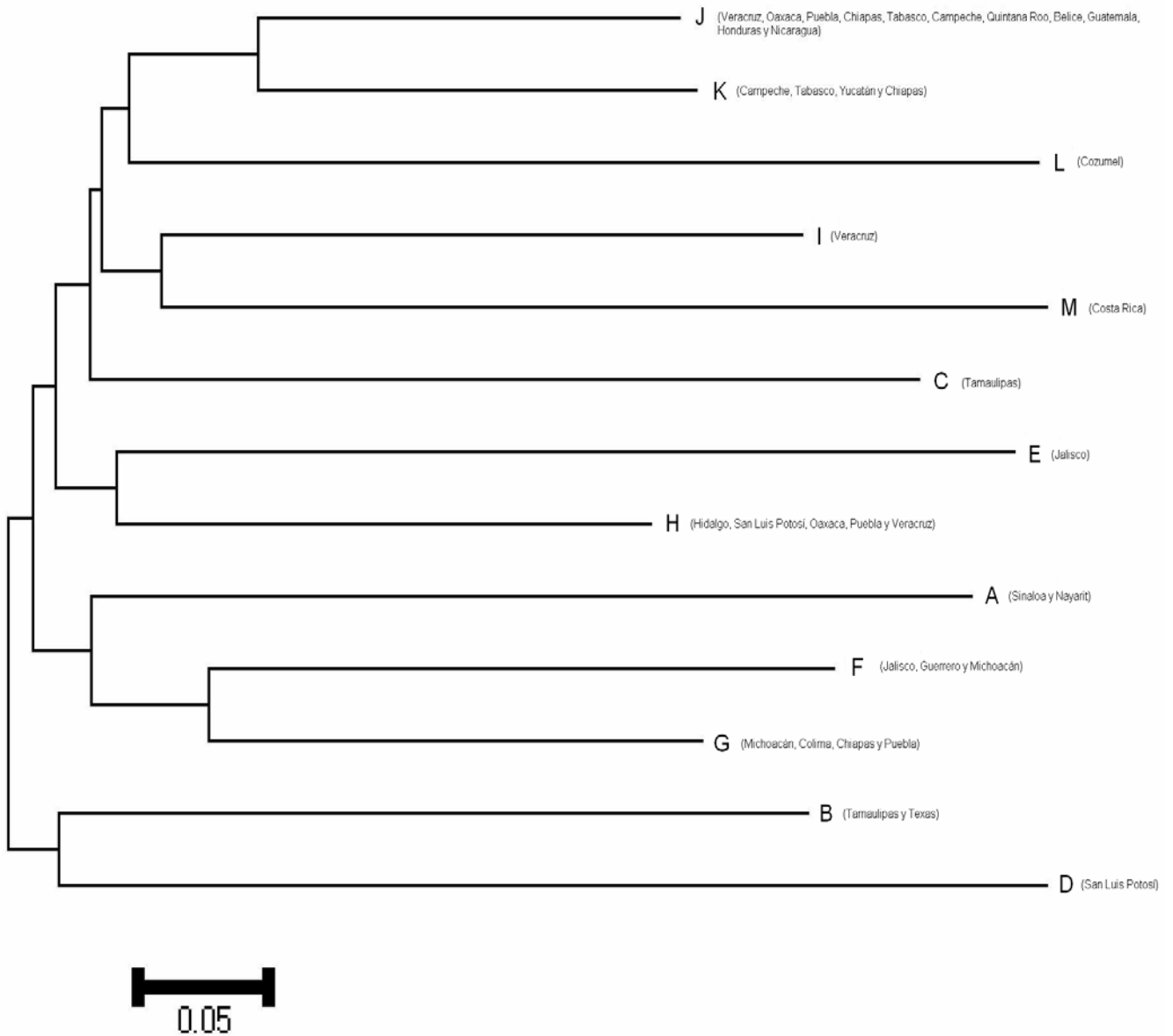


Figura 3. Árbol de Neighbour-Joining de distancias genéticas de Cavalli-Sforza entre las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

Discusión

A pesar de que *Oryzomys couesi* tiene una amplia distribución en México y que presenta poblaciones abundantes en algunas zonas del país, ha sido poco estudiado ecológica y genéticamente. Así, este trabajo representa el primer estudio genético y filogeográfico de esta especie, el cual incluye el análisis de individuos no sólo de México sino de todo Centro América, es decir, de su distribución completa.

Diversidad y estructura genética

Se observó que algunos loci de microsatélites, para algunas poblaciones, estuvieron fuera del equilibrio de H-W debido a una deficiencia de heterocigotos. Una de las posibles causas de dicha deficiencia puede ser la presencia de alelos nulos, ya que estos pueden no amplificarse al momento en el que se lleva a cabo la PCR (Selkoe y Toonen, 2006). RES Por otro lado, al haber considerado grupos de individuos como una población a una escala grande como la utilizada en este estudio, se esperan más homocigotos bajo el equilibrio de H-W; a este exceso de homocigotos en poblaciones subdivididas o subestructuradas se le llama "efecto Wahlund" (Trizio *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006).

A pesar de tener un tamaño de muestra pequeño y considerando la amplia distribución, las poblaciones de *O. couesi* presentaron niveles altos de diversidad genética: todas las poblaciones fueron polimórficas y el número de alelos promedio por locus fue alto (17); la población que tuvo el mayor número de alelos privados fue J, probablemente relacionado con el hecho de que es la de mayor tamaño y que incluye individuos de localidades que van desde el centro de México hasta Centroamérica (Figura 1), Asimismo, la heterocigocidad observada fue alta (0.698 en promedio) y no varió entre poblaciones (0.515 a 0.889). La población con el valor más alto de heterocigocidad fue nuevamente. Los valores de heterocigocidad esperada también fueron altos (0.558-0.852), los cuales son comparables con lo reportado para esta misma especie (*O. couesi cozumelae* $H_E = 0.639-0.792$, Vega *et al.*, 2007; *O. couesi* $H_E = 0.509-0.660$, Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009) y para otros roedores de la familia Muridae (*Microtus oeconomus*, $H_E = 0.570-0.760$, Van de Zande *et al.*, 2000; *Peromyscus polionotus niveiventris*, $H_E = 0.560-0.880$, Degner *et al.*, 2007).

