



**REVISIÓN DEL ESTADO SISTEMÁTICO DE *Peromyscus*
furvus (RODENTIA: MURIDAE), MÉXICO a partir de los
genes mitocondriales ND3-ND4.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A:
ZAMIRA ANAHÍ AVILA VALLE

Directora: Dra Alondra Castro Campillo
Co-Directora: Livia León Paniagua

Enero 2005



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Fecha : 20/01/2005

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA de la alumna ZAMIRA ANAHI AVILA VALLE, matrícula 202385000, quien cumplió con los 186 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintiséis de enero del 2005 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

REVISION SISTEMATICA DE *Peromyscus furvus* (RODENTIA: MURIDAE) A PARTIR DE LOS GENES MITOCONDRIALES ND3-ND4.

Cabe mencionar que la aprobación del Examen de Grado tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 226 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

Secretario


DR. JOSE RAMIREZ PULIDO


DRA. AURORA ALONDRA CASTRO CAMPILLO

Vocal

Vocal


DRA. BLANCA ESTELA HERNANDEZ BAÑOS


DRA. VIRGINIA LEON REGAGNON

Vocal


M. EN C. LIVIA LEON PANIAGUA

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, D.F, 09340, Apdo. Postal 555-320-9000

Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax 5804-4876

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Zamira Anahí Ávila Valle

El día 26 de enero del año de 2005

Comité Tutorial

Tutor: Dra. Aurora Alondra Castro Campillo

Co-tutor: M. en C. Livia León Paniagua

Asesor: Dr. José Ramírez Pulido

Sinodal: Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Sinodal: Dra. Virginia León Rêgagnon

*“La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al
Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT.”*

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Alondra Castro Campillo, Jefa del Departamento de Biología de la UAM-Iztapalapa, por su apoyo y consejos a lo largo del desarrollo del trabajo.

A la M. en C. Livia León Paniagua, por brindarme su confianza, ayuda y apoyo en la realización del proyecto.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su apoyo y consejos en la elaboración de la tesis.

A la Dra. Virginia León Règagnon, por aceptar revisar y hacer comentarios a cerca del trabajo.

Al Dr. José Ramírez Pulido, por permitirme estar en la colección y por sus comentarios.

A Carlos Rosas Osorio, por su ayuda en la elaboración y obtención de algunos datos preliminares.

A Maggy, Gaby, Gaby Ibañez, Nanda, por su ayuda y paciencia en el laboratorio y su amistad.

A Juan Patiño, por su apoyo en el campo.

Al Dr. Manuel Castillo, a la Lic. Violeta Luna y al Lic José Atenco, por la paciencia, apoyo y orientación en la parte administrativa.

Finalmente, a los coordinadores de los proyectos: “Estudios biológicos de especies selectas de mamíferos silvestres. Fase I” dirigido por la Dra. Alondra Castro Campillo; “Mastofauna de Zonas Montanas de México del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias” a cargo de la M en C. Livia León Paniagua, y Aves y mamíferos del Bosque Mesófilo de Montaña” coordinado por el Dr. Alfonso Navarro Sigüenza, para lo cual se contó con el apoyo de CONACYT, SEP, DGAPA.

DEDICATORIA:

A todos aquellos que de alguna manera han sido partícipes de mi desarrollo como persona, amiga, pareja,..., hija.

A mi familia por ser la columna vertebral de mi vida. Por sus enseñanzas y su amor. Por ser lo primero y lo último que está a mi lado apoyando mis sueños y proyectos. La virtud más grande que posee es la fortaleza, por eso quiero dedicar este trabajos especialmente a mi abuela Rosario quien siempre es un símbolo de fuerza, unión, confianza...y a mi mamá por ser la persona más desesperadamente paciente para tolerar mi carácter y permitir que siga adelante con mis metas.

