
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



Diversidad Genética de *Oryzomys couesi* en la península de Yucatán, México.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ANAHI GUADALUPE MEJÍA PUENTE

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Enero de 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

315/ C. C. BIOLOGÍA

C. ANAHÍ GUADALUPE MEJÍA PUENTE
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “ **Diversidad Genética de *Oryzomys couesi* en la península de Yucatán, México**” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ** y el Asesor / a es: **DR. JOSÉ DE JESÚS SÁNCHEZ GONZÁLEZ.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 3 de Noviembre del 2005.

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

C.c.p. DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ - Director del trabajo

BIBLIOTECA CUCBA

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis con el título: "Diversidad genética de *Oryzomys couesi* en la península de Yucatán, México" que realizó el/la pasante Anahí Guadalupe Mejía Puente con número de código 396412266 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

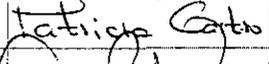
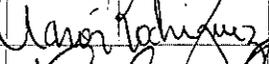
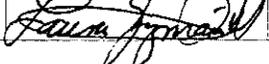
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 30 de Octubre de 2006


Dra. Ella Vázquez Domínguez
 Director/a del trabajo


 Dr. José De Jesús Sánchez González
 Asesor(es)

Handwritten notes:
 10/30
 CUCBA
 17/11/06
 Contr...

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Lucila Méndez Morán		9 de Nov - 2006
M. en C. Patricia Castro Félix		16 de Nov 2006
Dr. Aarón Rodríguez Contreras		16 de Nov 2006
Supl. Dra. Laura Guzmán Dávalos		Nov. 13, 2006.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MACROECOLOGÍA,
DEL INSTITUTO DE ECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ.
EL FINANCIAMIENTO DE ESTE TRABAJO, ASÍ COMO EL APOYO EN FORMA DE
BECA DE TESIS DE LICENCIATURA, FUERON OTORGADOS POR EL PROYECTO
PAPIIT IN215205 (DGAPA).

*Para la persona por la que más amor y
agradecimiento siento.MI MADRE*

Con la ayuda de un manual de instrucciones, una mujer estuvo durante horas tratando de montar un aparato que acababa de comprar. Finalmente se rindió y dejó las piezas esparcidas encima de la mesa de la cocina.

Imagínese la sorpresa que se llevó cuando, al cabo de varias horas, regresó a la cocina y comprobó que la sirvienta había montado el aparato y éste funcionaba a la perfección.

"¿Cómo diablos lo has hecho?", le preguntó asombrada.

"Verá señora..., cuando uno no sabe leer se ve obligado a emplear el cerebro", le respondió tranquilamente.

-Anthony de Mello-

AGRADECIMIENTOS

A Dios.....

A mi padre por darme todo su amor y apoyo a su manera.

A Efra por siempre confiar en mí, por recordarme que los sueños se cumplen y que el camino a recorrer es más sencillo si se tiene a alguien especial al lado.

A mis amigos de la secu, de la prepa y de la carrera (que ya saben quienes son) por brindarme su compañía y su tiempo, y por todos los momentos locos que hemos vivido.

A Go por ofrecerme su casa, su tiempo y sobre todo su amistad. Gracias a ti, mi estancia en el D.F fue mucho más divertida de lo que hubiera imaginado.

A mi tutora Ella, por arriesgarse al aceptar a una estudiante foránea, por la paciencia ante mis innumerables dudas y preguntas, y en especial por todo el apoyo brindado para que pudiera cumplir mi meta.

A todos mis compañeros del laboratorio de macroecología y de dinámica de poblaciones, a Gerardo Rodríguez Tapia por su ayuda con los mapas y la computadora en general, y en especial a Rodrigo y Angélica por enseñarme las técnicas de laboratorio, a Cynthia y Rebeca por sufrir estoicamente junto conmigo los momentos del revelado de geles y a todas las chicas por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Cervantes Reza de la Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM, y al Dr. Eduardo Espinoza Medinilla de la Colección de Mamíferos de ECOSUR por proporcionarnos los tejidos utilizados para la realización de este proyecto.

Al Mtro. Alejandro por escucharme y ayudarme durante mi formación académica, y por todas esas pláticas a las que siempre les saqué algún beneficio.

A la Mtra. Paty por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la genética y por sus valiosos comentarios a este trabajo.

A mi querida Universidad de Guadalajara, por otorgarme la mejor herramienta para desarrollarme en esta vida.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Diversidad y estructura genética de las poblaciones	2
1.2 Los marcadores moleculares de microsatélites	3
1.3 <i>Oryzomys couesi</i>	5
1.4 Características generales de la península de Yucatán	6
2. ANTECEDENTES	8
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. OBJETIVOS	12
5. HIPÓTESIS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Obtención de muestras	13
6.2 Extracción de ADN	15
6.3 Estandarización del protocolo de microsatélites	15
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata	16
6.5 Lectura de geles	16
6.6 Análisis de diversidad genética	17
6.7 Estructura genética y diferenciación de las poblaciones	20
7. RESULTADOS	
7.1 Diversidad genética	
7.1.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg	22
7.1.2 Desequilibrio de ligamiento	23
7.1.3 Distribuciones y frecuencias alélicas	24
7.1.4 Distribuciones y frecuencias genotípicas	30
7.1.5 Heterocigosidad	32
7.2 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones	33
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
9. LITERATURA CITADA	44
10. ANEXOS	51

RESUMEN

La diversidad genética ha sido reconocida como un componente fundamental de la biodiversidad, por ello es de suma importancia incrementar los estudios para evaluar los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones de especies de flora y fauna, así como de mamíferos mexicanos, sobre todo para los que se tenga poca o ninguna información. *Oryzomys couesi* (conocida como rata arrocera de pantano), presenta una amplia distribución a lo largo de la República Mexicana, sin embargo, la información que existe sobre este roedor en general es muy escasa y mucho más para el sur del país. En el presente trabajo, se analizó la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *O. couesi* de la península de Yucatán (incluyendo los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas) por medio de cinco loci de microsatélites.

Se encontraron niveles altos de diversidad genética, tanto en términos de polimorfismo y número de alelos, como en valores de heterocigosidad observada y esperada ($H_o = 0.578$ y $H_E = 0.779$). El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación se encuentra distribuida dentro de las poblaciones, mientras que un menor porcentaje, pero significativo, se encuentra entre las poblaciones. El flujo génico estimado entre poblaciones fue alto y los valores de diferenciación genética bajos, excepto para la población de Quintana Roo, la cual se diferenció significativamente de Chiapas y Yucatán. Puesto que la escala elegida para este estudio se basó en la división política de la región, se optó por hacer una nueva agrupación de las muestras con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta, obteniéndose cuatro poblaciones. Los resultados de diferenciación genética para estas poblaciones concordaron con los obtenidos previamente, mostrando que la proveniente de Quintana Roo fue de nuevo la más diferenciada.

A pesar de que las poblaciones de *O. couesi* en la península presentan altos valores de diversidad genética, éstos no son tan altos como los encontrados para otros roedores múridos. La moderada, pero significativa diferenciación encontrada entre poblaciones, particularmente respecto a Quintana Roo, es un indicativo del progresivo aislamiento de que están siendo objeto las poblaciones de *O. couesi*, mismo que de continuar la modificación y fragmentación de los ecosistemas en esta región, podría incrementarse e incluso extenderse al resto de las poblaciones en la península. Así, es esencial considerar la información sobre la diversidad y estructura genética de esta especie para la elaboración y establecimiento de programas de conservación y manejo de la biodiversidad en la península de Yucatán.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diversidad y estructura genética de las poblaciones

En la actualidad, la diversidad genética constituye un aspecto clave y fundamental en las estrategias de conservación. La variabilidad genética, y no sólo el número de especies u otra medida de diversidad, debe considerarse en planes de conservación, ya que es esencial para poder garantizar la permanencia de una especie a largo plazo (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006). La variabilidad genética representa el potencial evolutivo de la especie, la cual está directamente relacionada con la adaptación a diferentes condiciones ambientales. Además, se considera la materia prima para los procesos evolutivos (Hartl y Clark, 1997). La Unión Mundial para la Conservación (IUCN por sus siglas en inglés), ha reconocido a la diversidad genética como una de las tres formas de biodiversidad necesarias para la conservación (Frankham, 1996).

El nivel de diversidad genética presente en una población está asociado principalmente al sistema de apareamiento, el tamaño poblacional, la historia evolutiva de la población (generalmente desconocida) y del nivel de heterogeneidad ambiental (Booy *et al.*, 2000). La diversidad genética total existente en una especie se puede dividir en diferentes componentes: la diversidad genética presente en cada población (intrapoblacional) y la diversidad genética presente entre las diversas poblaciones (interpoblacional). A nivel evolutivo se considera a la población como la unidad fundamental (Hartl y Clark, 1997). El nivel de variación genética presente en una población representa un balance entre los procesos opuestos de ganancia y pérdida. Esto significa que altos niveles de variabilidad implican altas tasas de ganancia o bien bajas tasas de pérdida, así como bajos niveles de diversidad representan bajas tasas de ganancia o pérdida rápida. La variación genética se gana, básicamente, a través de la mutación y del flujo génico con poblaciones vecinas, y se pierde debido a la deriva génica o a la selección natural (Frankham, 1996; Amos y Harwood, 1998).

Los individuos que constituyen una población natural se diferencian entre sí en relación con distintos caracteres, los cuales pueden ser morfológicos o moleculares. El estudio de la diversidad genética en una población consiste en identificar las diferentes formas que presenta un carácter o un gen, y las frecuencias de cada una de estas formas. Medir la diversidad genética a través del análisis de caracteres morfológicos presenta el inconveniente de que el fenotipo es el resultado de la acción conjunta del genotipo y del medio ambiente, por lo que generalmente se desconoce qué tanto de la variación observada es determinada por factores genéticos (Hartl y Clark, 1997). Por otro lado, medir la variabilidad genética a nivel molecular puede darnos una medida más exacta de dicha diversidad. En genética de poblaciones la detección de diferencias genéticas entre individuos es esencial para conocer la estructura y diversidad de las poblaciones (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2001).

Las poblaciones de la mayoría de las especies, sino es que de todas, presentan ciertos niveles de estructuración genética. Barreras ambientales, procesos históricos e historias de vida (por ejemplo el sistema de apareamiento) dan forma, hasta cierto punto, a la estructura genética de las poblaciones (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Las poblaciones naturales son dinámicas en muchas dimensiones. A través del tiempo, cambian de tamaño, densidad y ubicación; y en el espacio, pueden fragmentarse en varias subpoblaciones y unirse a otras. De esta forma, pueden tener una población continental con migración hacia una o más islas (modelo de islas); estar conformadas por una serie de subpoblaciones aisladas entre sí, donde sólo es posible el intercambio de genes con las subpoblaciones adyacentes (modelo de "stepping-stone"); constar de una población continua donde los individuos dentro de ésta sólo intercambian genes con otros individuos geográficamente cercanos (modelo de aislamiento por distancia); o formarse y desaparecer con el tiempo, poblaciones o demos enteros, a través de procesos de extinción y recolonización (modelo metapoblacional). Decidir cuál de estos modelos se aproxima a la estructura de la población de una especie es el primer paso hacia el entendimiento de su biología poblacional. Estos modelos de estructura poblacional resultan en diferentes patrones de diferenciación genética dentro y entre las poblaciones o localidades donde se distribuye la especie (Baverstock y Moritz, 1996; Hey y Machado, 2003).

En poblaciones fragmentadas en general, y de roedores en particular, se han encontrado bajos valores de diversidad genética. El aislamiento por barreras físicas para la dispersión y el aislamiento por distancia consecuencia de la fragmentación y separación espacial de las poblaciones reducen el flujo génico entre éstas, incrementando la endogamia y la deriva génica, y disminuyendo los niveles de variabilidad genética. Así, las poblaciones que presentan aislamiento por distancia están frecuentemente diferenciadas genéticamente (i.e., poblaciones más cercanas son genéticamente más similares que aquellas que se encuentran más distantes) (Gaines *et al.*, 1997; Balloux y Lugon-Moulin, 2002; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2004).

1.2 Los marcadores moleculares de microsatélites

Los métodos de análisis genético-moleculares se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ADN, ello a través del uso y aplicación de diferentes marcadores moleculares. Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que pueden ser aisladas, amplificadas, identificadas y manejadas con diversas técnicas para su visualización e interpretación. Con el desarrollo de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación directa de fragmentos de ADN, el uso de marcadores moleculares en estudios poblacionales se ha incrementado enormemente. Mediante estos marcadores podemos medir la diversidad genética

existente entre los individuos de una población, entre poblaciones y entre especies (Parker *et al.*, 1998; Booy *et al.*, 2000; Sunnucks, 2000). Estos marcadores han permitido evaluar la variabilidad genética de poblaciones y establecer especies y poblaciones prioritarias para la conservación (Crozier, 1997; Vázquez-Domínguez, en prensa).

Existe una gran diversidad de marcadores que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, los cuales varían en sus requerimientos técnicos y económicos, en la forma en que resuelven las diferencias genéticas y en el tipo de datos que generan. Idealmente, un marcador molecular debe de encontrarse ampliamente distribuido en el genoma, ser polimórfico y codominante (Williams *et al.*, 1990).

Los microsatélites (Variable Number Tandem Repeats [VNTR], Simple Sequence Repeats [SSR] o Short Tandem Repeats [STR]) son marcadores moleculares basados en variaciones del número de repeticiones de nucleótidos en tandem de secuencias cortas (Griffiths *et al.*, 1999; Frankham *et al.*, 2002; Zane *et al.*, 2002; Selkoe y Toonen, 2006). Son marcadores codominantes, heredados de manera mendeliana y ampliamente distribuidos en el genoma del núcleo, cloroplasto y mitocondria. Cada locus de microsatélite está caracterizado por una secuencia única conservada de ADN (cebador) que flanquea a una serie de motivos de nucleótidos repetidos. Los microsatélites presentan una alta resolución en la identificación de variantes entre individuos debido a que son altamente polimórficos, por lo que aportan información acerca de los procesos mutacionales acontecidos en las poblaciones, a partir de los cuales se pueden estimar las tasas efectivas de migración y los tiempos de divergencia de una población, entre otros procesos (Dowling *et al.*, 1996; Sunnucks, 2000). La gran cantidad de polimorfismo que presentan los microsatélites es producida principalmente por el apareamiento erróneo durante la replicación ("slippage missparing"). Este sistema de mutación no causa cambios en las secuencias flanqueantes lo cual explica el hecho de que éstas se mantengan tan conservadas (Li, 1997; Zane *et al.*, 2002).

El modelo más aceptado sobre la generación de nuevas variantes en estos marcadores es el de mutación paso a paso ("stepwise mutation model"; Kimura y Otha, 1978). Este modelo implica que cada mutación crea un nuevo alelo, ya sea mediante la adición o deleción de las unidades de repetición nucleotídica que la componen. Consecuentemente, la magnitud de las diferencias en el tamaño de los distintos alelos será proporcional al grado de relación entre ellos. Esto quiere decir que alelos que presenten grandes diferencias de tamaño, estarán más lejanamente relacionados que aquellos que presenten tamaños similares (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Los microsatélites son actualmente muy utilizados en estudios de genética poblacional. Existe un alto número de trabajos publicados, que se basan en estos marcadores para investigar la estructura genética de las poblaciones, enfocándose en cuestiones de evolución y conservación biológica (Parker *et al.*, 1998; Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Los microsatélites se han convertido en

uno de los marcadores moleculares más populares por las ventajas que presentan frente a otras técnicas como son: altos niveles de variabilidad, confiabilidad de los resultados, herencia codominante y longitud corta (Dowling *et al.*, 1996). Otra de las ventajas que presentan es el hecho de que los oligonucleótidos diseñados para una especie en particular, tienen la posibilidad de ser utilizados en estudios de taxa relacionados (Luikart y England, 1999).

1.3 *Oryzomys couesi*

La familia Muridae, la más grande y diversa dentro de los mamíferos, incluye a la mayoría de ratas y ratones conocidos. En el continente Americano, todas las especies de roedores muridos pertenecen a la subfamilia Sigmodontinae, que comprende 79 géneros, de los cuales *Oryzomys* es uno de los más diversificados (Emmons y Feer, 1990; Vinicius *et al.*, 2004).