Los resultados también mostraron una estructuración significativa para algunas de las poblaciones estudiadas (Tabla 5); la mayor diferenciación fue entre las poblaciones F (Jalisco, Guerrero, Michoacán) y L (isla Cozumel) ($F_{ST}=0.311$), seguida de G (Michoacán, Colima, Chiapas y Puebla) y L (isla Cozumel) ($F_{ST}=0.244$); en

contraste, las que presentaron una similitud mayor fueron las poblaciones H (Hidalgo, San Luis Potosí, Oaxaca, Puebla y Veracruz) y J (Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua). No es sorpresa que Cozumel se difere ncie fuerte mente, dado el aislamiento de esa población, tal que le merece estatus de subespecie (*O. couesi cozumelae*). Lo que resulta interesante es que se difere ncia más de las poblaciones que se distribuyen preferentemente a lo largo del Pacífico (F y G), en comparación con las del centro y norte. Asimismo, las poblaciones más similares son aquellas incluidas en este largo “cinturón” (población J) que recorre desde el sur de Centro América, a lo largo de Chiapas y Oaxaca, hacia el centro (Hidalgo, San Luis Potosí y Puebla) y termina en Veracruz por el Golfo de México. Hay diversos eventos geográficos y geológicos posiblemente asociados con esta distribución, que se discuten más adelante.

Finalmente, no se encontró una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica al evaluar cada una de las poblaciones, lo cual es similar a lo encontrado en un estudio de *O. couesi* de la península de Yucatán (en poblaciones de Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Chiapas; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Asimismo, los resultados de AMOVA corroboran la alta diversidad genética de *O. couesi* en su área de distribución, ya que el mayor porcentaje de variabilidad está dado dentro de los individuos (80.7%), es decir que la mayoría de los individuos son diferentes genéticamente, contrario a lo que encontraron Vázquez-Domínguez *et al.* (2009), donde el mayor porcentaje de variación se observó dentro de las poblaciones (92.1%), lo mismo que lo reportado por Vega *et al.*, (2007) para isla Cozumel (97.1%). Cabe mencionar que en estos dos casos, se analizaron poblaciones con mayor número de individuos y/o con una distribución más pequeña.

Filogeografía, biogeografía y geología

La distribución geográfica de las especies es resultado, entre otros, de eventos geológicos y climáticos, por lo tanto éstos nos pueden ayudar a entender los procesos de diversificación de las mismas. Dichos eventos marcan los límites de su distribución, los cuales además pueden repetirse en diferentes taxones, dando como resultado un patrón. Considerando lo anterior, Morrone *et al.* (2001) proponen lo que denominan provincias biogeográficas, como la unidad básica de la jerarquía biogeográfica que permite categorizar las áreas geográficas en términos de su biota (Escalante, 2009). Es interesante que nuestros resultados muestran cómo las poblaciones de *O. couesi*, determinadas con base en el análisis combinado de distribución genética y geográfica (Geneland), tienen concordancia con las provincias biogeográficas propuestas por

Morrone *et al.* (2001). Así, las poblaciones de *O. couesi* se encuentran dentro de 15 de estas provincias; la población A se encuentra en la provincia Pacífico Mexicana, la población B en Tamaulipas, C en el Golfo Mexicano, D en la Sierra Madre Oriental, E en la Costa Pacífico Mexicana, F en el Eje Neovolcánico y Costa Pacífico Mexicana, G en la Costa Pacífico Mexicana y Depresión del Balsas, H en la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre del Sur, I en el Golfo de México, K en el Golfo de México y Península de Yucatán, J (una de las poblaciones más grandes) en la Depresión del Balsas, Golfo de México, Chiapas y Oriente de América Central, y finalmente M en la provincia del Occidente del Istmo de Panamá.

Por otro lado, a pesar de no haber obtenido un patrón filogeográfico muy claro, dado que los microstélites no tienen la suficiente resolución para detectar eventos de gran antigüedad como es posible con el ADN mitocondrial, sí se observa que la diferenciación de algunas de las poblaciones está asociada a ciertos eventos geológicos de gran envergadura de la región. En el árbol de neighbor-joining (NJ; Figura 3) se observan dos grandes grupos, el primero que incluye el mayor número de localidades distribuidas predominantemente en todo el sur de México, todo Centro América, parte del centro del país y hacia el Golfo de México (J, K, L, I, M, C, E y H), separadas de otro gran grupo ubicado a lo largo del Pacífico (A, F y G). Dos grupos más pequeños que incluyen a San Luis Potosí, Hidalgo, Jalisco y Oaxaca (E y H) y el más norteño con poblaciones de San Luis Potosí, Tamaulipas y Texas (B y D).