A mis amigos por que son como una segunda familia para mí. La amistad no se puede poner en una lista de nombres, pero si puede ser percibida por aquellos que comparten el mismo sentimiento que yo por ustedes, por eso en esta ocasión no me preocupa si me falta alguien o si alguien tiene que tener un lugar determinado. Lo único que si quiero recalcar es que dedico este trabajo a Godo, que, aunque no esté físicamente, siempre estará en mi recuerdo.

...GRACIAS

RESUMEN

Hall en 1968 determina que *Peromyscus fuvvus* es una especie monotípica, siendo *P. latirostris* y *P. angustirostris* sinonimias de la primera, a pesar de que él mismo indica que hay cierto grado de variación dentro de la especie. En trabajos posteriores, donde se analiza la situación de la especie a partir de aloenzimas (Harris y Rogers, 1999) y de citocromo *b* (Harris *et al.*, 2000), también se advierte un grado de variación entre las poblaciones que conforman a la especie. Sin embargo, en ninguno de ellos se aclara la situación sistemática de la especie. Por lo anterior, en el presente trabajo se realiza una revisión de la sistemática de *P. fuvvus* a partir de genes mitocondriales (ND3-ND4), que muestran la posible existencia de dos subpoblaciones a lo largo de su distribución. La primera correspondería a la población de Puerto de la Soledad, Oax. y la segunda incluiría a las poblaciones del centro de la distribución. Además, se observa una tercera población (La Esperanza, Oax.), la cual, aparentemente, pertenece a otra especie diferente.

Palabras clave: Sistemática molecular, ND3-ND4, diferenciación genética, bosque mesófilo de montaña

ABSTRACT

Hall, in 1968 determines that *Peromyscus fuvvus* is a monotypic species, being *P. latirostris* and *P. angustirostris* synonymies of the first one, although him indicates that there is certain variation grade inside the species. In later works, where the situation of the species is analyzed starting from aloenzimas (Harris and Rogers, 1999) and of cytochrome *b* (Harris *et al.*, 2000) studies, a variation grade is also noticed among the populations that conform to the species. However, in none of them works clears up the systematic situation of the species. For the above-mentioned, presently work is carried out a revision of the systematic state of *P. fuvvus* starting from mitochondrial genes (ND3-ND4). This genes show the possible existence of two subpoblaciones along its distribution. The first one would correspond the population of Puerto de la Soledad, Oax. and the second would include the central populations of their distribution. Also, a third population is observed (La Esperanza, Oax.), the one which, seemingly, it belongs to another different species.

Key words: Molecular systematic, ND3-ND4, genetic differentiation, cloud mountain forest.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVOS (General y particulares).....	15
HIPÓTESIS.....	15
MÉTODOS.....	16
A 1. Obtención de muestras: Piel.....	16
A 2. Obtención de muestras: tejidos.....	17
B. Análisis de laboratorio.....	17
C. Análisis de datos.....	23
RESULTADOS.....	25
A. Composición nucleotídica.....	25
B. Análisis de distancia.....	26
C 1. Árboles de Distancia: Neighbor-Joining (NJ)	29
C 2. Árboles de Distancia: Distancia: Minimum Evolution (ME).....	30
D. Análisis de parsimonia.....	33
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	39
LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Localidades grupo.....	12
Cuadro 2. Ejemplares depositados en colecciones nacionales.....	18

Cuadro 3. Ejemplares utilizados.....	18
Cuadro 4. Descripción de las técnicas moleculares.....	19
Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados.....	20
Cuadro 6. Matrices de distancia.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Peromyscus furvus</i>	6
Figura 2. Mapa de localidades.....	13
Figura 3. Análisis electroforético.....	22
Figura 4. Diagrama de la secuencia de los genes ND3-ND4.....	22
Figura 5. Porcentaje de la composición nucleotídica.....	26
Figura 6. Árboles de distancia (Neighbor-Joining).....	31
Figura 7. Árboles de distancia (Minimum Evolution).....	32
Figura 8. Árbol de parsimonia (ND3-RNAt-Arg).....	34
Figura 9. Árbol de parsimonia (ND4L 1ª parte de ND4).....	35

Revisión del estado sistemático de *Peromyscus furvus* (Rodentia: Muridae), México a partir de los genes mitocondriales ND3-ND4.