Oryzomys couesi (Alston, 1877), conocida como rata arrocera de pantano, es un roedor de tamaño mediano a grande (226 a 332 mm), con las orejas pequeñas (13 a 18 mm) cubiertas por pelo y patas blancas. La cola es desnuda y escamosa, bicolor, oscura en la parte dorsal y clara en la ventral. Asimismo, la cola presenta la misma longitud que la cabeza y el cuerpo (Ceballos y Miranda, 2000; López y Medellín, 2005). Se distribuye desde el sur de Texas hasta el norte de Colombia. En México, su distribución incluye el Golfo de México desde Tamaulipas hasta Yucatán y por la costa del Pacífico hasta Chiapas (no existen registros en el centro del país). En la península de Yucatán se distribuye en los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, así como en la isla de Cozumel. Es una rata nocturna, terrestre, pero también una excelente nadadora, por lo que es común encontrarla en ambientes inundables como manglares (López y Medellín, 2005). Es abundante en los tipos de vegetación más húmedos como la vegetación riparia y la selva mediana, y menos común en matorrales espinosos, bosques y límites de éstos. Es omnívora y se alimenta de semillas, frutos, partes suculentas de hierbas y arbustos, y en ocasiones de peces pequeños, crustáceos e insectos (hormigas, escarabajos y larvas). Se reproduce durante todo el año, teniendo hasta 8 crías por parto (Reid, 1997; Ceballos y Miranda, 2000).

Dentro de las habilidades natatorias de *O. couesi* se encuentran: 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 y utilizar estos hábitats acuáticos para su alimentación o como rutas de escape (Cook *et al.*, 2001).

Las poblaciones de *O. couesi* fueron consideradas por un tiempo como una subespecie *Oryzomys palustris couesi*, con base en tres caracteres craneales cualitativos y el color del pelaje (Hall, 1981; Reid, 1997; López y Medellín, 2005). Posteriormente, se determinó a *O. couesi* como una especie distinta de *O. palustris*, porque no se encontró evidencia de hibridación en la zona de

simpatria en el sur del estado de Texas. Por ello, se estableció que estas especies se encontraban aisladas reproductivamente y representaban especies biológicas y evolutivas distintas (Schmidt y Engstrom, 1994).

1.4 Características generales de la península de Yucatán

Desde el punto de vista biogeográfico, los continentes se dividen en provincias bióticas, las cuales se caracterizan por poseer una biota distintiva en cuanto a su composición y estructura, donde las comunidades que la integran se asemejan más entre ellas que a las de otras provincias bióticas. Además, las provincias bióticas se distinguen por tener un número significativo de taxas endémicos. La península de Yucatán es muy distinta en su geografía, geología, diversidad y riqueza de su biota en relación con el resto del territorio mexicano. Por ello, ha sido formalizada y caracterizada como una provincia biótica por Barrera (1962) y Rzedowski (1981).

La Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY) es aceptada como una unidad biológica que se caracteriza por una combinación de factores tales como: unidad geomorfológica, patrones climáticos y edáficos y una estructura característica de tipos de vegetación y la biota animal y vegetal asociada a ellos (Estrada-Loera, 1991; Chiappy-Jhones *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 2003).

La porción mexicana de la PBPY se originó por movimientos tectónicos de levantamiento que ocurrieron en el Mioceno y Plio-Pleistoceno y consta de una gran plataforma caliza de origen marino. Se distinguen dos grandes unidades geomorfológicas: la más joven o reciente está ubicada en el norte, con superficies del Mioceno-Pleistoceno, niveladas durante el Cuaternario, con transgresiones y regresiones del Pleistoceno donde predominan las planicies y las rocas sedimentarias neogénicas; la más antigua, con levantamientos tectónicos del Mioceno, se encuentra en el sur y consta de planicies que alternan con lomeríos de hasta 400 msnm (Lugo-Hubp *et al.*, 1992; Bautista-Zúñiga *et al.*, 2003; Carnevali *et al.*, 2003).

En general, la PBPY se puede definir como un área de rocas fundamentalmente calizas (o diversos sustratos derivados o adyacentes a ésta) con elevaciones usualmente por debajo de 250 msnm, con poco drenaje superficial y precipitaciones que no exceden los 2,200 mm. En la península se presentan dos regímenes de lluvia: las uniformemente repartidas hacia la porción oriental y las lluvias de verano (mayo-octubre), hacia el sur al Golfo de México. El máximo de lluvia se verifica en septiembre, debido a los ciclones tropicales que afectan la región (Orellana *et al.*, 2003). Debido a la falta de drenaje superficial, una característica distintiva de la PBPY es la virtual ausencia de ríos. Los pocos que hay están concentrados hacia el sur del área (Río Champotón, Río Candelaria, etc.) y drenan básicamente la precipitación del Petén Guatemalteco. La geología cársica, asociada a los sustratos calizos, impone sistemas de drenaje subterráneos, con las típicas formaciones resultantes

tales como grutas y cenotes (lagunas u otros accesos al agua subterránea que se forman luego del derrumbe del techo de una gruta) (Carnevali *et al.*, 2003). Térmicamente, la región es cálida y muy cálida. La zona muy cálida está delimitada por la isoterma de 26°C e incluye una superficie que abarca desde el oeste de Yucatán y Campeche. Las zonas menos cálidas se ubican en pequeñas porciones al pie de la sierrita Puuc en el área de Ticul y en Peto con 24°C (Orellana *et al.*, 2003).

La península alberga cinco tipos principales de selva (Carnevali *et al.*, 2003):

- Selva mediana subperennifolia: está presente en la mayor parte de la península, encontrándose mayormente en los estados de Quintana Roo y Campeche.
- Selva mediana subcaducifolia: es el segundo tipo de vegetación más extendido en la península, se presenta en parte del estado de Yucatán, norte de Campeche y la parte norte de Quintana Roo.
- Selva alta perennifolia: está presente sólo en la parte sur de la península, en la frontera con Belice, Guatemala y Tabasco.
- Selva baja caducifolia: se distribuye al norte y noreste de la península, principalmente en Yucatán.
- Selva baja inundable: es particular de la península ya que este tipo de vegetación crece en suelos con poco drenaje.

Otros tipos de asociaciones vegetales son los manglares, los cuales también se encuentran presentes en la península y varían en su altura, composición y estructura (Carnevali *et al.*, 2003).

Existen distintas clasificaciones de provincias bióticas de México, que difieren en los criterios que se emplean para delimitar las áreas. Entre otros, se han utilizado criterios geográficos, paleontológicos, florísticos y faunísticos. Usando como criterio la distribución de mamíferos, Fa y Morales (1998), propusieron considerar la península como parte de una provincia grande llamada "regiones tropicales del sur", la cual abarca todas las tierras bajas del sureste de México, incluyendo la totalidad de los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, así como partes de los estado de Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Veracruz.

La composición de la fauna de la PBPY tanto de invertebrados como de vertebrados, es evidentemente neotropical, pero notablemente diferente de la de otras zonas de México, ya que presenta afinidad con zonas tropicales secas. La península es rica en especies de mamíferos terrestres: habitan 219 especies distribuidas en 10 órdenes, 29 familias y 118 géneros. La fauna de la PBPY es única, no tanto por la presencia de especies endémicas, que son más bien pocas, sino por la composición particular de las biotas y por la interesante historia geológica y paleobiológica de la región, todo lo cual ha determinado una fauna actual con patrones particulares y relevantes para el manejo y conservación de los recursos naturales (Arita y Vázquez-Domínguez, 2003).

2. ANTECEDENTES

El dilucidar los procesos que dan origen a la estructura y diversidad genética en animales, determinadas por factores como fragmentación de hábitat, aislamiento por distancia, fluctuaciones en la densidad poblacional y variación en los patrones de dispersión, ha sido objetivo de estudio desde hace algún tiempo (e.g., Wright, 1951). Evaluar las consecuencias genéticas en especies que residen en hábitat fragmentados es importante para determinar poblaciones prioritarias para la conservación. La reducción y fragmentación del hábitat ocasiona que el flujo génico entre poblaciones disminuya, mientras que la deriva génica y la endogamia aumentan. Esto conduce a un aislamiento y mayor diferenciación entre poblaciones y a una menor diversidad genética intrapoblacional (Amos y Harwood, 1998; Mossman y Waser, 2001).

Para poblaciones de vertebrados terrestres no voladores, como los roedores, la separación genética puede ser causada por barreras naturales como mares, lagos, ríos y montañas. Por ejemplo, en un estudio realizado con la ardilla *Sciurus vulgaris*, Trizio y colaboradores (2005) encontraron una diferenciación genética significativa entre poblaciones ubicadas a lo largo de 250 km de bosques en los Alpes italianos. Los autores concluyeron que a pesar de que estos bosques representan un hábitat prácticamente continuo, la presencia de algunas montañas altas (> 2500 m), tuvieron un efecto de barrera sobre la dispersión de los individuos reduciendo el flujo génico entre las poblaciones a nivel local.

La modificación y destrucción de hábitats naturales ocasionada por el hombre ha alcanzado tasas alarmantes. Como consecuencia, el tamaño de parches o fragmentos de hábitat ha disminuido, mientras que la distancia entre éstos se ha incrementado, con la consecuente reducción del tamaño de las poblaciones y mayor riesgo de extinción local de las mismas (Gaines *et al.*, 1997; Mossman y Waser, 2001). Por ejemplo, Mech y Hallett (2001) realizaron un estudio con el ratón de campo *Clethrionomys gapperi* en bosques de coníferas en Washington. Observaron que las poblaciones que están aisladas por áreas de bosque talado, presentan una mayor diferenciación genética en comparación con poblaciones ubicadas dentro de una matriz de bosque con dosel cerrado, o dentro de sitios conectados por un corredor de bosque. De manera similar, en poblaciones fragmentadas de la ardilla *Sciurus vulgaris* en Bélgica se encontró que conforme disminuye el tamaño poblacional de los parches, la homocigosidad se incrementa significativamente; este efecto también se asocia con una baja tasa de inmigración (Wauters *et al.*, 1994). Gerlach y Musolf (2000) evaluaron el efecto de barrera que tienen las vías de comunicación terrestre en la subdivisión genética de poblaciones del ratón de campo *Clethrionomys glareolus* y encontraron subestructuración genética en poblaciones a ambos lados de una autopista en el sur de Alemania. Ello concuerda con lo observado en estudios que demuestran que muchas especies, particularmente de mamíferos pequeños, evitan cruzar los

caminos, lo cual limita el flujo génico entre poblaciones (Oxley *et al.*, 1974; Goosem y Marsh, 1997; Goossem, 2001; McDonald y St. Clair, 2004).

Además de las barreras físicas (naturales o creadas por el hombre), la distancia geográfica también es un factor que afecta el flujo génico. El aislamiento por distancia implica una correlación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica, es decir, que poblaciones más cercanas son genéticamente más similares que aquellas que se encuentran más distantes. Con el tiempo necesario (e.g., histórico), este patrón puede extenderse a grandes áreas geográficas, pero su efecto a nivel interpoblacional varía entre las especies (Ehrich y Stenseth, 2001; Balloux y Lugon-Molin, 2002). En su trabajo con la ardilla *Sciurus vulgaris*, Trizio y colaboradores (2005) analizaron la estructura genética de poblaciones a nivel local y regional, y encontraron una correlación significativa entre la diferenciación genética y la distancia geográfica sólo para la escala regional. En un estudio realizado con *Lemmus sibiricus* en un hábitat continuo, Ehrich y Stenseth (2001) evaluaron la estructura genética poblacional bajo tres escalas geográficas: 1) un transecto continuo de 11 km, 2) localidades separadas de 10 a 30 km entre sí, y 3) dos localidades a 300 y 600 km de distancia del área principal de estudio. Contrario a lo esperado, no observaron un patrón de aislamiento por distancia entre las localidades, y ellos sugieren que esto se debe al flujo génico entre poblaciones, relacionado con una alta tasa de dispersión de los individuos.

La vagilidad de las especies también afecta la estructura genética de las poblaciones, ya que las especies con mayor capacidad de dispersión pueden ser menos afectadas genéticamente que especies con menor vagilidad (McDonald y St. Clair, 2004). El movimiento de los individuos determina la escala en la que la fragmentación y la heterogeneidad espacial afectan la dinámica poblacional. Por ejemplo, Mossman y Waser (2001) realizaron un estudio con poblaciones de *Peromyscus leucopus* en parches de vegetación rodeados por matrices de agricultura, pastizales y caminos rurales. No encontraron evidencia de que la fragmentación del hábitat estuviera asociada con un decremento de la diversidad genética intrapoblacional. Sin embargo, sí observaron una estructuración genética significativa entre las poblaciones, incluso a escalas geográficas pequeñas, por lo que sugieren que *P. leucopus* es más sensible a los efectos de distancia que a los efectos de la fragmentación.

El uso de marcadores moleculares como los microsatélites ha hecho posible evaluar la variabilidad genética de poblaciones y especies a distintas escalas geográficas (Mossman y Waser, 2001). Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en estudios de genética poblacional por las ventajas que presentan, entre las cuales podemos resaltar los altos niveles de variabilidad y la posibilidad de ser utilizados en estudios de taxa cercanamente relacionados (Moncrief *et al.*, 1997). Por ejemplo, en un estudio con microsatélites, Van de Zande y colaboradores (2000) encontraron niveles relativamente altos de variabilidad en poblaciones fragmentadas del topillo *Microtus*

oeconomus, mientras que en estudios previos basados en aloenzimas se habían reportado niveles muy bajos de variabilidad para esta especie. Vega (2006) utilizó microsátélites de *Oryzomys palustris* para analizar la diversidad y estructura genética de *Oryzomys couesi cozumelae*, una subespecie endémica de la isla Cozumel; contrario a lo esperado, encontró niveles de variabilidad genética significativamente altos, cuando lo que comúnmente se observa en islas son niveles de moderados a bajos (Frankham, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

La fauna mastozoológica de México ha sido poco estudiada genéticamente, por ello es necesario incrementar los estudios para evaluar los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones de especies de mamíferos mexicanos, sobre todo de aquellos para los que se tenga poca o ninguna información (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006). La información que existe sobre *O. couesi* en general es muy escasa, y mucho más para el sur de México; además, en términos de diversidad genética, no existe información publicada para la especie en la región de estudio (Engstrom, 1984; Reid, 1997; Vázquez-Domínguez y Vega, 2006).

Como ya se ha mencionado, la península de Yucatán se diferencia en gran medida del resto del territorio mexicano debido a sus características físico-geográficas, así como por la diversidad y riqueza de su biota. Sin embargo, actualmente presenta una considerable fragmentación originada mayormente por actividades antropogénicas, como la agricultura y el turismo, siendo este último, junto con la urbanización de algunas áreas, una de las principales razones de la alta modificación de los paisajes costeros en la región (Chiappy y Gama, 2004). El 16% de la superficie total de la península se encuentra drásticamente modificada, debido a las severas alteraciones que presentan particularmente sus características geoecológicas, muchas de ellas de carácter irreversible. Por ejemplo, de 1985 a 1994 se redujo notablemente la superficie de selvas: en Campeche y Quintana Roo se tuvo una pérdida de más del 30% de superficie forestal, mientras que para Yucatán no se observaron cambios notables porque ya sólo queda una pequeña superficie de selvas de casi el 6% con respecto a la superficie estatal, lo que ha implicado una pérdida casi total de estos ecosistemas en el estado (Sánchez y Rebollar, 1999; Chiappy y Gama, 2004).

Es por ello que es de gran importancia generar información sobre *O. couesi* y más aún en poblaciones posiblemente fragmentadas. En particular, es necesario tener una evaluación actual de la estructura de sus poblaciones y de los niveles de variabilidad genética en la península de Yucatán. En este estudio se pretende determinar la estructura y diversidad genética de *O. couesi* de la península de Yucatán (incluyendo los estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche y Chiapas) por medio de marcadores moleculares.

4. OBJETIVOS

- Determinar la diversidad genética de *Oryzomys couesi* en la península de Yucatán (incluyendo los estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche y Chiapas), mediante el uso de marcadores moleculares (microsatélites).
- Evaluar la estructura genética dentro y entre las poblaciones de *O. couesi*.
- Proveer de información genética adecuada, la cual es indispensable si se pretende llevar al cabo acciones de conservación para la especie.

5. HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *O. couesi* más fragmentadas en la zona de estudio presentarán menores niveles de diversidad genética que las más continuas.
- Habrá estructuración y diferenciación genética entre poblaciones aisladas; particularmente la del estado de Chiapas, la cuál es alopátrica de las otras poblaciones.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron un total de 37 muestras de tejido de *O. couesi*: 29 de ejemplares de museo y ocho muestras de tejido fresco, mediante trampeo en distintas localidades del estado de Yucatán (Tabla 1).

Tabla 1. Sitios de colecta y procedencia de las muestras de *Oryzomys couesi*.

