

Oryzomys couesi en el sureste de México: estimaciones genéticas y filogeográficas

Oryzomys couesi in southeastern México: genetic and phylogeographic evaluations

Ella Vázquez-Domínguez*, Anahí Mejía-Puente y Rodrigo Vega

Resumen. *Oryzomys couesi*, conocida como rata arrocera de pantano, presenta una amplia distribución en México, sin embargo, la información que existe sobre este roedor es muy limitada. En este estudio analizamos la diversidad y diferenciación genética de las poblaciones de *O. couesi* del sureste de México (incluyendo los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas), por medio de loci de microsatélites y secuencias de citocromo *b*. Evaluamos también la diversidad y divergencia genética, así como la estructuración filogeográfica de un subgrupo de muestras (Quintana Roo, Chetumal y Cozumel). Se encontraron niveles altos de diversidad genética en términos de polimorfismo (100%), número de alelos (11.2), diversidad haplotípica (0.939) y niveles de heterocigosidad observada (0.578) y esperada (0.779). Las poblaciones mostraron alto flujo génico entre ellas, con valores de diferenciación genética bajos, excepto la población de Quintana Roo, la cual se diferenció significativamente de Chiapas y Yucatán. Los resultados de diferenciación fueron iguales cuando, en lugar de la división política, se agrupó a las poblaciones con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta. Filogeográficamente se evidenció que la población de Cozumel se originó a partir de la migración de *O. couesi* de la península de Yucatán, a través de varios eventos de colonización continente-isla. A pesar de que las poblaciones de *O. couesi* en la región de estudio presentan altos valores de diversidad genética, éstos no son tan altos como los encontrados para otros roedores mурidos. 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; asimismo, las densidades poblacionales de la especie han disminuido significativamente, todo lo cual otorga especial importancia de conservación a *O. couesi*, por lo menos en el sureste de México.

Palabras clave: filogeografía, genética de poblaciones, mamíferos, poblaciones estructuradas, Península de Yucatán.

Abstract. *Oryzomys couesi*, known as rice rat, has an ample distribution in México, however, the information about this rodent is rather limited. In this study we analyzed the genetic diversity and differentiation of *O. couesi* populations in Southern México (Yucatán, Campeche, Quintana Roo and Chiapas states) with microsatellite loci and cytochrome *b* sequences. We also evaluated the genetic variability, divergence and phylogeographic structuring of a subgroup of samples (Campeche, Chiapas and Cozumel). High genetic diversity was found, in terms of polymorphism (100%), number of alleles (11.2), haplotypic diversity (0.939) and observed (0.578) and expected (0.779) heterozygosity levels. Populations showed high genetic flow, with low genetic differentiation values, with exception of the population of Quintana Roo, which was significantly differentiated from Chiapas and Yucatán. Differentiation results were the same when, instead of using political divisions, populations were grouped based on vegetation type and geographic location of samples. Phylogeographically, results evidenced that the population from Cozumel originated by migration from the Yucatán

Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, C.P. 04510 México, Distrito Federal.

*Correspondencia: evazquez@ecologia.unam.mx

península, through several continent-island colonization events. Despite the fact that *O. couesi* in the study region has high genetic diversity levels, they are not as high as values found in other murid rodents. The moderate, but significant differentiation found between populations, particularly for Quintana Roo and Chiapas, is an indicative of the progressive isolation that populations are being subject to; likewise, population densities of the species have diminished significantly, altogether giving an exceptional conservation value to *O. couesi*, at least in Southern México.

Key words: mammals, population genetics, population structure, phylogeography, Yucatán Peninsulæ.

INTRODUCCIÓN

Los individuos que constituyen poblaciones naturales se diferencian entre sí por variaciones en distintos caracteres, ya sea morfológicos, ecológicos, conductuales o moleculares. El estudio de la diversidad y estructura genética de poblaciones naturales se enfoca en identificar, en particular, las variaciones moleculares, sobre todo las diferentes formas que presenta un gen y las frecuencias de cada una de estas formas. Asimismo, el nivel de diversidad genética presente en una población está asociado tanto a factores inherentes a los individuos y las poblaciones, tales como sistema de apareamiento, metabolismo, tamaño poblacional e historia evolutiva, como a factores externos, por ejemplo heterogeneidad ambiental, fragmentación del hábitat, aislamiento por distancia, fluctuaciones en la densidad poblacional y variación en los patrones de dispersión (Booy et al., 2000), factores que además determinan en gran medida la estructuración (diferenciación) entre poblaciones (Wright, 1951). La reducción y fragmentación del hábitat ocasiona que el flujo génico entre poblaciones disminuya, mientras que la deriva génica y la endogamia aumentan; ello conduce a un aislamiento y mayor diferenciación entre poblaciones y a una menor diversidad genética intrapoblacional (Amos y Harwood, 1998; Mossman y Waser, 2001).

Por lo tanto, la detección de diferencias genéticas entre individuos es esencial para conocer la estructura y diversidad de las poblaciones. Los patrones de estructura genética poblacional reflejan los niveles pasados y actuales de flujo génico, por lo que es posible analizar dicha estructura bajo un enfoque no sólo de genética de poblaciones, sino filogeográfico, en el cual se analizan los principios y procesos que gobiernan la dis-

tribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000; Vázquez-Domínguez, 2007). El uso de marcadores moleculares ha permitido realizar estudios sobre genética de poblaciones y filogeografía, a escalas desde local hasta regional, y en los cuales es posible detectar niveles muy finos de diversidad genética, antes imposibles con caracteres morfológicos o proteínas (Mossman y Waser, 2001). Así ha sido posible evaluar la variabilidad genética de poblaciones y especies, conocer las relaciones filogenéticas e inferir su posible origen (Crozier, 1997; Loxterman et al., 1998; Vázquez-Domínguez et al., 2001), reconstruir la historia evolutiva (Avice, 2000; Vázquez-Domínguez, 2002), así como determinar poblaciones y especies prioritarias para la conservación (Moritz, 1994; Smith y Wayne, 1996). Los microsátélites y la secuenciación de regiones particulares del genoma son algunos de los marcadores moleculares más populares por las ventajas que presentan para este tipo de estudios (Hillis et al., 1996; Freeland, 2005).