INTRODUCCIÓN

La Sistemática es el estudio de la diversidad de los organismos a través de sus relaciones de ancestría-descendencia (Wiley, 1981; Mayr y Ashlock, 1991). A lo largo del desarrollo de la Sistemática se han utilizado diversas maneras para esclarecer los patrones genealógicos entre los organismos. En los primeros trabajos en Sistemática, las comparaciones entre diversos taxones se hicieron a partir de caracteres cualitativos (morfológicos) y, posteriormente, se adicionaron los caracteres cuantitativos (morfométricos). En la actualidad se emplean además de los análisis morfométricos y morfológicos, cariológicos y enzimáticos, caracteres moleculares con el fin de hacer aproximaciones más puntuales. En ese contexto, surge el concepto de especies ligadas, el cual se refiere a un linaje evolutivo cuyos límites están dados por fuerzas genéticas y ecológicas que crean comunidades con reproducción cohesiva (Hull, 1997, 1999; Templeton, 2001). Aunada a este concepto surge la evaluación sistemática a partir de árboles genéticos en donde se reconstruye la historia genealógica de la variación encontrada en una muestra de genes homólogos o de regiones de DNA con una baja o nula recombinación, por lo que potencialmente pueden abarcar la interfase entre evolución intra- o inter- específica (Avice, 2000; Templeton, 2001).

Por otro lado, gracias al uso de herramientas moleculares se pueden realizar estudios con más precisión dentro de diferentes grupos ya sea a nivel genérico o de especie, lo que nos permite evaluar y determinar los límites de especies, aunque la literatura y metodologías citadas bajo este esquema son pocos en la actualidad específicamente dentro del grupo de los mamíferos (Wiens, 1999). Las especies son la unidad fundamental de la cual parten estudios de tipo biogeográfico, ecológico, macroevolutivos, conservación entre otros y, por tanto, requieren de una mejor delimitación, lo que desemboca en la necesidad de emplear objetiva y rigurosamente métodos para delimitarlas (Sites y Marshall, 2003).

En el caso de mamíferos, son pocos los trabajos donde se evalúan los límites de alguna especie. Sin embargo, la necesidad de estudiar a los organismos a diferentes niveles de agrupamiento (i. e. especies, género, familia) y la aplicación de los métodos para delimitar especies en otros grupos de estudio, permite que se empiece a generar información particular para la mastozoología basada en caracteres tanto morfológicos como moleculares (Peppers *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2002; Gonçalves y de Oliveira, 2004; Jaarola *et al.*, 2004; Lim *et al.* 2004).

A partir de caracteres moleculares, la delimitación de especies puede determinarse utilizando aloenzimas, RNA's, DNA, proteínas, entre otros (Sites y Marshal, 2003). Desde la década de los 90's y hasta la actualidad los caracteres más usados son las comparaciones de secuencias de material genético, siendo los genes del DNA mitocondrial (DNAm_t) los más utilizados (Nieto-Montes de Oca y Llorente, 1994). De manera general, la importancia del DNAm_t radica en el arreglo de sus genes; posee una alta resolución para distinguir organismos cercanamente relacionados; su código ge-

nético particular; es fácil de secuenciar; es heredable vía materna, lo que anula la segregación alélica y no presenta recombinación (Darnell *et al.*, 1990; Li y Graur, 1991; Hillis *et al.*, 1996; Lodish *et al.*, 2003). Dentro del DNAm_t se encuentran genes que codifican para diversos complejos y que intervienen en la fosforilación oxidativa. Uno de los más importantes es el complejo I donde se encuentran los genes que codifican para el NADH. Estos genes (ND1-ND6) son considerados genes poco cambiantes, lo que permite, en cierta medida, hacer comparaciones entre organismos del mismo género y decidir si se trata de especies mono o politípicas como en algunos trabajos con roedores (Hogan *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1998; Tiemann-Boege *et al.*, 2000). Una de las regiones más estudiadas dentro de este complejo I es la comprendida por los genes ND3-ND4. Esta región ha sido utilizada en diversos estudios sobre relaciones filogenéticas de un gran número de vertebrados a nivel específico o de género, por ejemplo con tortugas marinas (Dutton *et al.*, 1996), lagartijas (Arévalo *et al.*, 1994) y serpientes (Forstner *et al.*, 1995; Parkinson *et al.*, 2000).