Estado	Localidad*	Coordenadas		No. de muestras	Procedencia
		Norte	Oeste		
Yucatán	1 Las Palmas	21° 07' 56"	90° 00' 30"	6	Trabajo de campo
	2 Ría Lagartos (camino a Los Colorados)	21° 34' 35"	88° 04' 31"	2	Trabajo de campo
	3 Dzilam de Bravo	21° 23' 33"	88° 53' 46"	2	CNMA
Quintana Roo	4 Rancho La Ceiba (Mpio. José María Morelos)	19° 54' 13"	88° 45' 16"	1	CNMA
	5 Ejido Mocooy (Mpio. Chetumal)	18° 25' 32"	88° 46' 46"	1	CNMA
	6 Centro de Estudios Faunísticos Tropicales San Felipe Bacalar	18° 46' 05"	88° 24' 50"	2	CNMA
	7 Estero Franco	17° 56' 27"	88° 52' 38"	1	CNMA
Campeche	8 Zona arqueológica Calakmul	18° 06' 00"	89° 47' 60"	1	CNMA
	9 El Remate (Mpio. Calkini)	20° 30' 25"	90° 23' 03"	5	CNMA
	10 Champoton 16 km N	19° 30' 00"	90° 43' 14"	2	CNMA
	11 Champoton 52 km SW	19° 03' 00"	91° 05' 60"	2	CNMA
	12 La Veleta	18° 40' 60"	92° 25' 60"	1	CNMA
Chiapas	13 Lacanjá-Chansayab (Mpio. Ocosingo)	16° 46' 00"	91° 08' 00"	3	ECO-SC-M
	14 Ejido Díaz Ordaz (Mpio. Cintalapa)	16° 31' 40"	94° 11' 04"	1	ECO-SC-M
	15 Paso del Soldado, Parque Nacional Lagos de Montebello	16° 07' 29"	91° 43' 30"	2	ECO-SC-M
	16 Rancho Santa Cruz (Mpio. Pijijapan)	15° 32' 37"	93° 16' 33"	1	ECO-SC-M
	17 Lagos de Montebello, Yalmuz	16° 07' 69"	91° 43' 57"	1	ECO-SC-M
	18 Las Grutas, Parque Nacional Lagos de Montebello	16°08' 07"	91°43' 33"	1	ECO-SC-M
	19 2.8 Km NW del Faro de Puerto Arista	15° 56' 45"	93° 49' 30"	1	ECO-SC-M
	20 Ejido Loma Bonita (Mpio. Tenejapa)	16° 11' 28"	91° 18' 29"	1	ECO-SC-M

CNMA: Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM. ECO-SC-M: Colección de Mamíferos de El Colegio de la Frontera Sur. * El número de las localidades corresponde a los sitios que se muestran en la figura 1.

Para el trampeo de animales vivos, se realizó trabajo de campo en los sitios más probables donde se podía encontrar la especie en la zona de estudio. Los individuos fueron capturados utilizando trampas Sherman, cebadas con avena mezclada con crema de cacahuete y vainilla. Se obtuvieron muestras de tejido de los individuos muestreados en campo (ca. 1 cm² de piel) que se conservaron en etanol al 95%. Este procedimiento no representó daño alguno para los individuos. Posteriormente se realizó la extracción de ADN tanto de muestras de museo como de tejido fresco.

6.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de tejido fresco se utilizó el kit comercial AquaPure Genomic DNA (Biorad, California), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los componentes del kit y la descripción del protocolo de extracción se muestran en el Anexo 1. El ADN de muestras obtenidas de ejemplares de museo fue extraído por medio de la técnica de fenol-cloroformo dado que esta técnica es más adecuada cuando se tiene ADN degradado o en poca cantidad. La descripción detallada del protocolo de extracción de ADN por fenol-cloroformo se presenta en el Anexo 2.

Se realizó la cuantificación del ADN extraído en ng/μl por medio de espectrofotometría (Biophotometer 6131, Eppendorf) y se hicieron pruebas de integridad del ADN extraído, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 μg/ml y visualizados bajo luz ultravioleta.

6.3 Estandarización del protocolo de microsatélites

Se estandarizaron cinco loci de microsatélites de *O. couesi*, utilizando cinco pares de oligonucleótidos (cebadores), caracterizados previamente para la amplificación de microsatélites de *O. palustris* (Wang *et al.*, 2000) (Tabla 2). Durante la estandarización se realizaron controles negativos para asegurar que no hubiera contaminación durante la amplificación y que las bandas obtenidas fueran propias del microsatélite. Las condiciones finales de amplificación para cada microsatélite se muestran en el Anexo 3. La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador MJ Research modelo PTC 100 donde se programaron los siguientes pasos: 1 minuto a 92°C, 30 ciclos de 5 segundos a 92°C, 5 segundos a la temperatura de alineación para cada microsatélite (Tabla 2) y 2 minutos a 72°C. Los productos de la reacción de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 μg/ml (Vega, 2006).

Hubo algunas muestras que presentaron problemas de amplificación, para las cuales se utilizaron tres concentraciones distintas de BSA ("Bovine Serum Albumin"): 0.5, 1 y 1.5 μg/μl. La BSA mejora el rendimiento y la especificidad de la PCR, al actuar como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa (Park y Lee, 2003). También se usaron diluciones de ADN para aquellas muestras que presentaban una concentración mayor a 400 ng/μl.

Tabla 2. Características de cinco loci de microsatélites (Wang *et al.*, 2000) utilizados para *Oryzomys couesi*.

Locus	Temperatura de alineación (°C)	No. de acceso de GeneBank	No. de repeticiones de AAT	Rango del tamaño de alelos (pb) *
OryAAT16	50	AF259065	11	91-115
OryAAT21	55	AF259066	16	151-199
OryAAT26	50	AF259067	13	97-133
OryAAT40	55	AF259068	13	127-157
OryAAT60	53	AF259069	11	126-168

* Rangos encontrados en el presente trabajo.

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata

Los geles de poliacrilamida se utilizan para analizar fragmentos de ADN de un tamaño menor a 1 kb. El rango de concentración de los geles va de 3.5% a 20%, dependiendo del tamaño del fragmento esperado (Maniatis *et al.*, 1982). En este trabajo, la separación de los productos de amplificación de microsatélites se realizó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, los cuales se corrieron a 500 volts durante 2.5 a 3 horas (Vega, 2006). El tiempo de corrida varió según el tamaño de las bandas esperadas, ya que mientras más grande fuera el tamaño, más tiempo se requería para observar una mejor separación de las bandas. Los geles fueron teñidos por medio de la técnica de tinción con plata utilizando el kit comercial GelCode Color Silver Stain Kit (Pierce Illinois), siguiendo las especificaciones del proveedor. Esta técnica consta de cuatro pasos: 1) equilibrar el gel con nitrato de plata, 2) un breve lavado con agua, 3) la plata iónica es reducida a plata elemental la cual reacciona con los sitios de ácidos nucleicos en el gel, 4) los núcleos coloidales de plata crecen por el depósito de plata adicional que se da durante la primera hora del paso de estabilización del gel. Además del kit comercial, se utilizó una técnica similar estandarizada en el laboratorio, cuya descripción se muestra en el Anexo 4.

6.5 Lectura de geles

Los geles teñidos fueron fotografiados digitalmente y se estimó la presencia de microsatélites de manera visual. La lectura de los geles se realizó por medio del programa LabWorks Image Acquisition and Analysis Software versión 4.5, con el cual se estimó el tamaño de las bandas en pares de bases (usando como referencia las escaleras de ADN de 10 pb colocadas junto a las muestras), así como la presencia de individuos homocigotos y heterocigotos. Con el programa es posible obtener lecturas (resultados) objetivas y constantes, ya que presenta un conjunto de herramientas específicas para este tipo de experimentos y elimina errores como la curvatura que se presenta en los geles, conocido comúnmente como "smiling effect" (el cual se genera cuando la temperatura en la parte media del gel es más alta que la de los extremos, por lo que los fragmentos de ADN de la parte central migran más rápido) (Westermeier, 2005).

6.6 Análisis de diversidad genética

Se determinaron las frecuencias alélicas, los genotipos observados, la diferenciación alélica y genotípica, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con su coeficiente de endogamia y el desequilibrio de ligamiento para los cinco loci de *O. coeusi* en las cuatro poblaciones estudiadas. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Genepop en la red (Raymond y Rousset, 1995).

Las frecuencias alélicas fueron estimadas utilizando la fórmula:

$$x_i = (2 N_{ii} + N_{ij}) / 2 N$$

donde x_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) dado en un locus específico, N_{ii} es el número de individuos homocigos para este alelo, N_{ij} es el número de individuos heterocigos para este alelo y N es el tamaño de muestra. Los genotipos observados para los cinco loci estudiados fueron comparados con las proporciones esperadas de Hardy-Weinberg y los valores exactos de P se estimaron con base en dos métodos: 1) método de cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992) para cada locus por población, 2) método de Fisher para los cinco loci por población. Los parámetros utilizados para el método de cadenas de Markov fueron: 10000 "dememorizations", 1000 "batches" y 10000 "iterations per batch".

El principio de Hardy-Weinberg establece que después de una generación de apareamientos al azar y en ausencia de selección, deriva génica, flujo génico y mutación, las frecuencias genotípicas de un locus permanecerán constantes o en equilibrio (Hedrick, 2000). Por lo tanto, al realizar la prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg la hipótesis nula es: "unión aleatoria de gametos" y se rechaza cuando $P \leq 0.05$.

La significancia de los valores de P fue evaluada mediante la corrección de Bonferroni secuencial. Para aplicar la corrección se determinan el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$) y el número de comparaciones (k) y se ordenan los valores de P de menor (P_1) a mayor (P_k). Si $P_1 \leq \alpha / k$ se rechaza la hipótesis nula y se prosigue con el segundo valor más pequeño de P (P_2). Si $P_2 \leq \alpha / (k - 2 + 1)$ se rechaza nuevamente la hipótesis nula y se prosigue con el tercer valor más pequeño de P (P_3). Si $P_3 \leq \alpha / (k - 3 + 1)$ se rechaza la hipótesis nula y así sucesivamente hasta que la hipótesis nula es aceptada. La corrección de Bonferroni secuencial elimina los valores de significancia asignados por el azar y se utiliza cuando se tienen comparaciones múltiples (Rice, 1989; Glantz, 2005).

El grado de endogamia que se da como resultado de la fragmentación de una población, puede utilizarse para medir la diferenciación que existe entre los fragmentos de esa misma población. Sewall Wright (1951) utilizó tres estadísticos F para describir la distribución de la diversidad genética dentro y entre los fragmentos de una población subdividida: F_{ST} es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones y su valor siempre es positivo; F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y en la población total,

respectivamente, donde los valores positivos de estos coeficientes indican una deficiencia de heterocigos y valores negativos indican un exceso de heterocigos. F_{IS} es la probabilidad de que dos alelos homólogos en un individuo sean idénticos por descendencia, es decir, que ambos sean copias de un alelo en particular perteneciente a un ancestro común. Así, F_{IS} es el coeficiente de endogamia (f) promediado de los individuos respecto a las subpoblaciones y su valor va de -1 a 1 (Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2002). Los valores de F_{IS} se estimaron con base en Weir y Cockerham (1984) para cada locus por población con el fin de determinar la deficiencia o exceso de heterocigos.

Se realizó también la prueba de disequilibrio de ligamiento mediante tablas de contingencia para todos los pares de loci, donde la hipótesis nula es: "los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus" y se rechaza cuando $P \leq 0.05$. Los valores exactos de P se estimaron con base en dos métodos: 1) método de cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992) para cada par de loci por población, 2) método de Fisher para cada par de loci para las cuatro poblaciones. Los parámetros utilizados para el método de cadenas de Markov fueron: 1000 "dememorizations", 100 "batches" y 1000 "iterations per batch". A la asociación al azar de los alelos de distintos loci se le llama "equilibrio de ligamiento", sin embargo, cuando dos loci en un cromosoma están ubicados muy cercanamente, ambos pueden no asociarse independientemente y ser transmitidos a la siguiente generación como un par. Incluso si los loci no están ligados físicamente en un cromosoma, bien pueden estar relacionados funcionalmente y ser transmitidos como un par. A la asociación no aleatoria de los alelos de distintos loci se le llama "desequilibrio de ligamiento" y esta prueba siempre debe realizarse cuando se utilizan microsatélites, ya que éstos pueden encontrarse agrupados en el genoma (Frankham *et al.*, 2002; Selkoe y Toonen, 2006).

Se evaluó la diferenciación alélica mediante tablas de contingencia, para cada par de poblaciones por locus y para cada par de poblaciones para los cinco loci utilizando una prueba exacta de Fisher (Raymond y Rousset, 1995); se determinaron los valores no sesgados de P , donde la hipótesis nula es: "la distribución alélica es la misma a lo largo de las poblaciones". También se evaluó la diferenciación genotípica mediante tablas de contingencia, para cada par de poblaciones por locus y para cada par de poblaciones para los cinco loci utilizando una prueba de G (Goudet *et al.*, 1996); se determinaron los valores no sesgados de P , donde la hipótesis nula es: "la distribución genotípica es la misma a lo largo de las poblaciones". La significancia de los valores de P fue evaluada mediante la corrección de Bonferroni secuencial.

Para estimar la diversidad genética en las cuatro poblaciones de *O. couesi* se determinó el número observado y efectivo de alelos, la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada (Levene, 1949) y la diversidad genética esperada de Nei (Nei, 1973) utilizando el programa PopGene ver. 1.31 (Yeh *et al.*, 1997).

El número efectivo de alelos (n_e), es el número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal, los cuales producirían la misma homocigosidad presente en la población actual. El valor de n_e suele ser menor al número de alelos observados, excepto cuando todos los alelos tienen la misma frecuencia (Hartl y Clark, 1997; Frankham *et al.*, 2002), y se estima como el recíproco de la homocigosidad:

$$n_e = 1 / \sum x_i^2 \quad (\text{Kimura \& Crow, 1964})$$

donde x_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un locus en una población, es decir, la homocigosidad esperada.

Una de las medidas de variación genética poblacional más ampliamente utilizada es el nivel de heterocigosidad. Debido a que los individuos de especies diploides pueden presentar un estado heterócigo u homócigo para un locus dado, esta medida resulta bastante útil como referente del grado de diversidad genética en una población. La heterocigosidad observada (H_o) puede calcularse como:

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

donde N_{ij} es el número de individuos heterócigos observados para un locus dado y N es el total de individuos muestreados (Hedrick, 2000; Frankham *et al.*, 2002).

La identidad génica u homocigosidad esperada está dada por la fórmula :

$$J = \sum x_k^2 \quad (\text{Nei, 1973})$$

donde x_k es la frecuencia del k ésimo alelo (k th) para un locus en una población, mientras que la identidad génica o heterocigosidad esperada se estima como:

$$H = 1 - J \quad (\text{Nei, 1973})$$

donde H sería la diversidad genética esperada de Nei para poblaciones sin apareamiento al azar.

Utilizando el algoritmo de Levene (1949), el cual es el mismo que el de Nei (1978), la heterocigosidad esperada no sesgada para tamaños de muestra pequeños (H_E), se puede estimar mediante la fórmula:

$$H_E = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

donde n es el tamaño de muestra y x_i es la frecuencia del i ésimo alelo (i th) para un locus en una población.

6.7 Estructura genética y diferenciación de las poblaciones

Se utilizó el programa PopGene ver. 1.31 (Yeh *et al.*, 1997), para estimar la distancia genética no sesgada de Nei (1978), la cual implica los siguientes cálculos:

$$\hat{G}_X = (2n_X J_X - 1) / (2n_X - 1)$$

$$\hat{G}_Y = (2n_Y J_Y - 1) / (2n_Y - 1)$$

$$\hat{G}_{XY} = J_{XY}$$

donde J_X y J_Y son $\sum x_i^2$ y $\sum y_i^2$ de las poblaciones X y Y respectivamente, y J_{XY} es $\sum x_i y_i$. Así, la distancia genética no sesgada para tamaños de muestra pequeño (\hat{D}) se estima como:

$$\hat{D} = -\ln [\hat{G}_{XY} / \sqrt{\hat{G}_X \hat{G}_Y}]$$

el valor de \hat{D} va de 0 (para poblaciones con frecuencias alélicas idénticas) al infinito (para poblaciones que no comparten ningún alelo) (Hedrick, 2000). En base a los valores de \hat{D} obtenidos, se elaboró un árbol de distancias mediante el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) utilizando el programa MEGA ver. 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) para representar gráficamente las diferencias entre poblaciones.