La población J está incluida dentro de amplias formaciones geológicas tales como la Sierra Madre Oriental, la cual se originó en el Eoceno, así como el istmo de Panamá que se formó de manera gradual y terminó de consolidarse hace 3.5-3 millones de años (ma) (Coates y Obando, 1996), el cual representó una conexión entre dos masas continentales (Norte y Sudamérica), conocido también como puente Panamá y que permitió el gran intercambio biótico (GABI) (Marshall *et al.*, 1979). Sin embargo, el movimiento o intercambio comenzó previo a la formación del puente, ya que hubo conexiones temporales durante el Mioceno tardío (García-Moreno *et al.*, 2004). Asimismo, en Centroamérica hubo grandes eventos geológicos como el surgimiento de las montañas entre Chiapas y Guatemala hace 7.7 ma (Devitt, 2006), la formación del núcleo montañoso de Centroamérica en el Cretácico, dividiendo toda esta zona en dos (Pacífico y Golfo), además de la cordillera Talamanca en Costa Rica que separó esta zona en norte y sur. Otro factor a considerar en cuanto a que existe una relación entre las poblaciones de Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Belice (población J), es el hecho, más reciente en la historia de esta especie, de la conexión de vegetación que ha habido entre estos sitios; de hecho, actualmente el mayor conjunto de áreas naturales protegidas (Reserva de la Biosfera Calakmul,

Reserva de la Biosfera Montes Azules y la Reserva de la Biosfera Maya) se encuentran en esta zona.

Dentro de la población K hay dos localidades (la Independencia y Maravilla Tenejapa) pertenecientes a Chiapas, las cuales a su vez están separadas de las localidades Ocosingo del mismo estado y Ruinas de Acalán en Tabasco. Dicha separación está asociada al río Usumacinta, que funciona como barrera para diversas especies de flora y fauna; por ejemplo, se ha documentado filogeográficamente que dicha barrera separa a poblaciones del roedor *Otodylomys phyllotis* (García-Gutiérrez y Vázquez-Domínguez, en prep.). A su vez, la formación de cadenas montañosas y la erupción de volcanes en el norte de Chiapas se reconoce como una barrera para diversas especies de roedores, y que puede explicar el escaso número de especies de la familia Muridae en la península de Yucatán (11 especies; Medina *et al.*, 2006), familia que tuvo su mayor diversificación en Sudamérica y se distribuyó hacia el norte a través desde el Plioceno y más tarde por el puente Panamá. *Oryzomys* es uno de los géneros que migraron hacia México y que se distribuye en todo el suroeste mexicano. La separación observada en este estudio de las dos poblaciones en la península hace suponer que no hay flujo genético, sin embargo, hay que tomar en cuenta que no hay muestreos en el centro de la península (entre Yucatán y Quintana Roo y la costa); evaluar poblaciones en esta zona ayudaría a explicar con mayor detalle lo que está pasando con las poblaciones de *O. couesi* en esta región.

De acuerdo con el árbol de NJ la población de Cozumel (L) está cercanamente relacionada con las poblaciones J y K, las cuales incluyen todas las localidades de la península de Yucatán. El origen de la población isleña de *O. couesi* de Cozumel es resultado de varios eventos de colonización continente-isla, desde la península (Vega *et al.*, 2006).

El istmo de Tehuantepec se reconoce como una zona de alta complejidad biogeográfica (Ferrusquía-Villafranca, 1993), donde hubo varios eventos tectónicos, fluctuaciones en el nivel del mar y un levantamiento continental que unió a México con América Central durante el Plioceno-Pleistoceno. Se sabe que el istmo funcionó como corredor para algunas especies, mientras que representó una barrera para otras. Por un lado permitió la dispersión de especies siguiendo dos caminos, uno por el Pacífico sur, hacia Chiapas y Oaxaca, y el otro hacia el Golfo de México hacia Tabasco y Veracruz; ello puede apreciarse en las poblaciones G, J y K de *O. couesi*. Sin embargo, en el caso del roedor *Otodylomys phyllotis* el istmo actuó como barrera, donde esta especie tiene el límite norte de su distribución (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, en prep.).

El Eje Neovolcánico Transversal (ENT) se originó entre el Mioceno y el Plioceno (Beyerly, 1991), y ha sido ampliamente reconocido como una barrera geográfica que ha determinado la diversificación de especies y diferenciación de poblaciones de gran variedad de taxones. Por ejemplo, Mulcahy y Mendelson (2000) encontraron dos grupos monofiléticos para *Bufo vallicep* en el Golfo de México, uno hacia el norte del eje neovolcánico y el otro al sur, resultados que coinciden con lo encontrado para reptiles y mamíferos por Pérez-Higareda y Navarro en 1980. En *O. couesi* observamos que las muestras de Veracruz (Cosmotepic, Orizaba y la Mancha) forman una sola población (I) que se encuentra justo en el ENT y se relaciona con las poblaciones K, J y M (sureste y península de Yucatán y Centroamérica). El aislamiento de la población C (sur de Tamaulipas) muy probablemente esté asociado al ENT el cual pudo haber funcionado como barrera a partir de la cual se diferenciaron las poblaciones del norte de las del sur. Un muestreo a lo largo de toda la costa al norte de Veracruz y en Tamaulipas permitiría una mejor interpretación de los procesos relacionados con la estructura de estas poblaciones.

La depresión del Balsas es un área de tierras bajas rodeada por la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur, que se ha inundado de forma periódica a lo largo de su historia (Gómez-Tuena y Carrasco Núñez, 2000), la cual probablemente también funcionó como barrera y contribuyó a la separación de las poblaciones F y G respecto a las poblaciones H e I. Por otro lado, la población F (Jalisco, Guerrero, Michoacán) se encuentra a ambos lados del ENT, lo cual sugiere que no hubo una interrupción o separación de dicha población asociada al eje (Figura 1), contrario a lo que se tiene con peces (*Poeciliopsis infans*) y el cangrejo *Pseudothelphusa jouyi*, especies que presentan fragmentación de sus poblaciones debido al surgimiento del ENT (Huidobro *et al.*, 2006)

La población A (Sinaloa y Nayarit) representa la distribución más norteña de *O. couesi* por el lado del Pacífico, la cual está al norte del ENT; y donde se junta éste y la Sierra Madre Occidental; el surgimiento de este complejo montañoso aisló las poblaciones al norte (A) de aquellas más al sur (F y G; mayormente Jalisco, Guerrero, Michoacán, Colima). Por otro lado, la población G se ubica en la Sierra Madre del Sur, representada por las muestras de Michoacán, Colima y Chiapas, y en el ENT, que incluye algunas muestras de Puebla; esta población está totalmente separada biogeográficamente de las del sur y el Golfo de México.