Además de conocer la biología propia del grupo de estudio, es importante conocer la historia evolutiva de la especie en un contexto geológico donde podemos incluir algunos datos de tipo biogeográfico. En este sentido, México está en una zona de transición muy importante, ya que estudios como el de Halffter (1965), la postulan como uno de los corredores más importantes que vinculan las Regiones Neotropical con la Neártica (norte y sur de América), denominándola como *Área de Transición Centroamérica-México*. Uno de los tipos de vegetación más controvertidos e interesantes dentro de esa área, por su importancia ecogeográfica, son los bosques mesófilos de montaña, los cuales son los más septentrionales de América (Luna-Vega *et*

al., 2001). Este tipo de bosque se ha caracterizado por poseer factores abióticos (clima, precipitación, temperatura, humedad y otros) muy representativos, por su alta biodiversidad y por su alto número de endemismos, así como por su distribución actualmente fragmentada (Rzedowsky, 1981, 1996). Debido a datos del registro fósil, que muestran una historia evolutiva larga y una gran cantidad de flora y fauna exclusiva, se considera que este tipo de bosque tuvo una distribución muy amplia y lo que ahora conocemos son sólo fragmentos relictos de la misma (Luna-Vega *et al.*, 1999; Rzedowsky, 1981, 1996). Se piensa que la conformación de los bosques mesófilos es anterior al Eoceno, pero que su origen se da a partir de la flora laurásica del Cenozoico temprano y de la flora gondwánica del Terciario, aunque esto último está más discutido (Rzedowsky, 1996). Lo que sí es claro es que tanto la flora como la fauna habitantes del bosque mesófilo de montaña, permiten considerarlo como centro de origen y de radiación de la biodiversidad entre las Regiones Neotropical y Neártica.

Estas características del bosque mesófilo de montaña, lo convierten en un área de particular interés para estudios filogenéticos de las especies que lo habitan; en especial, de las que son exclusivas (endémicas), o casi, de él como el ratón silvestre *Peromyscus furvus*, ya que el análisis de límites de especies de las poblaciones a lo largo de la distribución de la especie, pueden contribuir a la reconstrucción de los eventos históricos (geológicos y filogenéticos) involucrados en la diversificación de las poblaciones y a entender, en particular para esa especie, si se trata de un taxón mono o politípico.

ANTECEDENTES

El sigmodontino silvestre, *Peromyscus furvus* J. A. Allen y Chapman, 1897, se encuentra, junto con *P. mayensis* y *P. ochraventer* (Carleton, 1989), dentro del grupo *furvus* en el subgénero *Peromyscus* y se caracteriza por ser una de las especies de mayor tamaño dentro del género (229-300; 114-162; 26-33; 20-23), así como por presentar una coloración dorsal distintiva que varía de pardo obscura a negruzca, llegando a ser completamente melánica en algunos casos (Huckaby, 1980). Este ratón endémico de México (Ramírez-Pulido y Müdespacher, 1987; Cervantes *et al.*, 1994; Arita y Ceballos, 1997; Martínez-Coronel *et al.*, 1997), se distribuye en una estrecha franja a lo largo de la Sierra Madre Oriental (Fig. 1), desde el suroeste de San Luis Potosí hasta las montañas del norte de Oaxaca, a través del Eje Volcánico Transverso en los estados de Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz (Allen y Chapman, 1897; Dalquest, 1950; Hall y Kelson, 1959; Hall y Alvarez, 1961; Huckaby, 1980; Hall, 1981).