Con el programa Arlequín ver. 2.00 (Schneider *et al.*, 2000) se evaluó la relación entre la distancias genéticas y la distancias geográficas (en km) entre las poblaciones de *O. couesi*, por medio de una prueba de Mantel (Mantel, 1967), con 100,000 permutaciones y con base en el coeficiente de correlación r (Smouse *et al.*, 1986). También, se evaluó la estructura y diferenciación genética dentro y entre poblaciones con los estimadores pareados F_{ST} (número de alelos diferentes; Weir y Cockerham, 1984; Michalakis y Excoffier, 1996) y R_{ST} (suma de las diferencias al cuadrado de los tamaños de los alelos; Slatkin, 1995; Michalakis y Excoffier, 1996), además de calcular el número absoluto de migrantes intercambiados entre pares de poblaciones (M) y realizar una prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992).

Se considera que R_{ST} es un índice más adecuado para microsatélites, dado que utiliza la varianza de los tamaños de los alelos y se basa en el modelo de mutación paso a paso ("stepwise mutation model"; Kimura y Ohta, 1978) que es el modelo más aceptado para los microsatélites porque

presenta una mayor tasa de mutación por generación y porque mantiene cierta “memoria” del estado alélico previo, mientras que F_{ST} utiliza la varianza de las frecuencias alélicas y se basa en el modelo de alelos infinitos (“infinite alleles model”; Kimura y Crow, 1964) (Slatkin, 1995; Gaggiotti *et al.*, 1999; Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Sin embargo, para tamaños de muestra pequeños (≤ 10) y pocos loci estudiados (≤ 5), Gaggiotti y colaboradores (1999) recomiendan utilizar F_{ST} porque presenta valores menos sesgados. Por lo tanto, debido a lo anteriormente mencionado y a que F_{ST} y R_{ST} son los índices más comúnmente reportados, la estimación y comparación de ambos es particularmente importante para la evaluación de la estructura genética de las poblaciones.

Los valores de P para F_{ST} y R_{ST} se obtuvieron con base en 20,000 permutaciones de haplotipos entre las poblaciones y su significancia fue evaluada mediante la corrección de Bonferroni secuencial, donde la hipótesis nula es: “no diferenciación entre poblaciones”. El valor de P de la prueba es la proporción de permutaciones que conducen a un valor de F_{ST} o R_{ST} mayor o igual al observado (Schneider *et al.*, 2000).

También se calculó el número absoluto de migrantes intercambiados entre pares de poblaciones (M) a partir de F_{ST} y R_{ST} mediante la fórmula:

$$M = 1 - ST / 2 ST$$

donde ST es el valor pareado de F_{ST} o R_{ST} , según sea el caso, y $M = 2Nm$ para poblaciones diploides.

Por último, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con base en F_{ST} y R_{ST} , el cual estima la partición de la varianza total en componentes de covarianza dados por las diferencias entre poblaciones y entre individuos dentro de las poblaciones; los niveles de significancia fueron determinados mediante una prueba no paramétrica de 20,000 permutaciones de genotipos entre poblaciones

7. RESULTADOS

7.1 Diversidad genética

7.1.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

En los resultados de la prueba de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus por población (Tabla 3), se observó que sólo los loci Ory21 (para Campeche y Yucatán) y Ory60 (para Campeche) presentaron poblaciones fuera de equilibrio con valores significativos ($P \leq 0.05$) debido a una deficiencia de heterócigos; ello implica que las frecuencias observadas difirieron significativamente de las frecuencias esperadas por lo que se rechaza la hipótesis nula. El resto de las poblaciones, para cada uno de los cinco loci, se encontraron en equilibrio de H-W. En cuanto a los valores de F_{IS} estimados con base en Weir y Cockerham (1984), variaron de -0.067 a 0.655, encontrándose valores negativos sólo para las poblaciones de Quintana Roo (en Ory16) y Campeche (en Ory40), lo que indica un exceso de heterócigos.

Respecto a la prueba de desviación del equilibrio de H-W para cada población considerando los cinco loci en conjunto (Tabla 4), dos de las cuatro poblaciones (Chiapas y Campeche) se encontraron fuera de equilibrio, ya que presentaron valores significativos ($P \leq 0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg y coeficientes de endogamia (F_{IS}) de Weir y Cockerham (W&C) para cada locus por población de *Oryzomys couesi*.

LOCUS		POBLACIONES			
		Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Ory16	<i>P</i>	0.136	0.336	1.00	0.422
	W&C	0.333	0.211	-0.067	0.239
Ory21	<i>P</i>	0.123	0.001	0.087	0.003
	W&C	0.263	0.423	0.294	0.208
Ory26	<i>P</i>	0.047	0.058	0.238	0.218
	W&C	0.655	0.322	0.407	0.1
Ory40	<i>P</i>	0.049	0.643	0.846	0.616
	W&C	0.362	-0.058	0.059	0.192
Ory60	<i>P</i>	0.196	0.001	0.046	0.414
	W&C	0.208	0.423	0.314	0.018

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

Tabla 4. Equilibrio de Hardy- Weinberg para cada población para los cinco loci estudiados de *Oryzomys couesi*.

POBLACIÓN	χ^2	g.l.	P
Chiapas	23.364	10	0.009
Campeche	39.736	10	0.001
Quintana Roo	14.289	10	0.162
Yucatán	20.536	10	0.040

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

7.1.2 Desequilibrio de ligamiento

Con el análisis de desequilibrio de ligamiento para cada par de loci por población (Tabla 5), se observó que de 40 comparaciones que eran posibles, sólo se pudieron realizar 28 (70%), de las cuales ninguna exhibió desequilibrio de ligamiento significativo ($P \leq 0.05$). Esto significa que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus, por lo que se acepta la hipótesis nula. Para las poblaciones de Quintana Roo y Yucatán, la comparación no fue posible en cuatro de 10 pares de loci (Ory16-Ory40, Ory21-Ory40, Ory26-Ory40 y Ory40-Ory60) ni para Chiapas tampoco en cuatro de 10 pares de loci (Ory16-Ory60, Ory21-Ory60, Ory26-Ory60 y Ory40-Ory60), dado que todas las sumas de las filas o columnas marginales de las tablas de contingencia fueron 1.

En cuanto al análisis de desequilibrio de ligamiento para cada par de loci considerando las cuatro poblaciones en conjunto (Tabla 6), se pudieron realizar el 100% de las comparaciones posibles (10 de 10), de las cuales tampoco ninguna mostró desequilibrio de ligamiento significativo.

Tabla 5. Desequilibrio de ligamiento observado para cada par de loci por población en *Oryzomys couesi*.

LOCI	POBLACIONES							
	Chiapas		Campeche		Quintana Roo		Yucatán	
	P	E.S	P	E.S	P	E.S	P	E.S
Ory16-Ory21	1	0	1	0	0.303	0.007	1	0
Ory16-Ory26	0.388	0.011	0.867	0.012	1	0	0.599	0.014
Ory21-Ory26	0.635	0.014	1	0	1	0	0.864	0.01
Ory16-Ory40	1	0	1	0	---	---	---	---
Ory21-Ory40	1	0	1	0	---	---	---	---
Ory26-Ory40	0.916	0.006	1	0	---	---	---	---
Ory16-Ory60	---	---	1	0	1	0	1	0
Ory21-Ory60	---	---	1	0	1	0	1	0
Ory26-Ory60	---	---	0.32	0.237	1	0	1	0
Ory40-Ory60	---	---	1	0	---	---	---	---

Tabla 6. Desequilibrio de ligamiento para cada par de loci de *Oryzomys couesi* para las cuatro poblaciones estudiadas.

LOCI	χ^2	g.l.	P
Ory16-Ory21	2.388	8	0.967
Ory16-Ory26	3.2	8	0.921
Ory21-Ory26	1.199	8	0.997
Ory16-Ory40	0	4	1
Ory21-Ory40	0	4	1
Ory26-Ory40	0.173	4	0.996
Ory16-Ory60	0	6	1
Ory21-Ory60	0	6	1
Ory26-Ory60	2.278	6	0.892
Ory40-Ory60	0	2	1

7.1.3 Distribuciones y frecuencias alélicas

Se observaron un total de 56 alelos para los cinco loci utilizados en el presente trabajo (Tabla 7), encontrándose un alto número de alelos por locus: 9 para Ory16, 14 para Ory21, 10 para Ory26 y Ory40 y 13 para Ory60 (Figuras 2 a 6).

El locus Ory16 presentó un único alelo exclusivo (presente en una sola población), mientras que en el locus Ory26 se encontró la mayor cantidad de alelos exclusivos (7 alelos). Para Ory21 se observaron cuatro alelos exclusivos y los loci Ory40 y Ory60 presentaron el mismo número de alelos exclusivos (3). Ory60 fue el locus con mayor número de alelos comunes (5), es decir, presentes en las cuatro poblaciones, mientras que nuevamente Ory16 fue el que menor cantidad de alelos comunes presentó (1 alelo).

De los 18 alelos exclusivos encontrados, sólo el alelo "94" de Ory16 tuvo una frecuencia mayor a 0.1 (0.136), mientras que los 17 alelos restantes tuvieron frecuencias bajas (< 0.1). Chiapas fue la población con mayor número de alelos exclusivos (6) y Quintana Roo fue la que menor número de alelos exclusivos presentó (2 alelos).

Tabla 7. Frecuencias alélicas observadas para cinco loci de microsatélites en las cuatro poblaciones de *Oryzomys couesi*.

LOCUS	ALELO (pb)	POBLACIONES			
		Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Ory16	1 (091)	0.227	0.182	0	0
	2 (094)	0.136	0	0	0
	3 (097)	0.091	0.045	0	0.05
	4 (100)	0.045	0.045	0	0
	5 (103)	0.136	0.045	0	0.15
	6 (106)	0.364	0.545	0.8	0.35
	7 (109)	0	0	0.1	0.3
	8 (112)	0	0.091	0	0.15
	9 (115)	0	0.045	0.1	0

Tabla 7. (Continuación).

LOCUS	ALELO (pb)	POBLACIONES			
		Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Ory21	1 (151)	0.364	0.091	0.1	0.15
	2 (154)	0.045	0.045	0	0
	3 (160)	0.045	0	0	0
	4 (163)	0.045	0	0	0
	5 (169)	0	0.091	0	0
	6 (172)	0.091	0.182	0.2	0.3
	7 (175)	0.045	0.091	0.4	0.1
	8 (178)	0.136	0.045	0	0.15
	9 (181)	0.091	0.091	0.2	0.1
	10 (184)	0.091	0.091	0	0
	11 (187)	0	0.045	0	0.1
	12 (190)	0	0.045	0.1	0.05
	13 (196)	0.045	0.182	0	0
	14 (199)	0	0	0	0.05
Ory26	1 (097)	0.864	0.682	0.2	0.75
	2 (100)	0.091	0.136	0.6	0.05
	3 (103)	0	0	0	0.05
	4 (106)	0	0.045	0	0.1
	5 (109)	0	0	0	0.05
	6 (115)	0	0	0.1	0
	7 (124)	0.045	0	0	0
	8 (127)	0	0.091	0	0
	9 (130)	0	0	0.1	0
	10 (133)	0	0.045	0	0
Ory40	1 (127)	0.136	0.091	0	0
	2 (130)	0.045	0	0	0
	3 (133)	0.182	0.136	0	0.1
	4 (136)	0.227	0.045	0.2	0.05
	5 (139)	0.273	0.318	0.3	0.15
	6 (142)	0	0.136	0.1	0.15
	7 (145)	0	0.136	0.3	0.25
	8 (148)	0.136	0.091	0.1	0.25
	9 (151)	0	0.045	0	0
	10 (157)	0	0	0	0.05
Ory60	1 (126)	0.045	0.091	0.1	0
	2 (129)	0.045	0	0	0.05
	3 (135)	0.091	0.045	0.1	0.1
	4 (138)	0.182	0.136	0	0.1
	5 (141)	0.045	0.091	0	0.1
	6 (144)	0.045	0.182	0.1	0.2
	7 (147)	0.227	0.091	0.2	0.05
	8 (150)	0.136	0.045	0	0.1
	9 (153)	0.091	0.136	0.4	0.2
	10 (156)	0.045	0.091	0.1	0.05
	11 (159)	0	0	0	0.05
	12 (165)	0	0.091	0	0
	13 (168)	0.045	0	0	0

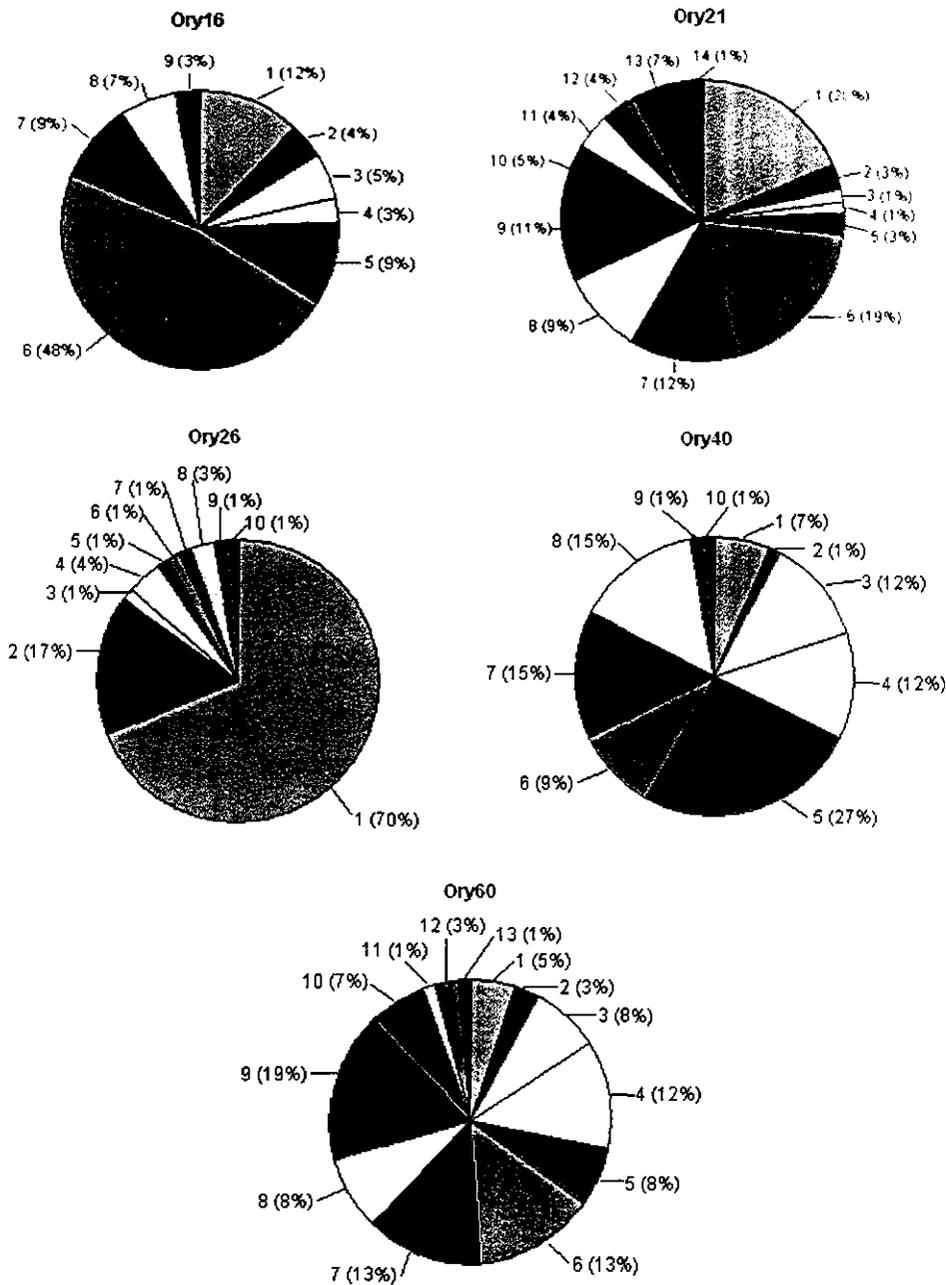


Figura 2. Frecuencias alélicas para los cinco loci en las cuatro poblaciones de *Oryzomys couesi*.