Finalmente, la población H (Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla) está asociada con la Sierra Madre Oriental; el origen de esta formación data del Paleoceno que culminó en el Eoceno. Las poblaciones D y B (San Luis Potosí, Tamaulipas y Texas) también están ubicadas dentro de esta formación, lo cual corresponde con el hecho de

que están separadas filogeográficamente de las otras poblaciones estudiadas. Cabe mencionar que el sur de Texas es el límite norteño (por el Golfo de México) de la distribución de *O. couesi*. Aunque se esperaría que las poblaciones B, D y C estuvieran relacionadas genéticamente, esto no es así (árbol de NJ), por lo que es importante realizar un análisis en que se pueda ampliar el muestreo para el estado de Nuevo León, el centro y costa de Tamaulipas, para corroborar si estas poblaciones forman entidades separadas.

Oryzomys couesi

Oryzomys es uno de los géneros presentes en México de mayor diversificación dentro de la familia Muridae, con especies además de amplia distribución (Weksler, 2006) como la observada para *O. couesi*. Aunque el propósito de este estudio no fue nunca de carácter taxonómico, cabe mencionar que de las 17 subespecies que presenta *O. couesi* a lo largo de su distribución (Hall, 1981; Ceballos y Oliva 2005), hubo coincidencia con siete de estas subespecies y las diferentes poblaciones detectadas filogeográficamente: tal es el caso de la población A con la subespecie *O. c. lambi*, la población B con *O. c. aquaticus*, las poblaciones C y D con *O. c. peragrus*, E con *O. c. albiventer*, F y G (relacionadas genéticamente; Figura 3) con *O. c. mexicanus*, el conjunto I, J, K y M con *O. c. couesi*, y finalmente L con *O. c. cozumelae*. Existen diversos ejemplos donde, con evaluaciones filogeográficas, ha sido posible detectar unidades evolutivas que ameritan ser reconocidas como unidades diferentes (subespecies o especies; ver Castañeda-Rico 2008), o donde estas unidades ya existen y tienen concordancia con los grupos o poblaciones detectados filogeográficamente (ver Sullivan *et al.*, 2000).

Microsatélites y estudios filogeográficos

El presente estudio es también importante porque es el primer trabajo filogeográfico con mamíferos y microsatélites para México y hasta donde sabemos, a nivel mundial sólo existe un estudio filogeográfico con microsatélites y roedores (*Microtus arvalis* de Europa; Braaker y Heckel, 2009) lo que hace ha este trabajo el segundo. Los trabajos filogeográficos que se han hecho con este tipo de marcadores (microsatélites) han sido en combinación con ADNm en diferentes taxones, por ejemplo están los estudios de peces de Koskinen *et al.* (2002; *Thymallus thymallus*) y Domínguez-Domínguez *et al.* (2007; *Zoogoneticus quitzeoensis*), donde

ambos evalúan la filogeografía e historia demográfica; Knopp y Merilä (2009) realizaron un estudio sobre la filogeografía de la rana *Rana arvalis* para evaluar las rutas de colonización; Nittingger *et al.* (2007) compararon la diferenciación haplotípica con la variación nuclear de *Falco cherrug* (halcón sa cre); Rossiter *et al.* (2007) realizaron un análisis filogeográfico detallado con microsatélites que compararon con trabajos previos con ADN mitocondrial (ADNmt) de *Rhinolophus ferrumequinum* (murciélago grande de herradura); Muwanika *et al.* (2003) determinaron el efecto que tuvieron las fluctuaciones climáticas en el patrón de variación genética de *Phacochoerus africanus* (jabalí verrugoso); Braaker y Heckel (2009) evaluaron los eventos de colonización de *Microtus arvalis*. En los trabajos antes mencionados se obtuvieron tanto resultados concordantes entre marcadores (nucleares y mitocondriales) como contrastantes, aunque todos coinciden en que el uso de ambos es complementario para entender la historia evolutiva de las especies. Así, se entiende que en este trabajo se analiza sólo una parte de la historia de *O. couesi*. A futuro, sería ideal complementar nuestros resultados con algún gen mitocondrial, lo que permitiría determinar mejor los procesos asociados a la diversificación e historia evolutiva de la especie.

Referencias

- Aguayo, J.E y R. Trápaga. 1996. *Geodinámica de México y minerales del mar*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Álvarez-Castañeda, S.T. 1994. Current status of the rice rat, *Oryzomys couesi peninsularis*. *Southwestern Naturalist* 39: 99-100.
- Allendorf F. W., G. Luikart. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing. USA.
- Arbogast, B.S. y G.J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28:819-825.
- Arenguen-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil y J-Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13: 30-42.
- Avise, J. C., C. Giblin-Davidson, J. Laerm, J.C. Patton y R.A. Lansman. 1979. Mitochondrial DNA clones and matrilineal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 6694-6698.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecological Systems* 18: 489-522.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Harvard.
- Beaumont M y M.W. Bruford. 2000. Microsatellites in conservation genetics. Pp. 165-169. En: *Microsatellites Evolution and Application* (D. B. Goldstein y C. Schötterer, eds) Oxford University Press: New York.
- Brohede, J. y H. Ellegren. 1999. Microsatellite evolution: polarity of substitution within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceeding of the Royal Society of London* 266: 825-833.
- Braaker, S y G. Heckel. 2009. Transalpine colonisation and partial phylogeographic erosion by dispersal in the common vole (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology* 18: 2518-2531.
- Byerly, G. R. 1991. Igneous activity. Pp. 91-108. En: *The Gulf of Mexico Basin: The Geology of North America* (A. Salvador, ed), The Geological Society of America, Boulder, Colorado.