Tanto en la Sierra Madre Oriental como en el Eje Neovolcánico Transversal y hasta la Sierra Norte de Oaxaca, la especie se distribuye desde los 226 y hasta los 2960 m y aunque preferentemente habita entre los 1300 a los 2950 m en el bosque mesófilo de montaña, el cual se encuentra de los 600 a los 2700 m. También se distribuye en bosques de coníferas, principalmente de pino (*Pinus* sp.), abetos (*Abies religiosa*) y enebros (*Juniperus* sp.), así como en bosque mixto de pino-encino (*Pinus* sp.-*Quercus* sp.), los cuales se extienden de los 226 y hasta los 2960 m (Rzedowski, 1981). Asimismo, la especie ocupa la vegetación secundaria a esos bosques, constituida por cafetales (*Coffea* sp.), siempre que el estrato herbáceo sea denso (Musser,

1964; Hall, 1968). Según García (1973), los climas presentes en estas comunidades vegetales son el templado-húmedo con lluvias todo el año, C(fm), y el templado sub-húmedo con lluvias en verano, C(w).

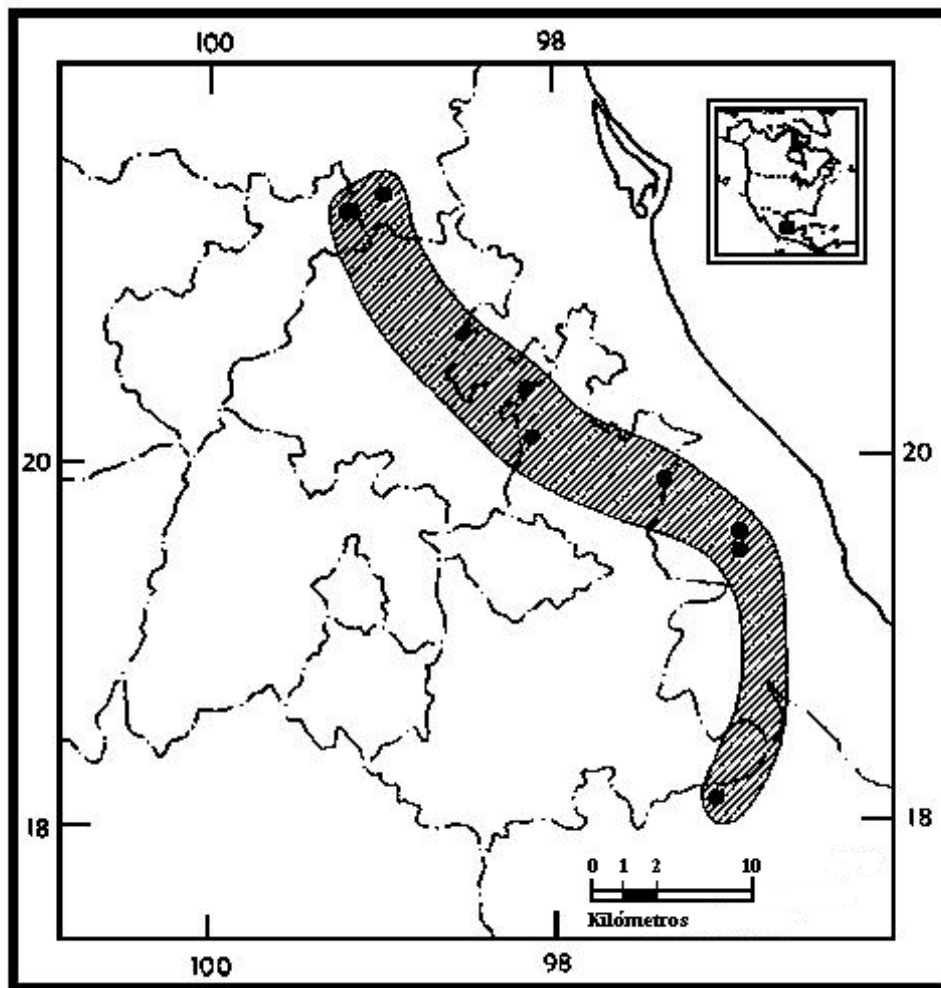


Figura 1.- Distribución de *Peromyscus fuvus* (Hall, 1981).