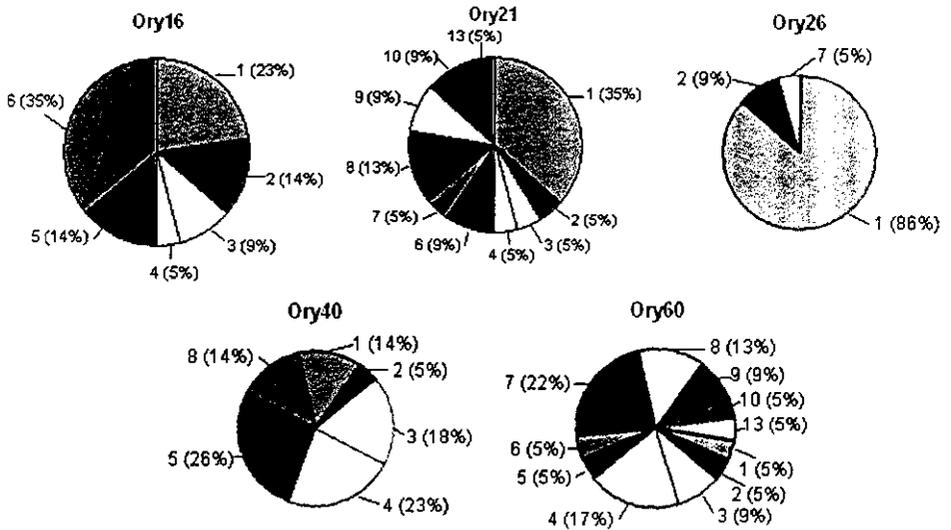


Figura 3. Frecuencias alélicas para Chiapas en cada uno de los cinco loci.

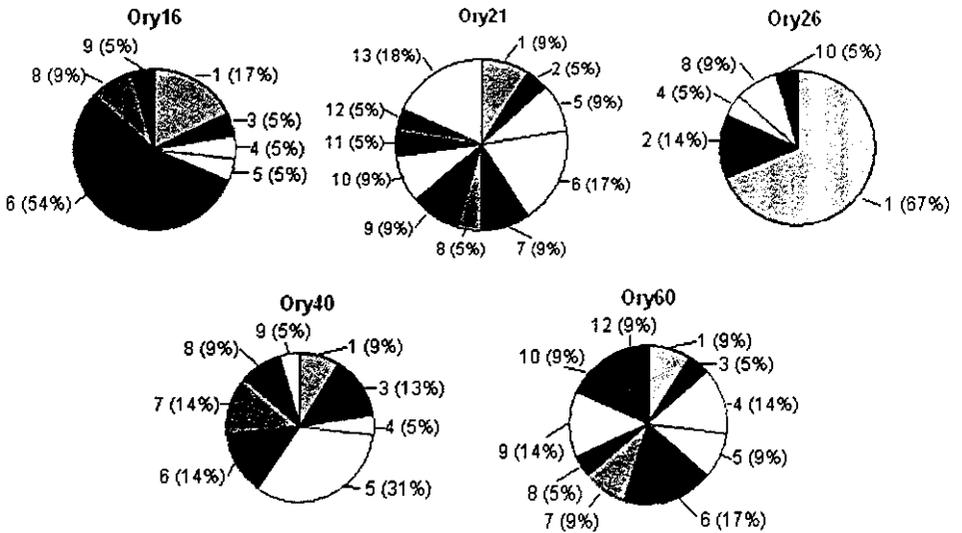


Figura 4. Frecuencias alélicas para Campeche en cada uno de los cinco loci.

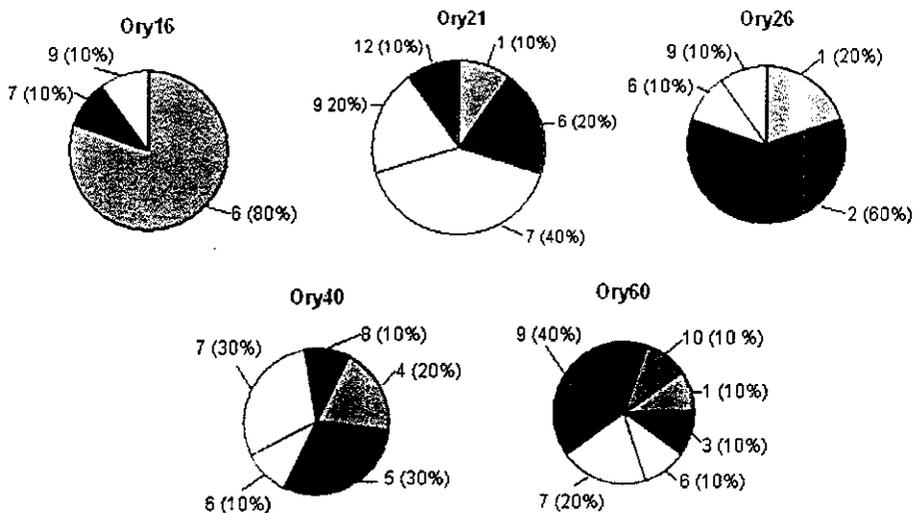


Figura 5. Frecuencias alélicas para Quintana Roo en cada uno de los cinco loci.

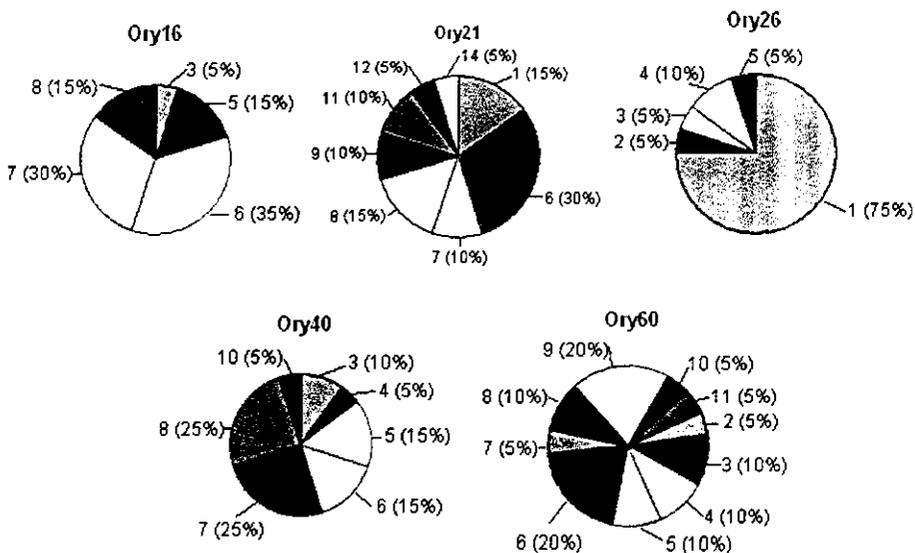


Figura 6. Frecuencias alélicas para Yucatán en cada uno de los cinco loci.

Respecto a los resultados de diferenciación alélica entre pares de poblaciones para cada locus (Tabla 8), se observa que la distribución de los alelos tiende a ser homogénea entre las poblaciones. Para Ory 26, el 50% de las comparaciones (3 de 6) fueron significativas ($P \leq 0.05$), es decir, que la distribución alélica en cada par de poblaciones es heterogénea. En Ory16 el 33% de las comparaciones (2 de 6) fueron significativas, mostrando heterogeneidad en la distribución de los alelos. Para Ory21, Ory60 y Ory40 ninguna de las 6 comparaciones resultó significativa, lo que representa una distribución alélica homogénea a lo largo de las poblaciones.

De un total de seis comparaciones, considerando los cinco loci para cada par de poblaciones (Tabla 9), sólo dos (Chiapas-Quintana Roo y Chiapas-Yucatán) resultaron ser significativas ($P \leq 0.05$) mostrando una distribución heterogénea de los alelos.

Tabla 8. Diferenciación alélica observada para cada par de poblaciones por locus en *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	LOCI									
	Ory16		Ory21		Ory26		Ory40		Ory60	
	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S
Chiapas-Campeche	0.348	0.006	0.322	0.008	0.342	0.006	0.182	0.005	0.667	0.006
Chiapas-Quintana Roo	0.042	0.002	0.095	0.005	0.001	0.001	0.9	0.003	0.555	0.006
Chiapas-Yucatán	0.002	0.001	0.229	0.007	0.349	0.005	0.01	0.001	0.627	0.007
Campeche-Quintana Roo	0.485	0.008	0.569	0.006	0.004	0.001	0.734	0.004	0.764	0.004
Campeche-Yucatán	0.011	0.001	0.413	0.007	0.526	0.005	0.535	0.006	0.871	0.004
Quintana Roo-Yucatán	0.09	0.004	0.516	0.005	0.001	0.001	0.713	0.004	0.666	0.006

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

Tabla 9. Diferenciación alélica para cada par de poblaciones de *Oryzomys couesi* considerando los cinco loci estudiados.

POBLACIONES	χ^2	g.l.	<i>P</i>
Chiapas-Campeche	10.726	10	0.379
Chiapas-Quintana Roo	33.279	10	0.001
Chiapas-Yucatán	27.027	10	0.002
Campeche-Quintana Roo	14.638	10	0.156
Campeche-Yucatán	13.539	10	0.195
Quintana Roo-Yucatán	22.261	10	0.013

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

7.1.4 Distribuciones y frecuencias genotípicas

En total se observaron 100 genotipos para los cinco loci de *O. couesi* estudiados (Tabla 10). El locus Ory26 fue el que presentó el menor número de genotipos (11), sin embargo, también fue el locus con mayor porcentaje de genotipos heterocigos (82%). El genotipo "97-97" fue el más común al presentarse en todas las poblaciones y en el 57% del total de individuos analizados (37). Ory40 fue el locus con el segundo mayor porcentaje de genotipos heterocigos (76%), ya que de los 21 genotipos que presentó, 16 fueron heterocigos. Los genotipos "139-145" y "139-148" fueron los más comunes al encontrarse en tres de las cuatro poblaciones.

Ory60 fue el locus que presentó el mayor número de genotipos (27), de los cuales el 74% (20 genotipos) fueron heterocigos. El genotipo más común fue "144-153" al presentarse en tres de las cuatro poblaciones y en el 14% de los 37 individuos analizados. El locus Ory21 fue el segundo con mayor número de genotipos al presentar 24 genotipos de los cuales el 71% (17 genotipos), fueron heterocigos. El genotipo "172-172" fue el más frecuente al encontrarse en el 11% de los 37 individuos analizados, sin embargo, ningún genotipo estuvo presente en más de dos poblaciones.

Para Ory16 se observaron un total de 17, genotipos de los cuales 12 (71%) fueron heterocigos. El genotipo más frecuente fue "106-106", ya que se encontró en el 30% de los 37 individuos analizados y en las cuatro poblaciones.

Respecto a la diferenciación genotípica entre pares de poblaciones para cada locus (Tabla 11), se observa que la distribución de los genotipos entre las poblaciones tiende a ser muy homogénea, ya que ninguna de las seis comparaciones en los loci Ory21, Ory26, Ory40 y Ory60 resultó ser significativa ($P \leq 0.05$). Ory16 (con una comparación significativa para Chiapas-Yucatán) fue el único locus en presentar poblaciones con distribución genotípica heterogénea.

Siguiendo la misma tendencia, ninguna de las seis comparaciones considerando los cinco loci para cada par de poblaciones (Tabla 12) resultó ser significativa, por lo que la distribución de los genotipos es la misma a lo largo de las poblaciones.

Tabla 11. Diferenciación genotípica observada para cada par de poblaciones por locus en *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	LOCI									
	Ory16		Ory21		Ory26		Ory40		Ory60	
	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S	<i>P</i>	E.S
Chiapas-Campeche	0.456	0.005	0.709	0.005	0.412	0.004	0.194	0.004	0.893	0.003
Chiapas-Quintana Roo	0.053	0.002	0.326	0.006	0.012	0.001	0.124	0.003	0.751	0.004
Chiapas-Yucatán	0.008	0.001	0.414	0.005	0.55	0.004	0.029	0.001	0.789	0.004
Campeche-Quintana Roo	0.388	0.005	0.799	0.004	0.056	0.002	0.717	0.004	0.949	0.002
Campeche-Yucatán	0.035	0.001	0.663	0.005	0.59	0.004	0.598	0.005	0.95	0.001
Quintana Roo-Yucatán	0.117	0.003	0.563	0.005	0.011	0.001	0.715	0.004	0.627	0.005

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

Tabla 12. Diferenciación genotípica para cada par de poblaciones de *Oryzomys couesi* para los cinco loci estudiados.

POBLACIONES	χ^2	g.l	<i>P</i>
Chiapas-Campeche	7.521	10	0.675
Chiapas-Quintana Roo	21.589	10	0.017
Chiapas-Yucatán	19.964	10	0.029
Campeche-Quintana Roo	8.866	10	0.544
Campeche-Yucatán	9.662	10	0.47
Quintana Roo-Yucatán	16.036	10	0.098

7.1.5 Heterocigosidad

Se observó un alto grado de diversidad genética dentro de las poblaciones tanto en términos de número de alelos observados por población, como en valores de heterocigosidad observada y esperada (Tabla 13). Los cinco loci fueron 100% polimórficos para las cuatro poblaciones de *O. couesi*. El mayor número promedio de alelos observados y efectivos por locus se presentó en la población de Campeche (8.2 y 5.6, respectivamente), mientras que el menor número promedio se observó en Quintana Roo (4.6 y 3.2, respectivamente), con una media de 11.2 y 5.9 considerando el total de las poblaciones. Los valores de heterocigosidad observada para cada población por locus variaron de 0.363 para Campeche en Ory26 a 0.9 para Campeche y Yucatán en Ory40 y Ory60 respectivamente, siendo Yucatán la población con mayor heterocigosidad promedio observada (0.66).

En cuanto a la heterocigosidad promedio esperada de Levene y Nei, los valores se encontraron entre 0.706 y 0.636 (Quintana Roo) a 0.785 y 0.749 (Campeche), respectivamente; mientras que para el total de las poblaciones considerando los cinco loci, la heterocigosidad promedio esperada fue de 0.779 y 0.769, respectivamente.

Ory26 fue el locus con menor heterocigosidad observada (0.297) y esperada (0.502), mientras que Ory40 y Ory60 fueron los loci con mayor diversidad.

Tabla 13. Valores de diversidad genética para cada población por locus y para el total de las poblaciones por locus de *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	LOCI					Media	H_{Nei}	n	n_a	n_e	
	Ory16	Ory21	Ory26	Ory40	Ory60						
Chiapas	H_O	0.545	0.636	0.09	0.545	0.727	0.509	0.699	11	7.2	4.7
	H_E	0.805	0.852	0.255	0.839	0.909	0.732				
Campeche	H_O	0.545	0.545	0.363	0.909	0.545	0.581	0.749	11	8.2	5.6
	H_E	0.684	0.926	0.528	0.861	0.926	0.785				
Quintana Roo	H_O	0.400	0.600	0.400	0.800	0.600	0.560	0.636	5	4.6	3.2
	H_E	0.377	0.822	0.644	0.844	0.844	0.706				
Yucatán	H_O	0.600	0.700	0.400	0.700	0.900	0.660	0.735	10	7	4.9
	H_E	0.778	0.873	0.442	0.857	0.915	0.773				
Total	H_O	0.54	0.621	0.297	0.729	0.702	0.578	0.769	37	11.2	5.9
	H_E	0.743	0.892	0.502	0.857	0.903	0.779				

H_O : Heterocigosidad observada. H_E : Heterocigosidad esperada de Levene. H_{Nei} : Heterocigosidad promedio esperada de Nei. n: Tamaño de muestra. n_a : Número promedio de alelos observados. n_e : Número promedio de alelos efectivos.

7.2 Estructura genética y diferenciación entre poblaciones.

En los resultados de distancia genética se observó que las poblaciones que mayor divergencia mostraron fueron Chiapas-Quintana Roo (0.584), mientras que las poblaciones que presentaron los valores más bajos fueron Chiapas-Campeche (0.091) y Yucatán-Campeche (0.101), a pesar de tener éstas el tercer y cuarto valor más alto, respectivamente, en cuanto a distancia geográfica se refiere (Tabla 14).

Tabla 14. Distancias genéticas de Nei (abajo de la diagonal) y distancias geográficas en km (arriba de la diagonal) entre poblaciones de *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Chiapas	-	448.4	602.3	795.3
Campeche	0.091	-	254.3	346.8
Quintana Roo	0.584	0.283	-	328.7
Yucatán	0.172	0.101	0.433	-

Los resultados de la prueba de Mantel, mostraron que no existe una correlación estadísticamente significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para las poblaciones de *O. couesi* ($r = 0.044$, $P = 0.458$). Esto puede observarse claramente en el árbol de Neighbor-joining (Fig. 7), donde se observa que las poblaciones de Chiapas, Yucatán y Campeche formaron un agrupamiento distanciado genéticamente de Quintana Roo, debido a que los valores de distancia genética pareados de esta población con el resto fueron los más altos.