Para poblaciones de vertebrados terrestres no voladores, como los roedores, la separación genética puede ser causada por barreras naturales; por ejemplo la ardilla *Sciurus vulgaris*, para la que Trizio et al. (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. 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 regiones geográficas amplias, pero su efecto a nivel interpoblacional varía entre las especies (Ehrich y Stenseth, 2001; Balloux y Lugon-Molin, 2002) reflejándose, entre otros, en patrones genéticos y filogeográficos diversos (Avice, 2000; Freeland, 2005; Vázquez-Domínguez y Vega, 2006; Vázquez-Domínguez, et al., 2009). Nuevamente, al evaluar la estructura genética a nivel local y regional de poblaciones de la ardilla *Sciurus vulgaris*, Trizio et al. (2005) encontraron una correlación significativa entre la diferenciación genética y la distancia geográfica, pero sólo para la escala regional.

El sureste de México es una zona ideal para el estudio de patrones de estructuración y diferenciación genética, sobre todo por su intrincada historia geológica y biogeográfica, donde hubo procesos intermitentes de migración y dispersión de flora y fauna desde Sudamérica, a través de Centro América, en el llamado gran intercambio biótico (Arita y Vázquez-Domínguez, 2003; Wüster et al., 2005). La división de regiones geográficas o de continentes en provincias biogeográficas implica que poseen una biota distintiva en cuanto a composición y estructura, donde las comunidades que la integran se asemejan más entre ellas que a las de otras provincias bióticas. Así, se reconoce que la fauna de la península de Yucatán, o del sureste de México, es evidentemente neotropical pero también notablemente diferente de la de otras zonas de México; sin embargo, no existe consenso en la definición de dicha provincia biótica, reconociéndose en general tres configuraciones básicas (Arita y Vázquez-Domínguez, 2003). De entre éstas, la provincia llamada 'regiones tropicales del sur (RTS)', definida con base en la distribución de los mamíferos, se caracteriza por ser una unidad geomorfológica con patrones climáticos y edáficos similares y una estructura característica de tipos de vegetación; dicha provincia 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 estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Fa y Morales, 1998). La distribución de mucha de la fauna y flora en la RTS fue determinada asimismo por los procesos geológicos e históricos que se sucedieron en esa región (Arita y Vázquez-Domínguez, 2003; Fa y Morales, 1998).

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 múridos pertenecen a la subfamilia Sigmodontinae, que comprende 79 géneros y de los cuales *Oryzomys* es uno de los más altamente diversificados (Emmons y Feer, 1990; Vinicius et al., 2004). La especie *Oryzomys couesi* (Alston, 1877), conocida como rata arrocera de pantano, se distribuye desde el sur de Texas hasta el norte de Colombia; en México está presente en estados costeros del Pacífico y el Atlántico, con excepción de la región centro-norte del altiplano y en el sureste se distribuye en los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas, así como en la isla de Cozumel (Reid, 1997; Ceballos y Oliva, 2005).

La distribución de *O. couesi*, particularmente en una región geográfica con características biológicas y geológicas que permiten definirla como una provincia

biótica, hacen de éste un sistema ideal para el estudio de la relación entre diversidad genética, estructuración y patrones filogeográficos. Por ello, los objetivos del presente estudio fueron: (1) determinar la diversidad genética de *Oryzomys couesi* en el sureste de México, mediante el uso de marcadores moleculares de microsátelites y ADN mitocondrial (citocromo *b*), (2) evaluar la diferenciación genética dentro y entre las poblaciones de *O. couesi*, y (3) determinar si existe una estructura filogeográfica entre las poblaciones de la especie en la región de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de *Oryzomys couesi*. Se obtuvieron un total de 37 muestras de tejido de *O. couesi*: 29 de ejemplares de museo y ocho muestras de tejido fresco (Cuadro 1). El trampeo de animales vivos se realizó en diferentes localidades de los estados de Yucatán y Quintana Roo; dichos sitios se definieron como los más probables donde se podía encontrar la especie con base en puntos de colecta reportados en colecciones científicas. 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 capturados 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.

Trabajo de Laboratorio. 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. El ADN de muestras obtenidas de ejemplares de museo fue extraído por medio de la técnica de fenol-cloroformo dado que es más adecuada cuando se tiene ADN degradado o en poca cantidad. 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.

Microsátelites. Se estandarizaron cinco loci de microsátelites de *O. couesi*, utilizando los pares de oligonucleótidos ("primers") diseñados para *O. palustris* (Wang et al., 2000; Cuadro 2). Durante la estandarización se realizaron controles negativos para asegurar que no hubiera contaminación durante la amplificación y que

Cuadro 1. Procedencia de las muestras de *Oryzomys couesi* y sitios de colecta. CNMA: Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM; ECO-SC-M: Colección de Mamíferos de El Colegio de la Frontera Sur. ¹ El número de las localidades corresponde a los sitios que se muestran en la Figura 1.

Estado	Localidad ¹	Coordenadas geográficas		No. de muestras	Procedencia
		N	W		
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 Moceroy (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
Campeche	7 Estero Franco	17° 56' 27"	88° 52' 38"	1	CNMA
	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
Chiapas	12 La Veleta	18° 40' 60"	92° 25' 60"	1	CNMA
	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. Pijijiapan)	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

Cuadro 2. Características de cinco loci de microsatélites (Wang et al., 2000) utilizados para *Oryzomys couesi*. * Intervalos encontrados en el presente trabajo.