A lo largo del tiempo, la especie ha sufrido diversos cambios taxonómicos. Originalmente, fue descrita como *Peromyscus fuvus* en 1897 por Allen y Chapman con ejemplares de Xalapa, Veracruz, como un ratón de pelaje pardo oscuro en el dorso,

más negruzco hacia la línea media, rojizo hacia los lados y con el vientre grisáceo. Las patas delanteras con el dorso blanco y las palmas color carne, mientras que las patas traseras son grises con las palmas negruzcas; en ambas el pelaje es delgado. Las orejas son estrechas y están cubiertas con pelo corto y fino de color pardo oscuro. La cola es estrecha y de color pardo oscuro, más clara abajo que arriba, con la punta frecuentemente blanquizca. En promedio, las medidas externas (mm) son 270 de longitud total, 131 de cola vertebral, 28 de la pata trasera y 23 de oreja. El cráneo es grande, fuerte y pesado con el rostro muy ancho y distendido anteriormente, lo que le da una forma de campana a la nariz. La anchura de la punta de los nasales iguala generalmente en los adultos a la anchura interorbitaria.

Posteriormente, Dalquest (1950, 1953) describió a *Peromyscus latirostris* con ejemplares de Apetzco, San Luis Potosí, y caracterizó a la especie como un ratón grande que sólo es excedido en talla por los miembros más grandes del género *Peromyscus*. Los dientes son grandes y fuertes, presentando desarrollo de cúspides externas accesorias en el 1º y 2º molares. El cráneo es grande, pero sin rebordes o crestas en el margen del área interorbital. El rostro es grande y ancho con lados paralelos, la cola es bicolor. Sin embargo, la característica más clara es la expansión anterior de los nasales, por lo que lo llama ratón de nariz ancha (*latirostris*).

Finalmente, Hall y Álvarez (1961), a partir de ejemplares de Zacualpan, Veracruz, describen a *Peromyscus angustirostris*, como un ratón de tamaño grande con el dorso casi pardo oscuro, los costados aproximadamente canela y el vientre blanquecino. La cola es más larga que la cabeza y el cuerpo juntos. Los nasales son aguzados posteriormente y angostos anteriormente. En el primer molar maxilar (M1), el límite

interno del primer pliegue primario es profundo y en forma de puente cuando los dientes son usados considerablemente; además, el mesostílido es prominente y el cíngulo está solo delicadamente desarrollado. Las medidas externas promedio de la especie son 267 (251-275), 139 (132-145), 29.5 (29-30), 21.2 (21-22).

En 1964, Musser menciona que encontró alto grado de superposición en la variación de los caracteres de los dientes, forma del cráneo, tamaño de las bulas y longitud de la cola, así como en la coloración del pelaje entre ejemplares de *Peromyscus fuvus* y *P. angustirostris* de los estados de Hidalgo, Veracruz y Puebla, por lo que sugiere que se considere a la segunda en sinonimia con la primera, pero apunta que no examinó ejemplares de *P. latirostris*. Es Hall (1968) quien revisa los tres taxones y establece formalmente la sinonimia entre ellos bajo el nombre de *P. fuvus*, haciendo a ésta monotípica. Sin embargo, Hall (1968), desafortunadamente no estableció con claridad los criterios que usó en su comparación interpoblacional y sus conclusiones más bien son de carácter cualitativo. No obstante, destaca la interpretación que hace sobre la variación individual, ya que menciona que ésta puede ser referida a las distinciones entre *P. latirostris* y *P. angustirostris* por cuanto a la expansión anterior de los nasales y a la mayor profundidad del primer pliegue secundario del segundo molar de la mandíbula (m2), respectivamente. Además, tomando algunos de los caracteres que usa para la variación individual, en su planteamiento de la variación geográfica, Hall (1968) menciona que los individuos del área norteña (San Luis Potosí) tienen mayor talla en promedio que los del área sureña (de Xalapa y Xico, Veracruz), siendo los del área central (de Huayacocotla en Veracruz hasta Huauchinango en Puebla), los de menor talla. También, dentro de la variación interpoblacional, Hall