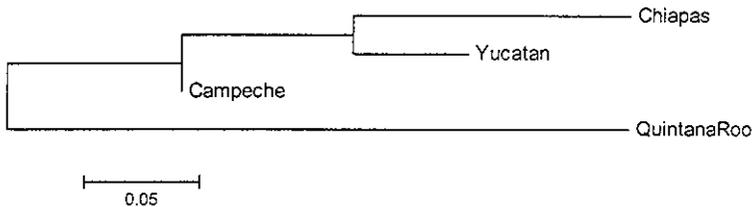


Figura 7. Árbol construido por el método de Neighbor-joining utilizando distancias genéticas de Nei (1978) entre las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

Los valores pareados de F_{ST} (Tabla 15) variaron de 0.005 (Campeche-Yucatán) a 0.135 (Chiapas-Quintana Roo), y sólo dos de seis comparaciones (33%) fueron significativas ($P \leq 0.05$) donde se rechaza la hipótesis nula de "no diferenciación entre poblaciones"; mientras que los valores pareados de R_{ST} (Tabla 16) variaron de -0.042 (Campeche-Quintana Roo) a 0.163 (Chiapas-Yucatán), pero ninguna de las seis comparaciones fue significativa después de aplicar la corrección de Bonferroni secuencial. De acuerdo a la interpretación sugerida para F_{ST} (Wright, 1978; Balloux y Lugon-Moulin, 2002), valores de 0 a 0.05 representan poca diferenciación genética, de 0.05 a 0.15 representan una diferenciación genética moderada y de 0.15 a 0.25 representan una alta diferenciación genética. Por lo que las poblaciones que presentaron valores significativos, Quintana Roo-Yucatán y Chiapas-Quintana Roo, muestran una diferenciación genética moderada.

El número de migrantes intercambiados entre poblaciones, estimado con base en F_{ST} (Tabla 15), varió de 3.336 (Quintana Roo-Chiapas) a 94.482 (Yucatán-Campeche); mientras que para R_{ST} (Tabla 16) varió de 2.56 (Yucatán-Chiapas) a 68.13 (Yucatán-Campeche). Algunos valores de M no pudieron estimarse debido a que los valores de R_{ST} fueron negativos, por lo que no hay diferenciación entre las poblaciones y el número de migrantes estimado es infinito.

Tabla 15. Valores pareados de F_{ST} (abajo de la diagonal) y número de migrantes M (arriba de la diagonal) entre las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Chiapas	-	63.222	3.336	15.478
Campeche	0.007	-	8.915	94.482
Quintana Roo	0.135	0.053	-	5.145
Yucatán	0.031	0.005	0.088	-

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

Tabla 16. Valores pareados de R_{ST} (abajo de la diagonal) y número de migrantes M (arriba de la diagonal) entre las poblaciones de *O. couesi*.

POBLACIONES	Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Chiapas	-	4.028	3.009	2.56
Campeche	0.114	-	x	68.13
Quintana Roo	0.142	-0.042	-	x
Yucatán	0.163	0.007	-0.024	-

x : valores de M que no pudieron calcularse porque $R_{ST} \leq 0$

El análisis de varianza molecular (AMOVA) con base en valores de F_{ST} , mostró que el mayor porcentaje de la diversidad se atribuye a la variación dentro de las poblaciones (96%), mientras que la variación entre las poblaciones fue baja (4%) pero estadísticamente significativa junto con el índice de diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} : P = 0.022$) (Tabla 17).

En concordancia con los resultados anteriores, el análisis de varianza molecular con base en valores de R_{ST} mostró que el mayor porcentaje de la diversidad es explicada por la variación dentro de las poblaciones (92%), mientras que, nuevamente, la variación entre las poblaciones fue baja (8%) pero estadísticamente significativa junto con el índice de diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} : P = 0.038$) (Tabla 18).

Tabla 17. Análisis de varianza molecular con base en valores de F_{ST} para las cuatro poblaciones de *Oryzomys couesi* estudiadas.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
ENTRE poblaciones	3	9.952	0.07903 Va	4.01
DENTRO de poblaciones	70	132.332	1.89045 Vb	95.99
Total	73	142.284	1.96949	

Índice de fijación $F_{ST} = 0.04013$ $F_{ST} : P = 0.022$

Tabla 18. Análisis de varianza molecular con base en valores de R_{ST} para las cuatro poblaciones de *Oryzomys couesi* estudiadas.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
ENTRE poblaciones	3	3024.273	33.94894 Va	7.91
DENTRO de poblaciones	70	27662.241	395.17487 Vb	92.09
Total	73	30686.514	429.12381	

Índice de fijación $F_{ST} = 0.07911$ $F_{ST} : P = 0.038$

Puesto que la escala elegida para el estudio se basó en la división política de la región, se optó por hacer una nueva agrupación de las muestras con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta, para observar si los resultados se mantenían. Las localidades pertenecientes a Yucatán y Campeche ubicadas a lo largo de la costa se agruparon como la población "Golfo de México"(localidades 1-3, 9-12), los sitios de Quintana Roo y la muestra de Calakmul, Campeche, se agruparon como la población "Caribe" (localidades 4-8), mientras que los sitios de colecta de Chiapas se dividieron en las poblaciones de "Selva" (localidades 13, 15, 17-18, 20) y "Pacífico" (localidades 14, 16, 19) (Fig. 1).

Se estimó la distancia genética no sesgada de Nei (1978) (Tabla 19) y el índice F_{ST} (Tabla 20) para cada par de poblaciones (se aplicó la corrección de Bonferroni secuencial correspondiente). Las poblaciones que mostraron los valores más altos de distancia genética fueron Selva-Caribe (0.523) y Pacífico-Caribe (0.421), mientras que las poblaciones con menor divergencia fueron Golfo de México-Selva (0.099).

Tabla 19. Distancias genéticas de Nei entre poblaciones de *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	Selva	Pacífico	Caribe	Golfo de México
Selva	-			
Pacífico	0.227	-		
Caribe	0.523	0.421	-	
Golfo de México	0.099	0.313	0.269	-

Los valores pareados de F_{ST} variaron de 0.013 (Golfo de México-Selva) a 0.126 (Selva-Caribe), y no fueron significativos excepto para las poblaciones de Selva-Caribe y Golfo de México-Caribe, las cuales presentaron una diferenciación genética moderada.

Tabla 20. Valores pareados de F_{ST} entre las poblaciones de *Oryzomys couesi*.

POBLACIONES	Selva	Pacífico	Caribe	Golfo de México
Selva	-			
Pacífico	0.268	-		
Caribe	0.126	0.083	-	
Golfo de México	0.130	0.042	0.056	-

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

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se observó una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg (H-W) para las poblaciones de Chiapas y Campeche debido a una deficiencia de heterócigos, mientras que Quintana Roo y Yucatán se encontraron en equilibrio. En general, se presentó una tendencia hacia un déficit de heterócigos en todos los loci, dado que todos los coeficientes de endogamia (F_{IS}) fueron positivos, excepto para las poblaciones de Quintana Roo (en Ory16) y Campeche (en Ory40).

Una causa común de la deficiencia de heterócigos es la presencia de alelos nulos. Estos alelos no amplifican al realizar el PCR, ya sea porque las condiciones del PCR no son las ideales, o porque la región del cebador en el locus presenta mutaciones que inhiben la unión. Como resultado, algunos heterócigos son registrados como homócigos ya que algunos alelos no amplifican en ciertos individuos (Ehrich y Stenseth, 2001; Selkoe y Toonen, 2006). Sin embargo, debido a que la deficiencia de heterócigos no fue observada para un locus en particular, ésta no puede atribuirse a la presencia de alelos nulos.

Alternativamente, cuando grupos de individuos o poblaciones que son genéticamente distintos (porque aunque están espacialmente cercanos no se entrecruzan, o porque la escala espacial elegida para el análisis es más grande que la escala real de la población) se incluyen dentro de una sola muestra, habrá más homócigos que los esperados bajo el equilibrio de H-W. Este fenómeno recibe el nombre de "efecto Wahlund" y también es una causa común de la deficiencia de heterócigos (Trizio *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006). Dado que se obtuvo un tamaño de muestra pequeño para los sitios de colecta del presente estudio, las muestras fueron agrupadas según la división política de la región, es decir, en estados. Sin embargo, tanto en Campeche como Chiapas, dos y tres de las localidades muestreadas, respectivamente, se encuentran más alejadas de las otras localidades del mismo estado, e incluso separadas por barreras geográficas, por lo que el desequilibrio en ambas poblaciones podría deberse al efecto Wahlund (i.e., las poblaciones se encuentran subdivididas). Con base en los valores de F_{IS} , se encontró un nivel de endogamia bajo en las poblaciones de *O. couesi*, ya que de existir un apareamiento no aleatorio consistente, éste se vería reflejado en un desequilibrio de ligamiento significativo a lo largo de todos los pares de loci (Hartl y Clark, 1997), lo cual no se observa en los resultados, ya que ninguno de los loci presentó ligamiento.

A pesar de tener un tamaño de muestra pequeño, todas las poblaciones de *O. couesi* presentaron valores altos de diversidad genética. Todos los loci fueron 100% polimórficos y el número promedio de alelos observados fue alto (11.2). La población con mayor número de alelos raros fue Chiapas (6), seguida por Yucatán y Campeche con 5 alelos cada una; mientras que Quintana Roo fue la que presentó menor número de alelos raros (2). La heterocigosidad observada fue alta (0.578 en promedio), y no varió significativamente entre las poblaciones (de 0.509 a 0.660). Yucatán fue la

población con el valor promedio más alto y Quintana Roo, pese a tener el menor tamaño de muestra, no presentó el valor promedio más bajo.

Los valores de heterocigosidad esperada (la cual es menos sensible al tamaño de muestra que la heterocigosidad observada) también fueron altos (de 0.706 a 0.785) y son comparables con los encontrados para roedores múridos amenazados (*O. couesi cozumelae*, $H_E = 0.639-0.792$, Vega, 2006; *Microtus oeconomus*, $H_E = 0.570-0.760$, Van de Zande *et al.*, 2000; *Oryzomys argentatus*, $H_E = 0.540-0.760$, Wang *et al.*, 2005), pero menores que los de roedores múridos no amenazados (*Microtus montebelli*, $H_E = 0.778-0.914$, Ishibashi *et al.*, 1999; *Peromyscus leucopus*, $H_E = 0.810-0.940$, Mossman y Waser, 2001).

Se encontró estructuración en las poblaciones de *O. couesi*, aunque no como inicialmente se esperaba. No hubo correlación entre la distancia geográfica y la genética y Quintana Roo presentó los valores más altos de distancia genética con respecto al resto de las poblaciones. En concordancia con lo anterior, se observó que Quintana Roo difiere significativamente de Chiapas y Yucatán con base en los valores de F_{ST} , no así para los valores de R_{ST} donde ninguna de las comparaciones fue significativa y dos resultaron negativas. Debido a lo anterior y dadas las características del presente trabajo (tamaños de muestra pequeños y cinco loci analizados), la discusión se realiza considerando los valores de F_{ST} , con base en la recomendación de Gaggiotti y colaboradores (1999).

La dinámica poblacional de *O. couesi* debe estar relacionada con la alta diversidad encontrada para la especie. Los cambios ambientales a lo largo del año comúnmente afectan las densidades poblacionales, haciendo que éstas aumenten o disminuyan durante las épocas de lluvias y secas, respectivamente. Ello afecta los niveles de diversidad genética, de manera que disminuye el número de heterocigos y aumentan los niveles de endogamia (Vázquez-Domínguez *et al.*, 1999). Se ha observado que los tamaños poblacionales de *O. couesi* en el sur de Texas y en la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala presentan amplias variaciones tanto temporal como espacialmente, pudiendo llegar a extinguirse durante la época de secas (Schmidt y Engstrom, 1994; López y Medellín, 2005). Además, en la península de Yucatán son muy frecuentes las tormentas tropicales y huracanes, los cuales generan cambios dramáticos en la composición y estructura de la vegetación y por ende en las comunidades de animales asociadas. Sin embargo, parece que no hay diferencias estacionales significativas entre la actividad e inactividad reproductiva de los individuos, por lo que, al existir la posibilidad de reproducirse durante todo el año, la reducción anual de las poblaciones de *O. couesi* en la península podría no ser lo suficientemente drástica como para producir un cuello de botella, evitándose así la pérdida de alelos, tal como lo observó Vega (2006) para las poblaciones de *O. couesi cozumelae*. Cabe mencionar que sería interesante evaluar la diversidad genética de estas poblaciones antes y después del paso de un huracán.

La fragmentación del hábitat es uno de los principales factores que influyen en la pérdida de variabilidad genética, puesto que casi siempre conduce a la reducción del tamaño poblacional, lo que incrementa el efecto de la deriva génica y la diferenciación entre las poblaciones (Amos y Harwood, 1998). Sin embargo, las consecuencias de la fragmentación pueden variar dependiendo del uso del hábitat, así como de las características de conducta y dispersión del organismo en cuestión. A pesar de que la península ha perdido gran parte de su cobertura vegetal, por lo que se encuentra considerablemente fragmentada, el hecho de que las poblaciones de *O. couesi* presenten altos valores de diversidad sugiere que ha existido (y probablemente siga habiendo) conexión entre ellas. Además se ha observado que, en general, los mamíferos pequeños y especialmente los roedores, parecen adaptarse más fácilmente a ecosistemas que presentan ciertos grados de perturbación (Medellín y Equihua, 1998). *O. couesi* está considerada como una especie oportunista, que puede adaptarse a ambientes perturbados como cultivos de arroz y caña de azúcar, y se ha sugerido que presenta una gran capacidad de dispersión (Schmidt y Engstrom, 1994; Ceballos y Miranda, 2000).

Esto podría explicar los bajos valores de F_{ST} y el alto número de migrantes observados entre Chiapas, Yucatán y Campeche, ya que el movimiento de individuos y el flujo génico entre estas poblaciones evitarían su diferenciación. Sin embargo, es de llamar la atención los valores de diferenciación relativamente altos encontrados para Quintana Roo, sobre todo con respecto a Yucatán, ya que la península forma una amplia semiplanicie que se caracteriza por la ausencia de elevaciones considerables que pudieran actuar como barreras geográficas. Por esta razón, se decidió hacer la nueva agrupación de las muestras con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta. Se evaluó la estructura genética de estas poblaciones y los resultados concordaron con los obtenidos previamente, ya que Quintana Roo, que representa la mayor parte de la población Caribe, fue de nuevo la población más diferenciada. Es interesante señalar que la población Pacífico también mostró diferenciación genética, incluso con respecto a la población Selva, lo cual puede deberse a la presencia de barreras geográficas dada la orografía del estado de Chiapas, donde destacan las montañas del norte de Chiapas y la Sierra Madre de Chiapas, la cual tiene su punto más elevado en el volcán Tacaná (4080 msnm). Este patrón de diferenciación se ha observado para especies del género *Tylomys* (Espinoza *et al.*, 2006).

Asimismo, Vega (2006) analizó la filogeografía de la población de *O. couesi* de la isla Cozumel con respecto a las poblaciones de Campeche y Chiapas, utilizando el gen mitocondrial citocromo *b*. Observó que los individuos de Chiapas provenientes de la costa del Pacífico fueron los más distanciados genéticamente de las muestras de Cozumel y Campeche, y concluyó que el origen más probable de la población de la isla se encuentra en la península de Yucatán.