Locus	Temperatura alineación (°C)	No. de GenBank	No. repeticiones de AAT	Tamaño 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

las bandas obtenidas fueran propias del microsatélite. Las condiciones finales de amplificación, en un volumen de 15 µl, fueron: aproximadamente 60 ng de templado, 2 mM de cada dNTP, 10 x buffer de PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0.75 U de *Taq* Platinum (Invitrogen, Brazil); la concentración de cada primer fue 0.6 µM para Ory16 y Ory26, y 1.0 µM para los otros tres primers; la concentración de MgCl₂ fue de 3.0 mM para Ory16, Ory40 y Ory60, 3.5 mM (Ory21) y 4.0 mM (Ory26). La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador MJ Research modelo PTC 100 con el siguiente programa: 1 minuto a 92°C, 30 ciclos de 5 segundos a 92°C, 5 segundos a

la temperatura de alineación para cada microsatélite (Cuadro 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 g/ml. Hubo algunas muestras que presentaron problemas de amplificación, para las cuales se utilizaron tres distintas concentraciones de BSA (Bovine Serum Albumin): 0.5, 1.0 y 1.5 µg/µl, la cual 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 (Mejía-Puente, 2007).

La separación de los productos de amplificación de microsátélites se realizó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, los cuales se corrieron a 500 volts durante 2.5 - 3 h. El tiempo de corrida varió según el tamaño de las bandas esperadas (e. g. a mayor tamaño, más tiempo). Los geles se tiñeron 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. Los geles teñidos se fotografiaron y con las fotos 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 homocigos y heterocigos, con el programa LabWorks Image Acquisition and Analysis Software versión 4.5.

Secuenciación. Se amplificó una porción de 884 pb del gen mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*) con los pares de oligos reportados por Smith y Patton (1993): MVZ05-MVZ04 (CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC) y MVZ45-MVZ16 (ACNACHATAGCNACAGCATT CGTAGG-AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT). En el presente trabajo se secuenciaron 10 muestras de museo, 5 de Campeche y 5 de Chiapas, así como 18 muestras frescas de Cozumel (para ubicación de las muestras de Cozumel ver Vega et al., 2007). Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron: aproximadamente 60 ng de templado, 2 mM de cada dNTP, 10 x buffer de PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 U de *Taq* Platinum, 0.4 μ M de cada primer y 3.0 mM de $MgCl_2$, en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones del PCR fueron 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50-52°C, 1 min a 72°C, más un paso final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron observados en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio a 0.5 μ g/ml y visualizados bajo luz UV. Después, el PCR se limpió con el procedimiento de PEG (polietilenglicol; PEG-3350) y nuevamente se visualizó en geles de agarosa para asegurarse que se tuviera producto de PCR. A continuación se realizó el PCR de secuenciación utilizando el kit comercial BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, California), como sigue: 5 μ l de ADN, 1 μ l de primer, 2 μ l de BigDye y 3 μ l de buffer y el PCR incluyó un ciclo inicial de 1 min a 96°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 seg a 50°C y 4 min a 60°C. Las muestras se limpiaron nuevamente con columnas de Sephadex G-50 y se secuenciaron en un secuenciador Applied Biosystems 373 y 3100 (Vega, 2006).

Análisis estadísticos con microsátélites. Se determinaron las frecuencias alélicas, los genotipos

observados, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con su coeficiente de endogamia y el desequilibrio de ligamiento para los cinco loci de microsátélites, utilizando el programa Genepop (Raymond y Rousset, 1995). Para estos análisis se realizó la corrección de Bonferroni secuencial correspondiente (Rice, 1989). Se estimó también el coeficiente de endogamia F_{IS} (Wright, 1951). Para estimar la diversidad genética en las cuatro poblaciones 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 v.1.31 (Yeh et al., 1997).

Para evaluar la estructura genética y diferenciación de las poblaciones, se hicieron diversas estimaciones: la distancia genética no sesgada de Nei (1978) con el programa PopGene, así como la relación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (en km) entre las poblaciones 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), con base en 20,000 permutaciones de haplotipos entre las poblaciones y su significancia fue evaluada mediante la corrección de Bonferroni secuencial. También se calculó el número absoluto de migrantes intercambiados entre pares de poblaciones (M) y se realizó una prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992), todo ello con el programa Arlequín v.2.00 (Schneider et al., 2000).

Análisis estadísticos con citocromo *b*. Las secuencias de *cyt b* se alinearon utilizando el programa BioEdit v.7.0.1, incorporando además una secuencia de GenBank de *O. megacephalus* (AY275124.1) y de *Calomys callosus* (AY439002.1) como grupos externos. Con el programa DnaSP v.4.0 (Rozas et al., 2003) se calculó el número de sitios polimórficos, sitios parsimoniosamente informativos, la diversidad haplotípica de Nei (h ; Nei, 1978), la diversidad nucleotídica (p) como el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias, así como la divergencia entre poblaciones, estimada como el número promedio de sustituciones netas por sitio (D_{xy}).

Finalmente, se utilizó el programa ModelTest v.3.06 (Posada y Crandall, 1998) para estimar el modelo de sustitución de ADN al que mejor se ajustan las secuencias. Se utilizó el programa PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2002) para análisis filogenético de distan-

cia (neighbor-joining); se utilizó el modelo obtenido con ModelTest y 1,000 réplicas de bootstrap para evaluar el soporte de las ramas. Se utilizó el programa TCS (Clement et al., 2000), para inferir genealogías a nivel de poblaciones con datos de secuencias cuando hay poca divergencia y para estimar las relaciones genealógicas entre las secuencias de *cyt b*.

RESULTADOS

Diversidad genética. Se analizaron con microsatélites un total de 37 individuos de *Oryzomys couesi* pertenecientes a distintas localidades de los estados de Yucatán (10 individuos), Quintana Roo (5), Campeche (11) y Chiapas (11). Cabe mencionar que a pesar de un esfuerzo de muestreo significativo, sólo se encontraron individuos en dos localidades del norte de Yucatán (Cuadro 1).