(1968) señala diferencias en la forma prevaleciente del cráneo y afirma que los ejemplares del área central tienen un cráneo cuadrado, mientras que los de las áreas extremas lo tienen redondo. Así, a primera vista, el trabajo de Hall (1968) presenta ciertas incongruencias con respecto a lo que se considera una especie monotípica (v. gr., aquella en la que la variación geográfica de los caracteres no es consistente, ni tiene la magnitud como para reconocer subespecies). Es decir, que mientras que por un lado reconoce de manera cualitativa cierta variación geográfica de caracteres, por otro lado, él mismo la considera deleznable y reúne tres especies, *Peromyscus fuscus*, *P. angustirostris* y *P. latirostris*, dentro de la primera, a la cual considera monotípica.

JUSTIFICACIÓN

Como resultado de los trabajos sobre la mastofauna del Eje Volcánico Transversal, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Norte de Oaxaca, en la Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana desde 1995 y del proyecto de Mastofauna de Zonas Montanas de México del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, UNAM desde 1984, se ha reunido una muestra importante de *Peromyscus fuvvus*. Asimismo, con la revisión de ejemplares alojados en colecciones extranjeras, se han advertido algunas diferencias fenotípicas que sugieren una mayor variación dentro de la especie que la que podría esperarse en una taxón monotípico; en particular, las poblaciones norteñas que coinciden con la denominación de *P. latirostris* (Dalquest, 1950, 1953), las cuales presentan mayores dimensiones que otras poblaciones atribuibles a *P. fuvvus*. Esta tendencia fue corroborada en un ejercicio prospectivo con algunos especímenes femeninos procedentes de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz, depositados en colecciones nacionales, por medio de un análisis de componentes principales sobre variables craneométricas.

Sin embargo, y de acuerdo a los resultados de Harris y Rogers (1999) y de Harris *et al.* (2000), esas diferencias no parecen ser consistentes con el nivel necesario de separación para considerar diferencias interespecíficas. En el primer trabajo, los autores examinaron la variación geográfica de 33 loci por medio de electroforesis horizontal en gel, usando ejemplares de siete localidades a lo largo de la Sierra Madre Oriental: Xilitla, S. L. P.; Tlalchinol, Higo.; Zacualpan, Ver.; El Potrero, Hgo.; Huauchinango, Pue.; Xalapa, Ver., y Puerto de la Soledad, Oax. En sus conclusiones señalan que las poblaciones atribuibles a *Peromyscus latirostris*, *P. fuvvus* y *P. angustirostris*

no representan grupos monofiléticos dentro de la segunda y que existe un alto grado de subdivisión poblacional, pero que bajo el concepto filogenético de especie (Wiley, 1981), sus resultados reafirman el estado monotípico de *P. furvus*.

Posteriormente, Harris *et al.* (2000) realizaron un estudio filogeográfico de la especie por medio de la secuenciación del citocromo *b* y obtuvieron 24 haplotipos a partir de 54 ejemplares de diferentes localidades analizadas en el trabajo anterior (Harris *et al.*, 1999), así como de ejemplares capturados en Metepec, Hgo. En ese trabajo los autores encuentran que las poblaciones de Oaxaca se separan, por lo que consideran que dentro de la especie existe un estatus con-específico; sin embargo no elevan explícitamente a las poblaciones de Oaxaca como independiente y las mantienen dentro de *P. furvus*, a la cual siguen considerando monofilética. Estos autores también concluyen que las poblaciones de *P. furvus* que se distribuyen en el área central de su distribución geográfica, presentan un alto nivel de diversificación, pero, como ya se dijo, no proponen alguna designación taxonómica que refleje sus hallazgos.