Aunado a la posible mayor vagilidad de *O. couesi*, la poca diferenciación encontrada entre Chiapas (Selva), Campeche y Yucatán (Golfo de México) puede estar ligada a la presencia de un

hábitat relativamente continuo entre la parte sureste de Chiapas y el sur de Campeche, con el departamento del Petén, Guatemala. El Petén, ubicado al norte del país, es el departamento o estado más grande, puesto que abarca alrededor de la tercera parte del territorio guatemalteco. Representa una enorme semiplanicie (hay pocas elevaciones, ninguna mayor a los 500 o 600 msnm) que alberga la porción más grande y continua de bosque tropical, al norte del Amazonas. Hasta 1970, cerca del 90% de la región estaba cubierta por áreas de bosque bien conservados. Ello está relacionado con las características del área, que limitan el establecimiento de la gente: clima muy cálido y húmedo, escasez de cuerpos de agua durante la mayor parte del año y falta de caminos. Además, la región se convirtió en la base de las guerrillas rebeldes durante los casi 40 años de la guerra civil, lo cual, irónicamente, ayudó a preservar la mayor parte de la vegetación original del Petén (Beletsky, 1999). De esta forma, el mayor conjunto de áreas naturales protegidas de bosque tropical en Mesoamérica está conformado por la Reserva de la Biosfera Calakmul, en el sur de Campeche, la Reserva de la Biosfera Maya, en el norte del Petén y la Reserva de la Biosfera Montes Azules en el noreste de Chiapas (Estrada *et al.*, 2004). Puede sugerirse entonces que la conexión de estas áreas aumenta la posibilidad de intercambio genético, al menos histórico, entre las poblaciones de *O. couesi*. Asimismo, los resultados observados con las poblaciones iniciales, así como las basadas en el tipo de vegetación, son congruentes con lo encontrado para la distribución de la variabilidad genética: el mayor porcentaje de variación está distribuido dentro de las poblaciones –debido a los altos niveles de diversidad genética de los individuos– y un porcentaje pequeño, pero significativo, distribuida entre las poblaciones.

Podría pensarse que la península de Yucatán muestra una notoria homogeneidad en cuanto a la percepción genérica de sus rasgos y componentes naturales, sin embargo, esta sencillez ambiental no es más que una engañosa apariencia, detrás de la cual se esconden una variedad de formas de expresión y dinámica particular de cada rasgo o componente natural considerado. Esto se debe a la presencia en la península de un gradiente latitudinal, uno de temperatura y uno de humedad, mismos que a su vez la definen como una unidad ambiental que se distingue de aquellas otras que la rodean (Orellana *et al.*, 2003; Arita y Vázquez-Domínguez, 2003). La variación en la precipitación pluvial a lo largo de la península es un factor decisivo para la presencia de distintas especies que conforman los diversos tipos de vegetación. Otro factor fundamental es el suelo, en la península existen dos tipos: los no inundables y los inundables, estos últimos permanentes o temporales. La península tiene un marcado gradiente pluviométrico, ya que recibe 2000 mm de lluvia anual hacia el sur-suroeste, disminuyendo esta cantidad hacia la parte noroeste de Yucatán (Sisal-Progreso), hasta llegar a los 500 mm o menos de lluvia anual, haciendo de esta zona la más árida de la península, donde marzo y abril son los meses más secos. Por otro lado, hacia el este de Yucatán se encuentra una zona de transición entre los climas semiáridos y húmedos, con un clima del tipo cálido-subhúmedo en el

sureste de Campeche y la mayor parte de Quintana Roo, mientras que el suroeste de Campeche y la franja entre Sian Ka'an y la bahía de Chetumal en Quintana Roo presentan el clima más cálido y húmedo de la región (Espejel, 1987; Turner *et al.*, 2001; Orellana *et al.*, 2003). Por estas razones, también puede observarse una variación en los tipos de vegetación que abarca desde las selvas altas perennifolias en el extremo sur de la península, hasta las selvas bajas caducifolias en el norte y noroeste de Yucatán, pasando por las selvas medianas subperennifolias (en la mayor parte del territorio de Campeche y Quintana Roo) (Carnevali *et al.*, 2003; Orellana *et al.*, 2003). Dado que las muestras de Yucatán provienen de localidades ubicadas a lo largo de la costa del estado, los gradientes observados tanto en el clima como en la estructura de la vegetación pudieran representar barreras para la dispersión de los individuos de *O. covesi*, disminuyendo el flujo génico y favoreciendo la diferenciación entre las poblaciones de Quintana Roo y Yucatán, cada una de las cuales parecieran (bajo estas condiciones) estar ubicadas en los extremos de un conjunto de componentes naturales que, a su vez, muestran atributos que les son propios al territorio de la península de Yucatán.

Cabe señalar que Quintana Roo representa el área de mayor susceptibilidad a los huracanes, cuya presencia y frecuencia ha tenido gran influencia en la dinámica ecológica (regeneración después del huracán) y la estructura biológica (especies presentes) de la vegetación en el estado (Espejel, 1987). Aunado a esto, las selvas altas y medianas subperennifolias que conforman la mayor parte de la cubierta vegetal de Quintana Roo están siendo severamente reducidas, sobre todo por la tala inmoderada para obtener madera o para crear áreas de agricultura y ganadería. Además, las dunas costeras y las selvas medianas subcaducifolias de Quintana Roo también se han reducido significativamente debido al desarrollo turístico (Sánchez y Rebollar, 1999; Turner *et al.*, 2001; Vester y Calmé, 2003). Estos factores podrían estar afectando las densidades poblacionales de *O. covesi*, no como para producir un cuello de botella o endogamia que repercuta en los niveles de diversidad genética (todavía), pero sí como para evitar que las poblaciones alcancen densidades altas, evitando así migraciones a mayores distancias (Trizio *et al.*, 2005). De ser así, esto podría estar asociado al hecho de que las poblaciones de Chiapas y Quintana Roo estén diferenciadas.

Las poblaciones de mamíferos pequeños, en particular de roedores, han sido ampliamente utilizadas para estudiar los diversos factores que afectan y dan forma a la diversidad y estructura genética de las poblaciones. Esto se asocia con las ventajas que presentan los roedores pequeños como son: mayor tasa de crecimiento y reproducción, altas densidades poblacionales y que pueden ser manipulados tanto en campo como en laboratorio, por lo que resulta muy factible obtener tamaños de muestra representativos de las poblaciones (Gaines *et al.*, 1997; Mech y Hallett, 2001).

Como ya se ha mencionado, *O. covesi* presenta una distribución muy amplia y está reportada como una especie abundante en el país (Ceballos y Miranda, 2000; López & Medellín, 2005). Sin

embargo, en los últimos tres años (2004-2006) el éxito de captura de *O. couesi* en la península de Yucatán ha sido muy bajo, a pesar de un gran esfuerzo de muestreo (Vázquez-Domínguez, comunicación personal). De igual manera, Pozo de la Tijera y Escobedo-Cabrera (1999) realizaron un muestreo intensivo en la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, durante los meses de enero a agosto de 1995, noviembre de 1995 y de enero a marzo de 1996, y no capturaron ningún individuo de *O. couesi*. Además las colecciones de mamíferos de la Universidad Autónoma de Yucatán y de El Colegio de la Frontera Sur, no tienen ningún registro de *O. couesi* de la península de Yucatán. Asimismo, las muestras obtenidas para este estudio de la Colección Nacional de Mamíferos datan de 1989 a 1994 para Campeche, de 1964 a 1985 para Quintana Roo y de 1986 para Yucatán. Con base en lo anterior, puede suponerse que las densidades poblacionales de *O. couesi* en la península son actualmente mucho menores de lo que se tiene registrado en la literatura, lo cual da una mayor relevancia a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Aunque las poblaciones de *O. couesi* en la península presentan valores altos de diversidad genética (al menos para estos marcadores), éstos no son tan altos como los encontrados para otros roedores múridos. La moderada, pero significativa diferenciación encontrada entre poblaciones, particularmente respecto a Quintana Roo, es un indicativo del progresivo aislamiento de que están siendo objeto las poblaciones de esta especie. De continuar la modificación y fragmentación de los ecosistemas en la Riviera Maya, esta diferenciación genética en Quintana Roo podría incrementarse e incluso extenderse al resto de las poblaciones de *O. couesi* en la península. En estudios futuros, sería importante evaluar la variabilidad y estructura genética de estas poblaciones a una escala local y con un mayor tamaño de muestra, y contrastarla con los datos obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en consideración a la importancia que posee esta región desde el punto de vista biológico e histórico, todo trabajo de investigación enfocado al mayor conocimiento de su biota es esencial e importante. Por esta razón, los resultados aquí presentados deben ser considerados para la elaboración y establecimiento de planes y programas de conservación y manejo de la biodiversidad de la península de Yucatán.

9. LITERATURA CITADA

- Amos, W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London* 353: 177-186.
- Arita, H.T. y E. Vázquez-Domínguez. 2003. Fauna y la conformación de la provincia biótica yucateca: biogeografía y macroecología. Pp: 69-80. En: *Naturaleza y sociedad en el área maya* (Colunga-García, P. y A. Larqué, eds.). Academia Mexicana de Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Distrito Federal, México.
- Balloux, F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- Barrera, A. 1962. La península de Yucatán como Provincia Biótica. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 23: 71-105.
- Bautista-Zúñiga, F., E. Batllori-Sampedro, M.A. Ortiz-Pérez, G. Palacio-Aponte y M. Castillo-González. 2003. Geoformas, agua y suelo en la península de Yucatán. Pp: 21-35. En: *Naturaleza y sociedad en el área maya* (Colunga-García, P. y A. Larqué, eds.). Academia Mexicana de Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Distrito Federal, México.
- Baverstock, P.R. y C. Moritz. 1996. Project design. Pp: 17-27. En: *Molecular Systematics* (Hillis, D.M., C. Moritz y B.K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Beletsky, L. 1999. *Belize and northern Guatemala*. Natural World, Academic Press. San Diego.
- Booy, G., R. Hendricks, M. Smulders, J. Van Groenendael y B. Vosman. 2000. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* 2: 379-395.
- Carnevali, G., I.M. Ramírez y J.A. González-Iturbe. 2003. Flora y vegetación de la península de Yucatán. Pp: 53-68. En: *Naturaleza y sociedad en el área maya* (Colunga-García, P. y A. Larqué, eds.). Academia Mexicana de Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Distrito Federal, México.
- Ceballos, G. y A. Miranda. 2000. *Guía de campo de los mamíferos de la costa de Jalisco, México. A field guide to the mammals of the Jalisco coast, Mexico*. Fundación Ecológica de Cuixmala, A. C. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología/ Instituto de Biología. Distrito Federal, México.
- Chiappy, C. y L. Gama. 2004. Modificaciones y fragmentación de los geocomplejos tropicales de la península de Yucatán. *Universidad y Ciencia*, Número especial I: 17-25.
- Chiappy-Jhones, C., V. Rico-Gray, L. Gama y L. Giddings. 2001. Floristic affinities between the Yucatan Peninsula and some karstic areas of Cuba. *Journal of Biogeography* 28: 535-542.
- Cook, W.M., R.M. Timm y D.E. Hyman. 2001. Swimming ability in three Costa Rican dry forest rodents. *Revista de Biología Tropical* 49 (3): 1177-1181.

- Crozier, R.H. 1997. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny and conservation worth. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 243-268.
- Darbre, P.D. 1999. *Basic molecular biology: essential techniques*. John Wiley. New York
- Dowling, T.E., C. Moritz, J.D. Palmer y L.H. Rieseberg. 1996. Nucleic acids III: Analysis of fragments and restriction sites. Pp: 249-320. En: *Molecular Systematics* (Hillis, D.M., C. Moritz y B.K. Mable, eds.). Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Ehrich, D. y N.C. Stenseth. 2001. Genetic structure of Siberian lemmings (*Lemmus sibiricus*) in a continuous habitat: large patches rather than isolation by distance. *Heredity* 86: 716-730.
- Emmons, L.H. y F. Feer. 1990. *Neotropical rainforest mammals, a field guide*. The University of Chicago Press. Chicago.
- Engstrom, M.D. 1984. Chromosomal, genic, and morphological variation in the *Oryzomys melanotis* species group. Tesis Doctorado, Texas A&M University. USA.
- Espejel, I. 1987. A phytogeographical analysis of coastal vegetation in the Yucatan Peninsula. *Journal of Biogeography* 14: 499-519.
- Espinoza, E., I. Sánchez, M. García y C. Lorenzo. 2006. Análisis de la distribución de roedores de la familia Muridae en el sur de México. Pp. 47-54. En: *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. (E. Vázquez-Domínguez, D.J. Hafner, eds.). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 32. Albuquerque, New Mexico.
- Estrada, A., L. Luecke, S. Van, E. Barrueta y M. Rosales. 2004. Survey of black howler (*Alouatta pigra*) and spider (*Ateles geoffroyi*) monkeys in the Mayan sites of Calakmul and Yaxchilán, Mexico and Tikal, Guatemala. *Primates* 45: 33-39.
- Estrada-Loera, E. 1991. Phytogeographic relationships of the Yucatan peninsula. *Journal of Biogeography* 18: 687-697.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fa, J. y L.M. Morales. 1998. Patrones de diversidad de mamíferos de México. Pp: 315-352. En: *Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución* (Ramoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa, comps.). Instituto de Biología, UNAM. Distrito Federal, México.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 613-629.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10 (6): 1500-1508.
- Frankham, R., J.D. Ballou y A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

- Gaggiotti, O.E., O. Lange, K. Rassmann y C. Gliddons. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 8: 1513-1520.
- Gaines, M.S., J.E. Diffendorfer, R.H. Tamarin y T.S. Whittam. 1997. The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304.
- Gerlach, G. y K. Musolf. 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology* 14 (4): 1066-1074.
- Glantz, S. A. 2005. *Primer of biostatistics*. McGraw-Hill. New York.
- Goosem, M. 2001. Effects of tropical rainforest roads on small mammals: inhibition of crossing movements. *Wildlife Research* 28: 351-364.
- Goosem, M. y H. Marsh. 1997. Fragmentation of a small-mammal community by a powerline corridor through tropical rainforest. *Wildlife Research* 24: 613-629.
- Goudet, J., M. Raymond, T. De Meeüs y F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933-1940.
- Griffiths, A., W. Gelbart, J. Miller y R. Lewontin. 1999. *Genética moderna*. McGraw-Hill Interamericana, España.
- Guo, S.W. y E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hall, E.R. 1981. *The mammals of North America*. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett publishers. Boston, USA.
- Hey, J. y C.A. Machado. 2003. The study of structured populations- new hope for a difficult and divided science. *Nature* 4: 535-543.
- Ishibashi, Y., Y. Yoshinaga, T. Saitoh, S. Abe, H. Iida y M.C. Yoshida. 1999. Polymorphic microsatellite DNA markers in the field vole *Microtus montebelli*. *Molecular Ecology* 8: 163-164.
- Kimura, M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kimura, M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 2868-2872.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics* 20: 91-94.

- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- López, X. y R.A Medellín. 2005. *Oryzomys couesi* (Alston, 1877). Pp: 709-710. En: *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos, G. y G. Oliva, coords.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- Lugo-Hubp, J., J.F. Aceves-Quesada y R. Espinasa-Pereña. 1992. Rasgos geomorfológicos mayores de la península de Yucatán. *Anales del Instituto de Geología UNAM* 10 (2): 143-150.
- Luikart, G. y P. England. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 253-256.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- McDonald, W.R. y C.C. St. Clair. 2004. The effects of artificial and natural barriers on the movement of small mammals in Banff National Park, Canada. *Oikos* 105: 397-407.
- Mech, S.G. y J.G. Hallett. 2001. Evaluating the effectiveness of corridors: a genetic approach. *Conservation Biology* 15 (2): 467-474.
- Medellín, R.A. y M. Equihua. 1998. Mammal species richness and habitat use in rainforest and abandoned agricultural fields in Chiapas, Mexico. *Journal of Applied Ecology* 35: 13-23.
- Michalakis, Y. y L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064.
- Moncrief, N.D., N.E. Cockett, A.D. Neff, W.L. Thomas y R.D. Dueser. 1997. Polymorphic microsatellites in the meadow vole *Microtus pennsylvanicus*: conservation of loci across species of rodents. *Molecular Ecology* 6: 299-301.
- Mossman, A. y P.M. Waser. 2001. Effects of habitat fragmentation on population genetic structure in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Canadian Journal of Zoology* 79: 285-295.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70 (12) : 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Orellana, R., G. Islebe y C. Espadas. 2003. Presente, pasado y futuro de los climas de la península de Yucatán. Pp: 37-52. En: *Naturaleza y sociedad en el área maya* (Colunga-García, P., A. Larqué, eds.). Academia Mexicana de Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Distrito Federal, México.
- Oxley, D.J., M. Fenton y G. Carmody. 1974. The effect of roads on populations of small mammals. *Journal of Applied Ecology* 11: 51-59.