Los loci Ory21 (para Campeche y Yucatán) y Ory60 (para Campeche) presentaron poblaciones fuera de equilibrio con valores significativos ($P < 0.05$) debido a una deficiencia de heterocigos. En cuanto a los valores de F_{IS} estimados por locus, 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 heterocigos. Respecto a cada población considerando los cinco loci en conjunto, Chiapas y Campeche se encontraron fuera de equilibrio ($P < 0.05$). Ninguna población mostró desequilibrio de ligamiento significativo al comparar cada par de loci ($P > 0.05$).

En total se observaron 100 genotipos para los cinco loci de *O. couesi* estudiados (Cuadro 3). 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%). Ory60 fue el locus que presentó el mayor número de genotipos (27) de los cuales el 74% (20 genotipos) fueron heterocigos, mientras que Ory21 fue el segundo con mayor número de genotipos (24) con 17 genotipos heterocigos (71%).

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 (Cuadro 4). Los 5 loci fueron 100% polimórficos para las 4 poblaciones. El mayor número promedio de alelos observados y efectivos por locus se observó en la población de Campeche (8.2 y 5.6, respectivamente), mientras que el menor número promedio fue en Quintana Roo (4.6 y

3.2), con una media de 11.2 y 5.9 considerando el total de las poblaciones. Los valores de H_o para cada población por locus variaron de 0.363 para Campeche en Ory26 a 0.909 para Campeche y Yucatán en Ory40 y Ory60, respectivamente, siendo Yucatán la población con H_o promedio más alta (0.660). En cuanto H_{NEI} promedio, los valores más alto y más bajo fueron 0.749 y 0.636, Campeche y Quintana Roo respectivamente (Cuadro 4).

Diferenciación genética entre poblaciones. Los resultados de distancia genética mostraron que las poblaciones con mayor divergencia fueron Chiapas-Quintana Roo (0.584) y con 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 (Cuadro 5). Asimismo, los valores pareados de F_{ST} variaron de 0.005 (Campeche-Yucatán) a 0.135 (Chiapas-Quintana Roo), y sólo dos de seis comparaciones (33%) fueron significativas; el número de migrantes entre poblaciones varió de 3.3 (Quintana Roo-Chiapas) a 94.5 (Yucatán-Campeche; Cuadro 5). Finalmente, con la prueba de Mantel se determinó que no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para las poblaciones estudiadas ($r = 0.044$, $P = 0.458$). El análisis de varianza molecular (AMOVA) 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 ($F_{ST} = 0.040$; $P = 0.022$).

Dado que la escala elegida para el estudio se basó en la división política, se hizo una segunda agrupación más 'biológica' de las muestras, con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta. Así, las localidades de Yucatán y Campeche ubicadas a lo largo de la costa se agruparon como "Golfo de México" (localidades 1-3, 9-12), los sitios de Quintana Roo y la muestra de Calakmul (localidades 4-8) como "Caribe" y las localidades de Chiapas se dividieron en dos "Selva" (localidades 13, 15, 17, 18, 20) y "Pacífico" (14, 16, 19; Fig. 1). Con esta nueva agrupación se estimó la distancia no segada de Nei, observándose la mayor distancia entre Selva-Caribe (0.523) y Pacífico-Caribe (0.421) y la más baja entre Selva-Golfo de México (0.099), con valores intermedios las otras comparaciones posibles (0.313-0.227). Se estimó también la F_{ST} , donde las comparaciones estadísticamente significativas fueron Selva-Caribe (0.126) y Golfo de México-Caribe (0.056).

Cuadro 3. 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	0.050
	4 (100)	0.045	0.045	0	0
	5 (103)	0.136	0.045	0	0.150
	6 (106)	0.364	0.545	0.800	0.350
	7 (109)	0	0	0.100	0.300
	8 (112)	0	0.091	0	0.150
	9 (115)	0	0.045	0.100	0
Ory21	1 (151)	0.364	0.091	0.100	0.150
	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	0.200	0.300
	7 (175)	0.045	0.091	0.400	0.100
	8 (178)	0.136	0.045	0	0.150
	9 (181)	0.091	0.091	0.200	0.100
	10 (184)	0.091	0.091	0	0
	11 (187)	0	0.045	0	0.100
	12 (190)	0	0.045	0.100	0.050
	13 (196)	0.045	0.182	0	0
	14 (199)	0	0	0	0.050
Ory26	1 (097)	0.864	0.682	0.200	0.750
	2 (100)	0.091	0.136	0.600	0.050
	3 (103)	0	0	0	0.050
	4 (106)	0	0.045	0	0.100
	5 (109)	0	0	0	0.050
	6 (115)	0	0	0.100	0
	7 (124)	0.045	0	0	0
	8 (127)	0	0.091	0	0
	9 (130)	0	0	0.100	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	0.100
	4 (136)	0.227	0.045	0.200	0.050
	5 (139)	0.273	0.318	0.300	0.150
	6 (142)	0	0.136	0.100	0.150
	7 (145)	0	0.136	0.300	0.250
	8 (148)	0.136	0.091	0.100	0.250
	9 (151)	0	0.045	0	0
	10 (157)	0	0	0	0.050
Locus Ory60	alelo (pb)	Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
	1 (126)	0.045	0.091	0.100	0
	2 (129)	0.045	0	0	0.050
	3 (135)	0.091	0.045	0.100	0.100
	4 (138)	0.182	0.136	0	0.100
	5 (141)	0.045	0.091	0	0.100
	6 (144)	0.045	0.182	0.100	0.200
	7 (147)	0.227	0.091	0.200	0.050
	8 (150)	0.136	0.045	0	0.100
	9 (153)	0.091	0.136	0.400	0.200
	10 (156)	0.045	0.091	0.100	0.050
	11 (159)	0	0	0	0.050
	12 (165)	0	0.091	0	0
13 (168)	0.045	0	0	0	

Cuadro 4. Valores de diversidad genética para cada población por locus y para el total de las poblaciones 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	0.540	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.