- Cabrera, A. L. Y A. Wi llink. 1973. *Biogeografía de América Latina*. Monografía 13, Serie de Biología, OEA, Washington, D.C.
- Cavalli-Sforza, L.L y A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedure. *American Journal Human Genetics* 19:233-257.
- Castañeda-Rico, S. 2008. Diversidad genética de *Habromys simulatus*, una especie endémica y restringida al bosque mesófilo de montaña. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, UNAM.
- Ceballos, G y A. Miranda. 2000. *Guía de campo de los mamíferos de la costa de Jalisco*, México.
- Ceballos, G. y G. Oliva. 2005. *Los mamíferos silvestres de México*. Conabio y Fondo de Cultura Económica, Hong Kong.
- Coates, A.G. 1996. The geologic evolution of the Central American Isthmus. Pp.21-56. En: *Evolutional and Environment in Tropical America* (J.B.C. Jackson, A.F Budd y A, G Coates, eds), pp 21-56. University of Chicago Press, Chicago.
- Cook, W.M., R. M. Timm y D. E. Hyman. 2001. Swimming ability in the three Costa Rica dry forest rodents. *Revista de Biología Tropical* 49: 1177-1181.
- Degner, F., I. J. Stout, J. D. Roth y C. L. Parkinson. 2007. Population genetics and conservation of the threatened southeastern beach mouse (*Peromyscus polionotus niveiventris*): subspecies and evolutionary units. *Conservation Genetics* 8:1441-1452
- Devitt, T. J. 2006. Phylogeography of the western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic-Neotropical transition. *Molecular Ecology* 15: 4387-4407.
- Domínguez-Domínguez, O y E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 59-70
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5:438-445.
- Engel, S.R., K.M. Hogue, J.F. Taylor y S.K. Davis. 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American Sigmodontinae rodents. *Molecular Biology and Evolution* 15:3
- Escalante, T. 2009. Un ensayo sobre regionalización biogeográfica. *Revista Mexicana de la Biodiversidad*. 80: 551-560.
- Excoffier, L., G., Laval, S. Schenider. 2005. Harlequins v. 3.0: Integrated software packaged for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 46-50.

- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166
- Ferrari, L., Valencia-Moreno y S. Bryan. 2005. Magnetismo y tectónica de la Sierra Madre Occidental y su relación con la evolución de la margen occidental de Norteamérica. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 3:343-378.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: A synopsis. En: *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. (Ramammorthy, T.P, R. Bye, A. Lot, J. Fa, eds). Oxford University Press. New York, Oxford.
- 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: 186-196.
- Gómez-Truena A, G. Carrasco Nuñez. 2000. Cerro Grande volcano the evolution of a Miocene stratovolcano in the early Trans-Mexican. *Tectonophysics* 318: 249-280
- Goudet J. 1995. FSTAT (v 1.2): A computer program to calculate f-statistics. *Journal of Heredity*. 86: 485-486.
- Guillot G., A. Estoup, F. Mortier, J.F. Cosson. 2005a. A spatial statistical model of landscape genetics. *Genetics*. 170: 1261-1280.
- Guillot, G., F. Mortier, A. Estoup. 2005b: GENELAND: a computer package for landscape genetics *Molecular Ecology Notes*. 2005. 712-715
- Guillot, G. 2009. On the inference of spatial structure from population genetics data. *Bioinformatics* 25: 1796-1801.
- Halfter, G. 2003. Biogeografía de la entomofauna de montañas de México y América Central. Pp 87-97. En: *Una perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía*. (J. J. Morrone y J. Llorente-Bouesquets, eds). La Prensa en Ciencias, UNAM.
- Hall, E.R. 1981. *The mammals of North America*. 2 Vol. John Wiley y Sons, Nueva York.
- Harris, D.J., D.S. Rogers, J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b sequences. *Molecular Ecology* 9:2129-2136.
- Hedrick, P. W. 2005. Genetics of Population. Jones and Bartlett Pub. Mass.
- Hershkovitz, P. 1972. The Recent mammals of the Neotropical region: a zoogeographic and ecologic review. Pp. 311-431. En: *Evolution, mammals, and southern continents* (A. Keast, F. C. Erk y B. Glass, eds). State University of New York Press, Albany.
- Hershkovitz, P. 1987. First South American record of couesii marsh rice rat, *Oryzomys couesi*. *Journal of Mammalogy* 68:152-154.