- Park, K. y J. Lee. 2003. Dealing with carryover contamination in PCR: an enzymatic strategy. Pp: 15-20. En: *PCR Primer: A laboratory manual* (Dieffenbach, C. W., G. S. Dveksler, eds.). CSHL Press. New York.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton y P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2): 361-382.
- Pozo de la Tijera, C. y J.E. Escobedo-Cabrera. 1999. Mamíferos terrestres de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical* 47: 251-262.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Reid, F.A. 1997. *A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43 (1): 223-225.
- Rzedowski, J. 1981. *La vegetación de México*. Editorial Limusa. Distrito Federal, México.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sánchez, R.L. y S. Rebollar. 1999. Deforestación en la península de Yucatán, los retos que enfrentar. *Madera y Bosques* 5 (2): 3-17.
- Schmidt, C.A. y M.D. Engstrom. 1994. Genic variation and systematics of rice rats (*Oryzomys palustris* species group) in southern Texas and northeastern Tamaulipas, Mexico. *Journal of Mammalogy* 75: 914-928.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for populations genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva. Ginebra, Suiza.
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision base on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Smouse, P.E., J.C. Long y R.R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* 35 (4): 627-632.
- Sunnucks, D. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-202
- Surzycki, S.J. 2000. *Basic methods in molecular biology*. Springer-Verlag. New York.
- 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.

- Turner, B.L., S. Cortina, D. Foster, *et al.* 2001. Deforestation in the southern Yucatan peninsular region: an integrative approach. *Forest Ecology and Management* 154: 353-370.
- 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 populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Netherlands. *Molecular Ecology* 9: 1651-1656.
- Vázquez-Domínguez, E., G. Ceballos y J. Cruzado. 2004. Extirpation of an insular subspecies by a single introduced cat: the case of the endemic deer mouse *Peromyscus guardia* on Estanque Island, Mexico. *Oryx* 38: 347-350.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Paetkau, N.J. Tucker, G. Hinten, y 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., D. Piñero and G. Ceballos. 1999. Linking heterozygosity, demography, and fitness of tropical populations of *Liomys pictus*. *Journal of Mammalogy* 80 (3): 810-822.
- Vázquez-Domínguez, E. (en prensa) ¿Cuái es el enfoque de la ecología molecular? Ejemplos con un ratón espinoso. En: *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos* (G. Sánchez Rojas, A.E. Rojas Martínez, eds.). CIB-UAEH. Distrito Federal, México.
- Vázquez-Domínguez, E. y R. Vega. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos?. Pp. 67-73. En: *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. (E. Vázquez-Domínguez, D.J. Hafner, eds.). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 32, Albuquerque, New Mexico.
- Vega, R. R. 2006. *Estructura y diversidad genética de Oryzomys palustris cozumelae de la Isla de Cozumel*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Vester, H. y S. Calmé. 2003. Los ecosistemas terrestres de la península de Yucatán: estado actual de los paisajes, vegetación, flora y fauna. Pp: 159-173. En: *Naturaleza y sociedad en el área maya* (Colunga-GarcíaMarín, P., A. Larqué, eds.). Academia Mexicana de Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Distrito Federal, México.
- Vinicius, M., T.A. Weimer, S.M. Callegari-Jacques y M.S. Mattevi. 2004. Biochemical polymorphisms and genetic relationships in rodents of the genera *Oryzomys* and *Oligoryzomys* (Sigmodontinae) from Brazil. *Biochemical Genetics* 42: 317-329.
- Wang, Y.Q., C.R. Hughes, E.A. Gines-Candelaria, *et al.* 2000. Polymorphic microsatellite loci of *Oryzomys palustris*, the marsh rice rat, in south Florida detected by silver staining. *Molecular Ecology* 9: 1931-1932.
- Wang, Y., D.A. Williams y M.S. Gaines. Evidence for a recent genetic bottleneck in the endangered

- Florida Keys silver rice rat (*Oryzomys argentatus*) revealed by microsatellite DNA analyses. *Conservation Genetics* 6: 575-585.
- Wauters, L.A., Y. Hutchinson, D.T. Parkin y A.A. Dhont. 1994. The effects of habitat fragmentation on demography and on the loss of genetic variation in the red squirrel. *Proceedings of the Royal Society of London* 255: 107-111
- Weir, B.S. y Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Westermeier, R. 2005. *Electrophoresis in practice*. Wiley-VCH. Weinheim, Alemania.
- Williams, J.G. K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 (22): 6531-6535.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright, S. 1978. *Evolution and genetics of population, variability within and among populations*. Vol. 4. The University of Chicago Press. Chicago, USA.
- Yeh, F.C., R.C. Young, B. Timothy, T.B. J. Boyle, Z. H. Ye y J.X. Mao. 1997. *POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

10. ANEXOS

Anexo 1. AquaPure Genomic DNA Tissue Kit.

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
- Proteinase K solution (20mg/ml) 175 μ l

Material requerido pero no proporcionado en el kit: isopropanol 100% y etanol 70%

Protocolo de extracción

1. Lisis celular:

- Cortar un pedazo pequeño de tejido (aprox. 2 mm²), que se encuentra en etanol 95%, colocarlo sobre papel absorbente y dejarlo secar en un tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 300 μ l de Genomic DNA lysis solution y voltear el tubo un par de veces.
- Adicionar 1.5 μ l de Proteinase K (20 mg/ml) a la solución de lisis y mezclar invirtiendo el tubo 25 veces. Incubar a 55° C de 2 a 3 horas, o durante toda la noche a temperatura ambiente (puede ser menos tiempo, se debe estar pendiente para observar cuando se deje de ver el pedazo de tejido en el tubo). Durante la incubación, se debe invertir el tubo periódicamente. Si el pedazo de tejido estuviera intacto después de la incubación, se puede añadir un poco más de Proteinase K (1-1.5 μ l).
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

2. Tratamiento con RNAsa:

- Adicionar 1.5 μ l de RNase A solution (4 mg/ml) a la solución de lisis.
- Mezclar la muestra invirtiendo el tubo 25 veces e incubar a 65° C por 45 minutos.

3. Precipitación de proteínas:

- Dejar que la muestra se enfríe a temperatura ambiente. Una vez fría, añadir 100 μ l de Protein precipitation solution.
- Mezclar la muestra en vortex a alta velocidad por 20 segundos.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 4 min. Las proteínas precipitadas deberán formar un pellet.
- Si el pellet no se ve compacto, volver a mezclar en vortex para después incubar en hielo por 5 minutos y volver a centrifugar (14,000 rpm durante 4 min).

4. Precipitación de ADN:

- Vaciar el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 ml y agregar 300 μ l de isopropanol 100% (2-propanol) cuidando que el pellet se quede en el tubo viejo.
- Mezclar la muestra invirtiéndola gentilmente 50 veces.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min, el ADN será visible en forma de un pellet blanco pequeño.
- Quitar el sobrenadante y secar brevemente el tubo en un papel absorbente. Añadir 300 μ l de etanol 70%, invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min, y cuidadosa y lentamente verter el etanol para que no arrastre el pellet
- Poner el tubo inclinado boca a abajo (¡sin que se salga el pellet!) sobre un papel absorbente y dejar secar de 10 a 15 min o hasta que el etanol se evapore. Se puede lavar el pellet cuantas veces se considere necesario.

5. Hidratación del ADN:

- Añadir 100 μ l de DNA hydration buffer.
- Incubar la muestra a 65° C por 1 hora para acelerar la hidratación. Otra forma puede ser incubar a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Agitar en vortex a velocidad media durante 5 segundos para llevar el pellet al fondo del tubo.
- Almacenar el ADN a 4° C. Si es por largo tiempo, a -20° C o -80° C.

Anexo 2. Extracción de ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

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

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

Paso 2.- A cada muestra se le agrega un volumen* de fenol, se mezcla (vortex), se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm. Se recoge el sobrenadante (colocándolo en un nuevo tubo etiquetado), éste se mezcla con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcla (vortex), se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se mezcla con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se homogeneiza (vortex). Se centrifuga 10 minutos a 12,000 rpm. Se retira el sobrenadante y se agrega un volumen de éter etílico, se mezcla (vortex) y se centrifuga tres minutos a 12,000 rpm. Se retira el sobrenadante. Las muestras se colocan en baño María de 3 a 5 minutos con los tubos abiertos para evaporar el éter. Se añade 0.1 volumen de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de alcohol etílico absoluto frío (el alcohol se agrega lentamente) y después se mezcla de manera suave. Se deja precipitar a -20°C durante 12 horas. Para muestras antiguas dejar tres días.

Paso 3.- Centrifugar 30 minutos a 12,000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se deja el precipitado de ADN. Se añaden 100 μl de alcohol etílico al 80% y no se resuspende. Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm. Se elimina el sobrenadante. Las muestras se colocan en una centrifuga al vacío entre 3 a 5 minutos. Se añade 100 μl de TE (Tris HCl 10mM EDTA 1mM) al precipitado. Se resuspende el precipitado y se centrifuga en un concentrador al vacío por algunos segundos (2-3) para recuperar la muestra que se adsorbe al tubo. Se añade 11.1 μl de ARNasa (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incuba a 37°C durante una hora. Se añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) se homogeneiza y se centrifuga durante 5 minutos. Se recupera el sobrenadante y se agrega 0.1 volúmenes de Na Ac (acetato de sodio) más 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, este último se resbala suavemente por las paredes del tubo. Se mezcla suavemente. Se colocan los tubos a -20°C hasta el siguiente día.

Paso 4.- Centrifugar de 20 a 30 minutos a 12,000 rpm. Se elimina el sobrenadante. Se agrega 100 μl de etanol al 80% sin resuspender. Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm. Se elimina el sobrenadante. Se colocan las muestras en el concentrador entre 3 a 5 minutos. Se agregan 50 μl de agua estéril (libre de ARNasa y ADNasa) para resuspender el ADN. Las muestras se colocan en refrigeración a -20°C . (Darbre, 1999; Surzycki, 2000).

*Nota. Un volumen es de 350 μl .

Anexo 3. Condiciones de amplificación para cinco microsatélites de *Oryzomys couesi*.

COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN	PRIMERS				
	Ory16	Ory21	Ory26	Ory40	Ory60
MgCl ₂	1.05 µl	0.9 µl	1.2 µl	1.05 µl	1.05 µl
dNTPs	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Primer F	0.9 µl	1.5 µl	0.9 µl	1.5 µl	1.5 µl
Primer R	0.9 µl	1.5 µl	0.9 µl	1.5 µl	1.5 µl
Buffer	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Taq	0.15 µl	0.15 µl	0.15 µl	0.15 µl	0.15 µl
ADN	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	Para ajustar volumen final de 15 µl				
CONCENTRACIONES FINALES					
MgCl ₂	3.5 mM	3 mM	4 mM	3.5 mM	3.5 mM
dNTPs	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM
Primer F	0.6 µM	1 µM	0.6 µM	1 µM	1 µM
Primer R	0.6 µM	1 µM	0.6 µM	1 µM	1 µM
Buffer	1X	1X	1X	1X	1X
Taq	0.75 U	0.75 U	0.75 U	0.75 U	0.75 U

Anexo 4. Geles de poliacrilamida y tinción con plata.

Preparación del stock de poliacrilamida 6% (250 ml)

- 105 g de urea 7M
- 25 ml de TBE pH 8.3
- 37.5 ml de acrilamida 40%

Agregar en un vaso de precipitado 100 ml de H₂O_d y la urea. Colocar un agitador magnético y disolver sobre plato caliente para acelerar la disolución de la urea. Una vez disuelta la urea, añadir el TBE 10X y la acrilamida 40% (debe tenerse mucho cuidado ya que la acrilamida es altamente tóxica y se absorbe rápidamente a través de la piel). Revolver bien y aforar a 250 ml, dejando enfriar a temperatura ambiente. Guardar la solución stock en refrigeración (4 °C).

Preparación de los vidrios

- 2 vidrios, uno con "orejas de conejo" y otro sin
- 333 µl de etanol 100% a 4°C (puede usarse alcohol etílico 96%)
- 83 µl de ácido acético 10%
- 1.25 µl de Bind Silene (Pharmacia Biotech No. 17-1330-01)
- Rain Anti-Fog (repelente de agua para parabrisas de coche, de uso comercial)

Lavar ambos vidrios con jabón y después con agua destilada, después limpiar con papel absorbente y etanol 70% de tal manera que no queden residuos sobre la superficie. De vez en cuando dejarlos enjuagando con NaOH de 2 a 3 horas. Una vez secos, colocar los vidrios de forma horizontal sobre una base o soporte.

Preparar la solución hidrofílica para el vidrio con "orejas de conejo" (que es en el que se pega el gel): en un tubo Ependorf de 1.5 ml agregar el etanol 100%, el ácido acético 10% y el Bind Silene, mezclar bien y verter sobre el vidrio, distribuyendolo uniformemente sobre toda la superficie con una sanita. En el vidrio sin orejas (donde no se pega el gel), se vierte la solución hidrofóbica, es decir el Rain Anti-Fog, y también se distribuye uniformemente sobre el vidrio. Dejar secar ambos vidrios de 10 a 15 min.

Una vez que los vidrios están perfectamente secos, se colocan los separadores de 0.4 mm en los bordes del vidrio con orejas y se pone el vidrio sin orejas encima, de manera que las caras cubiertas con las soluciones, queden hacia la parte de adentro. Asegurar los vidrios con broches en los extremos para que estos no se separen.

Preparación del gel

- 20 ml de poliacrilamida 6%
- 60 µl de persulfato de amonio (APS) 10%
- 16.6 µl de TEMED (Biorad)

En un recipiente que sirva para verter (como una jeringa sin aguja) agregar la poliacrilamida, el APS y el TEMED (estas dos últimas sustancias son las que hacen que se polimerice la acrilamida). Mezclar bien e inmediatamente verter la solución entre los dos vidrios, poco a poco y haciendo una presión constante para evitar que se formen burbujas. Colocar el peine en posición invertida (con las puntas hacia fuera del gel) de manera que quede una superficie plana donde posteriormente se harán los pozos. Sujetar con unos broches la zona entre el peine y los vidrios y dejar polimerizar el gel 30-35 min.

Una vez polimerizado, retirar el peine y colocar el gel en una cámara de electroforesis vertical, la cual se llena con TBE 1X pH 8.3. Limpiar la superficie plana del gel de los excesos de poliacrilamida (ya que ésta podría obstruir los pozos) y colocar el peine pero ahora insertando las puntas en el gel. Poner a precorrer el gel a 500 V por 10 min antes de cargar las muestras.

Carga y corrida del gel

Agregar ½ volumen de buffer de carga (de dos frentes) a cada muestra y desnaturalizar por 7 min a 94 ° C, colocando inmediatamente después las muestras en hielo y manteniéndolas en el mismo hasta cargarlas en el gel.

Una vez que terminó de precorrer el gel, se retira el peine y se limpian varias veces los pozos antes de colocar la muestra, utilizando el mismo buffer de la cámara. Cargar una tercera parte del volumen de la muestra (aproximadamente 7 µl) en cada pozo. Correr el gel a 500 V por 2:30-3 horas.

Al terminar la corrida, retirar el gel de la cámara y separar los vidrios con la ayuda de una espátula. El gel queda pegado en el vidrio con orejas y el vidrio sin orejas debe quedar limpio, sin pedazos de gel adheridos.

Tinción con plata

- Solución fijadora y de "paro": ácido acético 10%
- Solución de plata: 300 ml de H₂O (fría)
 - 0.3 g de nitrato de plata (ACS Reagent, Cat #09205)
 - 450 µl de formaldehído 37% (210602 JT Baker)
- Solución reveladora: 300 ml de H₂O (fría)
 - 9 g de carbonato de sodio (ACS Reagent, Cat # 09425)
 - 450 µl de formaldehído 37% (210602 JT Baker)
 - 500 µl de tiosulfato de sodio (5637-02 JT Baker)

Colocar el vidrio con el gel pegado en una charola con la solución fijadora (procurando que ésta cubra completamente el vidrio) y dejar sobre un agitador orbital por 30 min.

Vaciar la solución fijadora en un recipiente y reservarla a temperatura ambiente, ya que se utilizará posteriormente como solución de bloqueo. Agregar agua destilada fría al gel y dejar 10 min.

Preparar la solución de plata en un vaso de precipitado con agitador magnético y vaciarla sobre el gel, dejar de 20 a 25 min.

Retirar la solución de plata (como es tóxica, debe manejarse y desecharse con cuidado). Agregar agua destilada fría y tirarla rápidamente (5 seg).

Preparar la solución reveladora en un vaso de precipitado con agitador magnético (agregando poco a poco el carbonato), vaciar sobre el gel inmediatamente después del enjuague en agua por 5 segundos y dejar en la solución hasta que se observen las bandas.

En cuanto se vean las bandas, retirar la solución reveladora y rápidamente colocar la solución de bloqueo (misma que se usó como solución fijadora), dejar 10 min.

Tirar la solución de bloqueo y agregar agua destilada fría, dejar 10 minutos, tirar el agua y dejar secar el gel una noche.