Cuadro 5. Abajo de la diagonal se muestran las distancias genéticas de Nei y, en paréntesis, los valores pareados de F_{ST} , mientras que arriba de la diagonal aparecen las distancias geográficas en km y, en paréntesis, el número de migrantes M entre poblaciones de *Oryzomys couesi*.

Poblaciones	Chiapas	Campeche	Quintana Roo	Yucatán
Chiapas	-	448.4 (63.2)	602.3 (3.3)	795.3 (15.5)
Campeche	0.091 (0.007)	-	254.3 (8.9)	346.8 (94.5)
Quintana Roo	0.584 (0.135*)	0.283 (0.053)	-	328.7 (5.1)
Yucatán	0.172 (0.031)	0.101 (0.005)	0.433 (0.088*)	-

* ($P < 0.05$) con corrección de Bonferroni secuencial

Estructuración filogeográfica. De los 884 pb de cyt b secuenciados, 47 sitios fueron variables y 27 fueron parsimoniosamente informativos. Se encontraron 18 haplotipos para la muestra total (Campeche, Chiapas y Cozumel). Se encontró un valor promedio alto de diversidad haplotípica $h = 0.939$ y bajo de diversidad nucleotídica $p = 0.010 (\pm 0.002)$; el número promedio de diferencias nucleotídicas fue $k = 8.019$. La mayor diversidad nucleotídica por población se encontró en Chiapas (0.017 ± 0.005), seguida de Campeche (0.011 ± 0.002) y la menor en Cozumel (0.005 ± 0.001); ésta última fue significativamente diferente a las otras ($P < 0.05$). Respecto a la divergencia, las poblaciones de Cozumel y Campeche fueron las más similares ($D_{xy} = 0.009$), mientras que ambas presentaron una mayor divergencia respecto a la de Chiapas (0.015 con Cozumel y 0.019 con Campeche).

El modelo al que se ajustaron las secuencias fue el Hasegawa, Kishino y Yano (HKY; Hasegawa et al., 1985). En el árbol de neighbor-joining se observó que los valores de bootstrap fueron bajos en general y las

distancias genéticas entre muestras fueron pequeñas, incluso muchos haplotipos fueron idénticos. Cozumel presentó varios haplotipos, pero con un bajo número de sustituciones nucleotídicas y poca distancia entre ellos (Fig. 2), sin constituir un grupo monofilético. Las muestras de Chiapas fueron las más distanciadas y con valores más altos de bootstrap, mientras que las de Campeche tampoco formaron un grupo monofilético y se encontraron cercanas a muestras de Cozumel o de Chiapas. Por otro lado, las muestras de Chiapas formaron dos clados separados, uno de ellos relacionado con una muestra de Campeche (CAM2), y a su vez externo respecto al primer grupo de Cozumel, y otro clado con dos individuos más distanciados.

En la red mínima de haplotipos se observó un grupo central de seis muestras de Cozumel idénticas del cual parten varios haplotipos separados por 1 o 3 pasos mutacionales (Fig. 3). Otras muestras de Cozumel quedaron más alejadas y formaron un segundo grupo. Todas las muestras de Campeche quedaron más cercanas a las muestras isleñas que a las de Chiapas, pero gene-

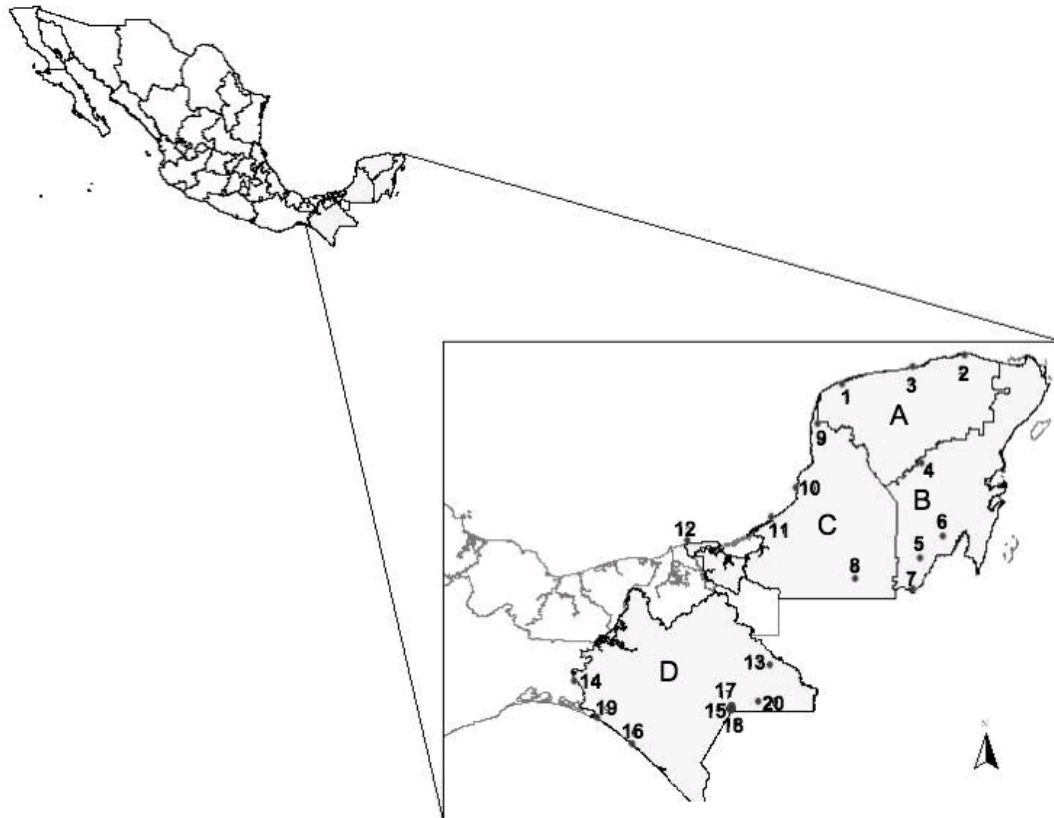


Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de las muestras de museo y de campo de *Oryzomys couesi* en los estados de Yucatán (A), Quintana Roo (B), Campeche (C) y Chiapas (D). El nombre de las localidades se muestra en el Cuadro 1 (Mejía-Puente, 2007).