- Huidobro, L., J.J. Morrone, J.L. Villalobos, F. Álvarez. 2006. Distributional pattern of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography* 33: 731-741.
- Iturralde-Vinent, M., y R. MacPhee. 1999. Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. *Bulletin American Museum Natural History* 238: 1-95.
- Knopp, T., y M. Merilä. 2009. The postglacial recolonization of Northern Europe by *Rana arvalis* as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Heredity* 102: 174-181.
- Koskinen, M.T., J. Nilsson, A. Veselov, A.G. Potutkin, E. Rantan y C. R. Pimm. 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic pattern in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391-401.
- León-Paniagua, L., A. G. Navarro-Sigüenza, B.H. Hernández-Baños y J.C. Morales. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 653-664.
- Lessa, E. 2004. Guía de estudio de genética de poblaciones. Laboratorio de evolución. Facultad de ciencias. Montevideo, Uruguay.
- Marshall, L. G. 1979. A model for paleobiogeography of South American cricetine rodents. *Paleobiology* 5:126-132.
- Marshall, L.G, R.F. Butler, R.E. Drake, G.H. Curtis, R.H. Teddsford. 1979. Calibration of the great American interchange. *Science* 24: 272-279.
- Medinilla, E. E., I. Sánchez, M. B. García y C. L. Monterrubio. 2006. Análisis de la distribución de roedores de la familia Muridae en el sur de México. En: *Genética, y mamíferos mexicanos, presente y futuro*. (Vázquez-Domínguez y D.J. Hafner, eds). *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 32: 47- 54.
- Montaño-Pérez, K., E. Villalpando-Canchola y F. Vargas-Albores. 2004. AFLP (Amplified fragment length polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia* 31: 563-569.
- Morrone, J. J. 2001. A proposal concerning formal definitions of the Neotropical and Andean regions. *Biogeographica* 77: 65-82.
- Mouline, K., L. Granjon, M. Galan, C. Tatard, D. Abdoullaye, S. A. Atteyine, J.M. Duplantier y J.F. Cosson. 2008. Phylogeography of a Sahelian rodent species *Mastomys huberti*: a Plio-Pleistocene story of emergence and colonization of humid habitats. *Molecular Ecology* 17: 1036-1053.

- Mulcahy, D. G y J.R. Mendelson. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17: 173-189.
- Musser, G.G y M.D. Carleton. 2005. Superfamilia Muroidea. Pp 745-1531. En: *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D.E. Wilson y D. M. Reeder, eds). The Johns Hopkins University Press, Estados Unidos.
- Muwanika, V. B.S. Nyakaana, H.R. Siegismund y P. Arctander. 2003. Phylogeographic and population structure of the common wart hog (*Phacochoerus africanus*) inferred from variation in mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci. *Heredity* 91: 361-372.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Newton, I. 2003. *The Speciation and Biogeography of Birds*. Academic Press, San Diego.
- Nittinger, F., A. Gamauf, W. Pinsker, M. Wink y E. Haring. 2007. Phylogeographic and population structure of the saker falcon (*Falco cherrig*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology* 16: 1497-1517.
- Pardiñas, U.F.J., D. D'Elia y P.E. Ortiz. 2002. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: Estado actual de su conocimiento y prospectiva. *Journal Neotropical Mammalogy* 9: 209-252.
- Peakall R., P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet, J.- M., Paetkau D, Baudouin, L., Estoup, A. 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Raymond M, F. Rousset F. 1995. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity* 86: 284-249.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rossiter, S., P. Bendira, C. Dietz, S. Zhang y G. Jones. 2007. Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology* 16: 4699-4714.

- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. v. 2.0000. Genetics and Biometry Laboratory. Department. Of Anthropology, University of Geneva.
- Selkoe, K.A y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Smith, T.B., R.K. Wayne. 1996. *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Sullivan, J., E. Arellano y D. S. Rogers. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist* 155: 755-768.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Trizio, I., B.Crestanello, P. Galbusera, L.A. Wauters, G. Tosi y E. Matthysen. 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.
- Van Oosterhout, C., W.F. W.F. Hutchinson, D. P.M. Willis y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellites data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Van de Zande, L., R.C. Van Apeldoorn, A.F. Blijdenstein, D. de Jong, W. Van Delden y R. Bijlsma. 2000. Microsatellite analysis of population structure and genetic differentiation within and between population of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology* 9:1651-1656.
- Vega-Bernal R.R. 2006: Estructura y Diversidad genética de *Orizomys palustris cozumeale* de la isla Cozumel. Instituto de Ecología, UNAM. Tesis de Maestría. México.
- Vega-Bernal R.R., E. Vázquez-Domínguez, A. Mejía-Puente, A. Cuarón. 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Orizomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation*. 137. 210-222.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Paetkau, N.J. Tucker, G. Hinten, C. Moritz. 2001. Resolution of natural groups using iterative assignment tests: an example of two species of Australian native rats (*Rattus*). *Molecular Ecology* 10: 2069-78.

- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. Pp 441-461. En: *Ecología molecular* (L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, eds). SEMARNAT, INECC, Conabio, Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Vázquez-Domínguez, E., A. Mejía-Puente y R. Vega. 2009. *Oryzomys couesi* en el sureste de México: estimaciones genéticas y filogeográficas. En: *60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos mexicanos* (F.A. Cervantes, J. Vargas-Cuenca y Y. Hortelano-Moncada, compiladores). Instituto de Biología, UNAM, México (en prensa)
- Wang, Y. Q., C. R. Hughes, E. A. Guines-Candelaria y S. G. Michael. 2000. Polymorphic microsatellite loci of *Oryzomys palustris*, the marsh rice rat, in south Florida detected by silver staining. *Molecular Ecology* 9: 1931- 1932.
- Weir B.S y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38.1358-1370.
- Weksler, M. 2006. Phylogenetic relationships of Oryzomys rodents (Muroidea: Sigmodontinae): separate and combined analysis of morphological and molecular data. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 16: 1-48.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 323-254.
- Wright, S. D. 1969. Evolution and the genetics of population, Volume II. The Theory of gene frequencies. The University of Chicago Press. Chicago
- You-Chún, L., 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.

ANEXO 1

Extracción de ADN 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 μ l

Proteína K solution 175 μ l

Sustancias adicionales que se necesitan:

Isopropanol 100%

Etanol 70%

1. Cortar un pedazo pequeño de tejido y secar si es que éste estaba en etanol en un tubo de 1.5 μ l por un momento.
2. Añadir 300 μ l de Genomic DNA Lysis solution y voltear el tubo un par de veces constantemente.
3. Añadir 3 μ l de proteinasa K (20mg/ml) a la solución de lisis y mezclar, invirtiendo el tubo 25 veces. Incubar a 55 °C de 2-3hrs o durante toda la noche, lo importante es que este bien digerido el tejido. Durante la incubación vortexear o mover los tubos periódicamente.
4. Si el pedazo de tejido estuviera intacto después de la incubación se puede añadir un poco más de Proteínasa K e incubar nuevamente el tiempo que se crea necesario.
5. Añadir 1.5 de RNasa solution (4mg/ml) a la solución de lisis.
6. Mezclar la muestra invirtiendo el tubo 25 veces e incubar a 37°C por 30-60min. Para las muestras de museo se dejaron con RNasa por 2hrs, con la finalidad de que el ADN saliera lo más limpio posible.
7. Dejar que las muestras se enfríen a temperatura ambiente. Una vez frías añadir 100 μ l de protein precipitación.
8. Vortexear por 20 seg para mezclar bien la solución de precipitación.
9. Centrifugar a 14 000 durante 3 minutos. Las proteínas precipitadas deberán formar un pellet. Si el pellet no es bien visible, repetir el paso 2 seguido de una incubación en el hielo por 5 minutos y después repetir el paso 3.
10. El sobrenadante vaciar en un tubo de 1.5 ml nuevo y agregar 300 μ l de isopropanol (2-propanol 100%) cuidando de que el pellet se quede en el tubo viejo.
11. Mezclar la muestra invirtiendo lentamente los tubos 50 veces.
12. Centrifugar a 14 000 rpm por un minuto, el ADN será visible en forma de pellet blanco.
13. Quitar el sobrenadante y secar brevemente el tubo con un papel. Añadir 300 μ l de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para que el pellet se lave.
14. Centrifugar a 14 000 rpm por un minuto. Cuidadosamente quitar el etanol, lentamente para que no se arrastre el pellet y se pierda.
15. Repetir el lavado del paso 14 las veces que sean necesarias.
16. Poner el tubo inclinado boca abajo (sin que se salga el pellet) sobre un papel absorbente y dejar secar por 10 o 15 min o hasta que el etanol se evapore.
17. Añadir 75 μ l de ADN Hydration buffer o agua bidestilada.
18. Incubar la muestra a 65°C por 1 hr para acelerar la hidratación o incubar a temperatura ambiente toda la noche.
19. Vortexear a velocidad media por 5 seg para bajar le pellet.
20. Almacenar el ADN a 4°C o a -20°C a -80 si es por largo tiempo.

ANEXO 2

Re- precipitación de ADN

1. Adicionar Protein Precipitation Solution y adicionar etanol al 100%. Agregar de acuerdo a los volúmenes que se muestran en la tabla de abajo.
2. Invertir gentilmente los tubos 50 veces e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Centrifugar a 14 000 rpm por 5min.
4. Vertir el sobrenadante y agregar etanol al 70% de acuerdo al volumen que se especifica en la tabla de abajo.
5. Verter el sobrenadante, y dejar secar el ADN de 10 a 15 min.
6. Añadir 75 µl de ADN Hydration buffer o agua bibidestilada.
7. Incubar la muestra a 65°C por 1 hr para acelerar la hidratación o incubar a temperatura ambiente toda la noche.
8. Vortexear a velocidad media por 5 seg para bajar le pellet.
9. Almacenar el ADN a 4°C o a -20°C a -80 si es por largo tiempo.

Solución	Volúmenes recomendados	Adicionar a 100µl de muestra
Protein Precipitation Solution	½ volumen	50 µl
Etanol 100%	2 volúmenes	200 µl
Etanol 70%	3 volúmenes	300 µl

ANEXO 3

Extracción de ADN con el kit de QIAGEN

Componentes del kit

DNeasy mini spin columns in 2 ml collection tubes (50)

Buffer ATL 50 ml

Buffer AL 54ml

Buffer AW1 95ml (concentrado)

Buffer AW2 66 ml (concentrado)

Buffer AE 60 ml

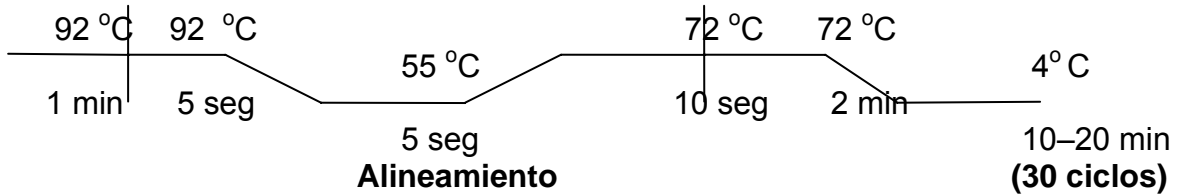
Proteinasa K 6 ml

1. Cortar 25 mg de tejido, éste cortar en fragmentos pequeños y colocarlos en un tubo de 1.5. Adicionar 180µl del buffer ATL.
2. Agregar 20 µl de proteinasa K, mezclar en el vortex e incubar a 56°C hasta que el tejido este completamente digerido. Vortexear esporádicamente durante la incubación. El proceso de lisis puede durar de 1-3 hr, depende del tejido, pero se puede dejar toda la noche a temperatura ambiente o a 56°C.
3. Después de que se haya digerido el tejido vortexear por 15 seg y adicionar 200µl de buffer AL y 200 µl de etanol (96-100%) y vortexear nuevamente hasta que se haga una mezcla homogénea (se puede mezclar previamente el AL y etanol), procurar que este paso sea rápidamente.
4. Vertir la mezcla del paso anterior en una columna con un tubo colector y centrifugar por un minuto a 14000 rpm. Tirar la solución y el tubo colector, quedarse con la columna.
5. Colocar la columna en un tubo colector nuevo y adicionar 500 µl de Buffer AW1 y centrifugar por un minuto a 14, 000 rpm, desechar la solución y el tubo colector.
6. Cambiar la columna de tubo colector y adicionar 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 14 000 rpm tirar la solución y el tubo colector.
7. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y agregar 200 µl de buffer AE directamente sobre la membrana incubar por un minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 14 000 rpm por un minuto. Se recomienda solo utilizar de 50 a 100 µl de buffer AE, y colectorlo en dos proporciones para tener un gradiente de concentración de ADN.
8. Guardar el ADN a 4°C o de -20 a -80 si es por un largo tiempo.