ralmente separadas por varios pasos mutacionales. En particular, sólo una muestra de Campeche (CAM1) quedó unida al resto de las de Cozumel por un paso mutacional, la cual corresponde a la que geográficamente está más cercana a la isla. Tres muestras de Chiapas (CHI1, CHI2, CHI3) quedaron unidas por 5 pasos mutacionales al grupo central de Cozumel; otras dos muestras de Chiapas (CHI4 y CHI5) formaron una red aislada y separada del resto (> 12 pasos mutacionales); estas muestras son las mismas que en el árbol de NJ formaron un clado más distanciado y separado del resto de las muestras de Cozumel y Campeche.

DISCUSIÓN

A pesar de tener un tamaño de muestra pequeño, las cuatro poblaciones de *O. couesi* presentaron altos valores de diversidad genética, todos los loci fueron 100%

polimórficos y el número promedio de alelos observados fue alto (11.2). Se encontró una desviación significativa de las proporciones de Hardy-Weinberg (H-W) para las poblaciones de Chiapas y Campeche debido a una deficiencia de heterocigos, mientras que Quintana Roo y Yucatán se encontraron en equilibrio. Una causa común de la deficiencia de heterocigos es la presencia de alelos nulos, los cuales no amplifican en el PCR, ya sea porque las condiciones del PCR no son las ideales o porque la región del primer en el locus presenta mutaciones que inhiben la unión. Como resultado, algunos heterocigos son registrados como homocigos ya que algunos alelos no amplifican en ciertos individuos (Ehrich y Stenseth, 2001; Selkoe y Toonen, 2006). Sin embargo, dado que la deficiencia de heterocigos no se observó 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

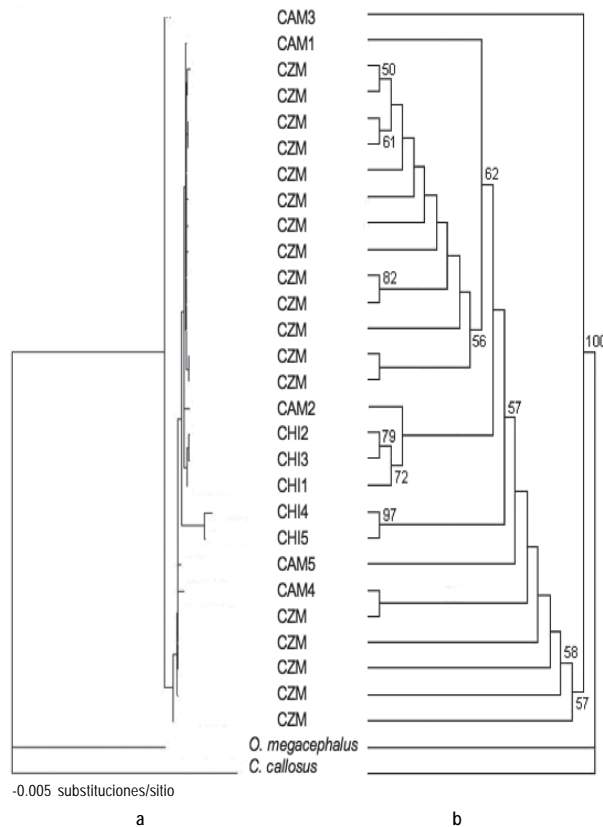


Figura 2. Árbol de neighbor-joining de muestras de Cozumel (CZM), Campeche (CAM) y Chiapas (CHI). a) filograma, b) cladograma rectangular. Valores de bootstrap (> 50%) sobre las ramas (modificado de Vega, 2006).

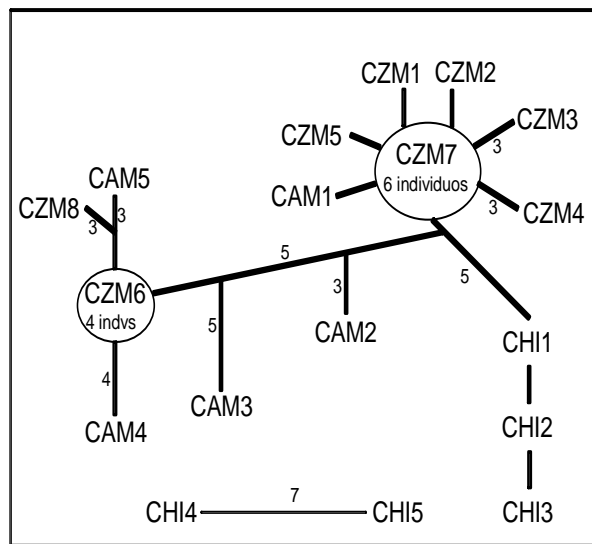


Figura 3. Red mínima de haplotipos de las muestras de Campeche (CAM), Chiapas (CHI) y Cozumel (CZM). Los números a los lados de las líneas que unen haplotipos corresponden al número total de pasos mutacionales; donde no se indica un número, implica un solo paso mutacional (modificado de Vega, 2006).