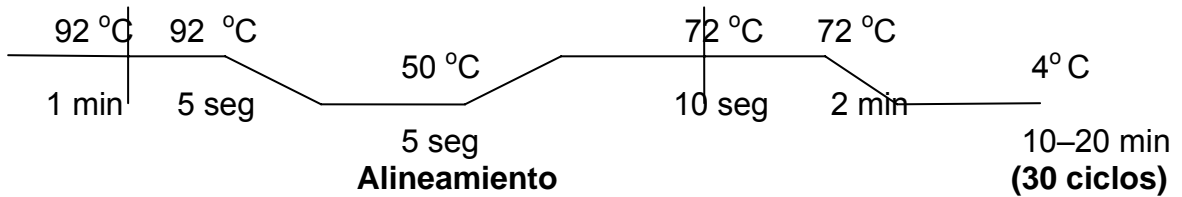
ANEXO 5

Programas de PCR

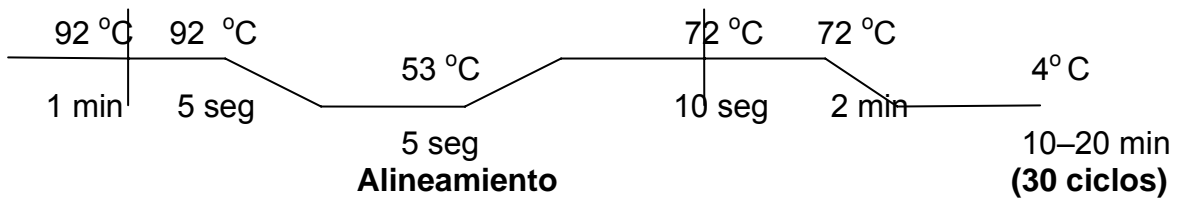
Primer Ory 03, 21, 28 y 40



Primer Ory 26, 16 y 64



Primer Ory 10 y 60



ANEXO 6

Equilibrio de Hardy- Weinberg y coeficientes de endogamia (F_{IS}) de Weir y Cockerman (W y C) para cada locus por población de *Oryzomys couesi*.

Locus		A	B	C	D	F	G	H	I	J	K	L	M
Ory 3	<i>P</i>	0.362	0.084	0.468	0.601	0.945	0.169	0.438	0.354	0.065	0.563	0.237	1.000
	W&C	0.158	0.455	0.182	0.200	-0.070	0.076	-0.180	0.314	0.104	0.042	0.226	-0.500
Ory 10	<i>P</i>	1.000	1.000	0.772	1.000	0.007	0.001	0.031	0.010	0.009	0.016	1.000	0.599
	W&C	-0.177	-0.091	0.053	0.111	0.565	0.518	0.312	0.579	0.164	0.191	0.000	0.200
Ory 16	<i>P</i>	1.000	1.000	0.429	0.465	0.027	0.019	0.755	0.352	0.000	0.005	0.615	1.000
	W&C	-0.053	-0.091	0.200	-0.200	-0.681	0.153	-0.067	0.314	0.040	0.366	0.111	0.000
Ory 21	<i>P</i>	0.793	1.000	0.146	1.000	0.003	0.414	0.993	0.016	0.002	0.051	0.466	1.000
	W&C	0.059	-0.286	0.250	-0.200	0.783	-0.078	-0.049	0.778	0.257	0.145	0.000	-0.143
Ory 26	<i>P</i>	0.150	0.143	0.144	1.000	1.000	0.163	1.000	1.000	0.333	0.807	1.000	1.000
	W&C	0.351	0.625	0.500	-0.091	-0.217	-0.034	-0.159	-0.379	0.013	-0.073	-0.143	-0.091
Ory 28	<i>P</i>	0.619	0.315	0.466	1.000	0.968	0.002	0.942	1.000	0.446	0.835	0.047	1.000
	W&C	0.111	0.368	0.182	-0.091	-0.071	0.284	-0.058	-0.103	0.047	0.023	0.368	-0.333
Ory 40	<i>P</i>	1.000	0.312	1.000	-	0.099	0.011	0.038	0.623	0.014	0.055	1.000	1.000
	W&C	0.000	0.100	-0.412	-	0.467	0.300	0.111	0.086	0.115	0.240	-0.200	-0.333
Ory 60	<i>P</i>	0.621	0.312	1.000	0.599	0.357	0.099	1.000	0.369	0.349	0.029	0.111	1.000
	W&C	0.111	0.217	0.000	0.200	0.037	0.076	-0.152	0.158	0.014	0.048	1.000	-0.091
Ory 64	<i>P</i>	0.127	0.143	1.000	1.000	0.001	0.000	0.093	0.618	0.028	0.328	1.000	0.199
	W&C	-1.000	0.500	-0.125	-0.500	0.846	0.872	0.252	0.111	0.135	0.117	-0.067	0.333

Valores significativos en negritas ($P \leq 0.05$) con correcciones de Bonferroni secuencial