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 homocigos que los esperados bajo el equilibrio de H-W. Este fenómeno se conoce como “efecto Wahlund” y también es una causa común de la deficiencia de heterocigos (Trizio et al., 2005; Selkoe y Toonen, 2006). En nuestro estudio, dado el tamaño de muestra pequeño, 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 (e. g. las poblaciones se encuentran subdivididas). Asimismo, se encontró un nivel bajo de endogamia en las poblaciones (F_{IS}); si existiera 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); en este caso ninguno de los loci presentó ligamiento.

La diversidad genética alta también se aprecia en el número de alelos raros, donde Chiapas presentó el valor más alto (6 alelos), seguida por Yucatán y Campeche (5). Asimismo, 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 observada, también fueron altos (de 0.706 a 0.785), los cuales son comparables con valores encontrados para roedores múridos amenazados (*O. couesi cozumelae*, $H_E = 0.639-0.792$, Vega et al., 2007; *Microtus oeconomus*, $H_E = 0.570-0.760$, Van de Zande et al., 2000; *Oryzomys argentatus*, $H_E = 0.54-0.76$, Wang et al., 2000), 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). La dinámica poblacional de *O. couesi* puede estar relacionada con la alta diversidad encontrada para la especie. Esto es, los cambios ambientales a lo largo del año comúnmente afectan las densidades poblacionales, haciendo que éstas aumenten o disminuyan durante la época de lluvias y de secas, respectivamente. Se conoce que dicha estacionalidad ambiental puede afectar 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 frecuentes las tormentas tropicales y huracanes, que 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 observaron Vega et al. (2007) para las poblaciones de *O. couesi cozumelae*.

Se encontró estructuración genética en las poblaciones de *O. couesi*, aunque no como inicialmente se esperaba. Quintana Roo presentó los valores más altos de distancia genética con respecto al resto de las poblaciones y no hubo correlación entre la distancia geográfica y la genética. En concordancia con lo anterior, también se observó que Quintana Roo difirió significativamente de Chiapas y Yucatán con base en los valores de F_{ST} . La fragmentación del hábitat es uno de los principales factores que influyen en la diferenciación genética entre individuos y poblaciones, sin embargo, las consecuencias de la fragmentación pueden variar dependiendo del uso del hábitat por las especies, así como de sus características de conducta y dispersión. 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. *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 éstas evitaría su diferenciación. Sin embargo, son 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 considera-

bles que pudieran actuar como barreras geográficas. Los resultados observados en cuanto a diferenciación con la agrupación de las muestras con base en el tipo de vegetación y ubicación geográfica de los sitios de colecta, concuerdan con los obtenidos previamente, ya que Quintana Roo (Caribe) fue de nuevo la población más diferenciada. Es interesante señalar que las dos poblaciones en que se agruparon las muestras de Chiapas (Selva y Pacífico) también mostraron diferenciación genética, 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 (4,080 msnm). Este patrón de diferenciación se ha observado para especies del género *Tylomys* (Espinoza et al., 2006).

Dentro de la provincia biótica RTS en que se circunscribe nuestro estudio, existen tres gradientes importantes: latitudinal, de temperatura y de humedad (Arita y Vázquez-Domínguez, 2003; Orellana et al., 2003). Existe una marcada variación en la precipitación pluvial, así como un gradiente pluviométrico significativo, ya que recibe 2,000 mm de lluvia anual hacia el sursuroeste, disminuyendo hacia la parte noroeste de Yucatán (Sisal-Progreso) hasta llegar a los 500 mm o menos, 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 ello se tiene una gran variación de tipos de vegetación, desde selvas altas perennifolias en el extremo sur de la península, hasta 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 *O. couesi*, disminuyendo el flujo génico y favoreciendo la diferenciación entre las poblaciones de Quintana Roo y Yucatán, cada una de las cuales pareciera (bajo estas condiciones) estar ubicada en los extremos de un conjunto de componentes naturales que, a su vez, muestran atributos que le son propios al territorio de la península de Yucatán.

Los resultados de secuencias son concordantes con lo descrito sobre estructuración a partir de microsatélites. Las poblaciones de Cozumel, Campeche o Chiapas no formaron grupos monofiléticos en el árbol de NJ. En la red mínima de haplotipos también se observa que las muestras de Cozumel no forman una red separada de las muestras de Campeche y de Chiapas, aunque sí respecto a las muestras de Chiapas provenientes de la costa del Pacífico e istmo de Tehuantepec. Es interesante resaltar que la muestra de Campeche genéticamente más cercana a las de Cozumel es la que geográficamente también se encuentra más cercana. Asimismo, los haplotipos de Chiapas quedaron siempre más distanciados, en especial las dos muestras de la costa Pacífica e istmo de Tehuantepec que formaron una red separada, y esto puede deberse, por un lado a las barreras geográficas en Chiapas, y por otro a la mayor distancia y aislamiento geográfico respecto a Campeche y Cozumel. En la red se observó una distribución en forma de estrella a partir del genotipo más común de Cozumel y que se asocia a otros haplotipos de la isla, y que generalmente se relaciona con eventos de rápida expansión (Clement et al., 2000). Estos datos sugieren, como era de esperarse, que el origen de la población de la isla ocurrió a partir de la migración de *O. couesi* proveniente de la península de Yucatán. También, la presencia de dos grupos separados de muestras de Cozumel en la red sugieren la posibilidad de varios eventos de colonización continente-isla (Rowe et al., 2004) indudablemente, es necesario ampliar la muestra de *O. couesi* peninsular y continental para determinar el patrón filogeográfico de la especie y evaluar con precisión el origen de la población isleña.

Aunque se ha reportado que *O. couesi* presenta una distribución muy amplia y se le ha considerado como una especie abundante en el país (Ceballos y Miranda, 2000; López y Medellín, 2005), durante los años 2004-2006 el éxito de captura de *O. couesi* en la península de Yucatán ha sido muy bajo, a pesar de el gran esfuerzo de muestreo que ha realizado nuestro grupo de trabajo. 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, en 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 registros 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.

CONCLUSIONES

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. 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 y, más importante, otorga especial importancia de conservación a la especie, por lo menos en el sureste de México.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Gerardo Rodríguez, Tania Gutiérrez, Gabriel Granados y Elisa Fuentes por su participación en el trabajo de campo. Nuestro gran agradecimiento para Fernando A. Cervantes de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM y a Eduardo Espinoza y Consuelo Lorenzo de la Colección de Mamíferos de El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, por amablemente proporcionarnos muestras de tejidos. La presente investigación recibió apoyo financiero del Fondo Sectorial de Investigación Ambiental Semarnat-Conacyt (Semarnat-2002-C01-0571) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Papiit IX238004 e IN215205) para E.V.D., así como becas de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (181844) y DGEP, UNAM para R.V. y beca de licenciatura para A.M.P (Papiit IN215205).

LITERATURA CITADA

- Amos, W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Proceedings of the Royal Society series B* 353: 177-186.
- Arita, H. T. y E. Vázquez-Domínguez. 2003. Fauna y la conformación de la provincia biótica yucateca: biogeografía y macroecología. *In* Naturaleza y sociedad en el área maya, P. Colunga-GarcíaMarín y A. Larqué (eds.). Academia Mexicana de Ciencias-CICY, Mérida. p. 69-80.

- Avise, J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge. 447 p.
- Balloux, F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.
- 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. *In* Naturaleza y sociedad en el área maya, P. Colunga-García Marín y A. Larqué (eds.). Academia Mexicana de Ciencias-CICY, Mérida. p. 53-68
- Ceballos, G. y G. Oliva (coords.). 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 986 p.
- 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. México. 436 p.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- 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.
- 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. 315 p.
- 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. *In* Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro, E. Vázquez-Domínguez y D. J. Hafner (eds.). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 32, Albuquerque, Nuevo México. p. 47-54.
- 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. *In* Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución, T. P. Ramoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (comps.) Instituto de Biología, UNAM, México. p. 315-352.
- Freeland, J.R. 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons, Ltd., Inglaterra. 388 p.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Tercera edición. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 565 p.
- Hasegawa, M., H. Kishino y T. Yano. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Hillis, D.M., C. Moritz y B. K. 1996. Mable. Molecular systematics. Segunda edición. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 615 p.
- 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.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics* 20: 91-94.
- López, X. y R. A. Medellín. 2005. *Oryzomys couesi* (Alston, 1877). *In* Los mamíferos silvestres de México, G. Ceballos y G. Oliva (coord.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica. México, D. F. p. 709-710.
- Loxterman, J. L., N. D. Mocrief y R. D. Dueser, 1998. Dispersal abilities and genetic population structure of insular and mainland *Oryzomys palustris* and *Peromyscus leucopus*. *Journal of Mammalogy* 79: 66-77.

- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mejía-Puente, A. 2007. Diversidad genética de *Oryzomys couesi* en la península de Yucatán, México. Tesis Licenciatura, Universidad de Guadalajara, México. 57 p.
- 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.
- Moritz, C. 1994. Application of mitochondrial DNA analysis on conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3: 401-411.
- 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 Natural Academy of Sciences USA* 70: 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. In *Naturaleza y sociedad en el área maya*, P. Colunga-GarcíaMarín y A. Larqué (eds.). Academia Mexicana de Ciencias-CICY, Mérida. p. 37-52.
- Park, K. y J. Lee. 2003. Dealing with carryover contamination in PCR: an enzymatic strategy. In *PCR Primer: A laboratory manual*, C. W. Dieffenbach y G. S. Dveksler (eds.) 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 520 p.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- 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. 260 p.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Rowe, K. C., E. J. Heske, P. W. Brown y K. N. Paige. 2004. Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 101: 10355-10359.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer, y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- 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, Switzerland.
- 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.
- Smith, M. F. y J. L. Patton. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149-177.
- Smith, T. B. y R. K. Wayne. (eds.). 1996. *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press, Oxford. 483 p.
- 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: 627-632.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony, (and other methods) 4.0 beta version. Illinois Natural History survey, Champaign, Illinois.
- 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 y D. Foster. 2001. Deforestation in the southern Yucatán 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. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In *Protected areas and the regional planning imperative in North America*, G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky y C. Vásquez (eds.). University of Calgary Press, Calgary, Canadá. p. 369-378.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. In *La ecología molecular de plantas y animales* (L. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, compiladores), INE/Conabio, México, D. F. p. 441-466.
- Vázquez-Domínguez, E. y R. Vega. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? In *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*, E. Vázquez-Domínguez y D.J. Hafner (eds.). New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 32, Albuquerque, Nuevo Mexico. p. 67-73.
- Vázquez-Domínguez, E., D. Piñero y G. Ceballos. 1999. Linking heterozygosity, demography, and fitness of tropical populations of *Liomys pictus*. *Journal of Mammalogy* 80: 810-822.
- 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: 2069-2078.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T. A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 277-297.
- Vega, R. 2006. Estructura y diversidad genética de *Oryzomys palustris cozumelae* de la isla de Cozumel. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, UNAM, México. 55 p.
- Vega, R., E. Vázquez-Domínguez, A. Mejía-Puente y A. Cuarón. 2007. Unexpected high levels of genetic variability and the population structure of an island endemic rodent (*Oryzomys couesi cozumelae*). *Biological Conservation* 137: 210-222.
- 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 y E. A. Gines-Candelaria. 2000. Polymorphic microsatellite loci of *Oryzomys palustris*, the marsh rice rat, in south Florida detected by silver staining. *Molecular Ecology* 9: 1931-32.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wüster, W., J. E. Ferguson, J. A. Quijada-Mascareñas, C. E. Pook, M. Da Graça Salomão y R. S. Thorpe. 2005. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology* 14: 1095-1108.
- 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.