En contraposición, en mi trabajo de licenciatura (2002, datos no publicados), examiné la variación no geográfica y geográfica de *P. furvus*, por medio del análisis morfométrico de 19 variables craneales, obtenidas de 548 ejemplares procedentes de 166 localidades, agrupadas en 19 localidades grupo a lo largo de la Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transversal y Norte de la Sierra de Juárez, las cuales abarcan la distribución de la especie en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca (Cuadro 1; Fig 2). Los resultados de este trabajo aportan evidencias para reconocer tres taxones al nivel subespecífico *sensu* Mayr y

Ashlock (1991): el primero de ellos incluye a las poblaciones situadas al norte de la distribución de la especie en los estados de San Luis Potosí y Querétaro; el segundo corresponde a poblaciones que se encuentran en Puebla e Hidalgo y que presentan una distribución politópica; finalmente, el tercero incluye poblaciones de Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca. En cuanto a las designaciones taxonómicas, al primer taxón le correspondería el nombre de *Peromyscus furvus latirostris* y al tercero el de *Peromyscus furvus furvus*, mientras que sería necesario proponer un trinomio para el segundo.

Cuadro 1. Localidades Grupo (LG) designadas. En **LE's** se muestra la agrupación de las localidades específicas; en **LG** en número de localidad grupo; en **Nombre** la localidad y estado asignado a cada una. Las LG marcadas en cursivas y negritas fueron analizadas por Harris y Roger (1999) y Harris *et al.* (2000).

LE's	LG	Nombre	LE's	LG	Nombre
1-17	1	<i>Xilitla, S. L. P.</i>	86, 88, 89, 91	11	Las Minas, Ver.
18-22, 24	2	Santa Inés, Qro.	87, 90, 92-101	12	Naolinco, Ver.
23, 25, 27-31, 34-39	3	<i>Tlanchinol, Hgo.</i>	102-117	13	<i>Xalapa, Ver.</i>
26, 32, 33, 40-44	4	Otongo, Hgo.	118-120	14	Ixhuacán de los Reyes, Ver.
45-52	5	Molango, Hgo.	121-128	15	Coscomatepec, Ver.
53-58	6	<i>Zacualpan, Ver.</i>	129	16	Tequila, Ver.
59-69	7	<i>Tenango de Doria, Hgo.</i>	130	17	Tebanca, Ver.
70, 71	8	Xicotepec de Juárez, Pue.	131-159	18	<i>Puerto de la Soledad, Oax.</i>
72-82	9	<i>Huahuchinango, Pue.</i>	160-166	19	La Esperanza, Oax.
83-85	10	Zacapoaxtla, Pue.			

En virtud de las discrepancias, entre los distintos estudios sistemáticos de *Peromyscus furvus*, en este proyecto se propone examinar las relaciones que guardan las poblaciones consideradas dentro de la especie a lo largo de su distribución geográfica, con base en la utilización de los genes mitocondriales ND3, RNAt-Arg, ND4L y la primera parte del gen ND4, usando ejemplares de algunas de las localidades examinadas anteriormente (Ávila-Valle, 2002) para evitar la exclusión de poblaciones que ya han tenido una denominación (v. gr., *P. latirostris*, *P. angustirostris* y *P. furvus*) o que no la tienen (v. gr., las poblaciones politópicas correspondientes al se-

gundo taxón en ese trabajo). En este caso, se usaron tejidos (hígado, músculo, etc.) o pieles de ejemplares recolectados en el campo y/o depositados en colecciones científicas. La técnica empleada para el presente trabajo tiene la ventaja de proveer gran cantidad de caracteres informativos en menor tiempo y, asimismo, permite el uso de muestras relativamente pequeñas sin pérdida significativa de información relevante (León Paniagua, *comp. pers.* noviembre, 2002).

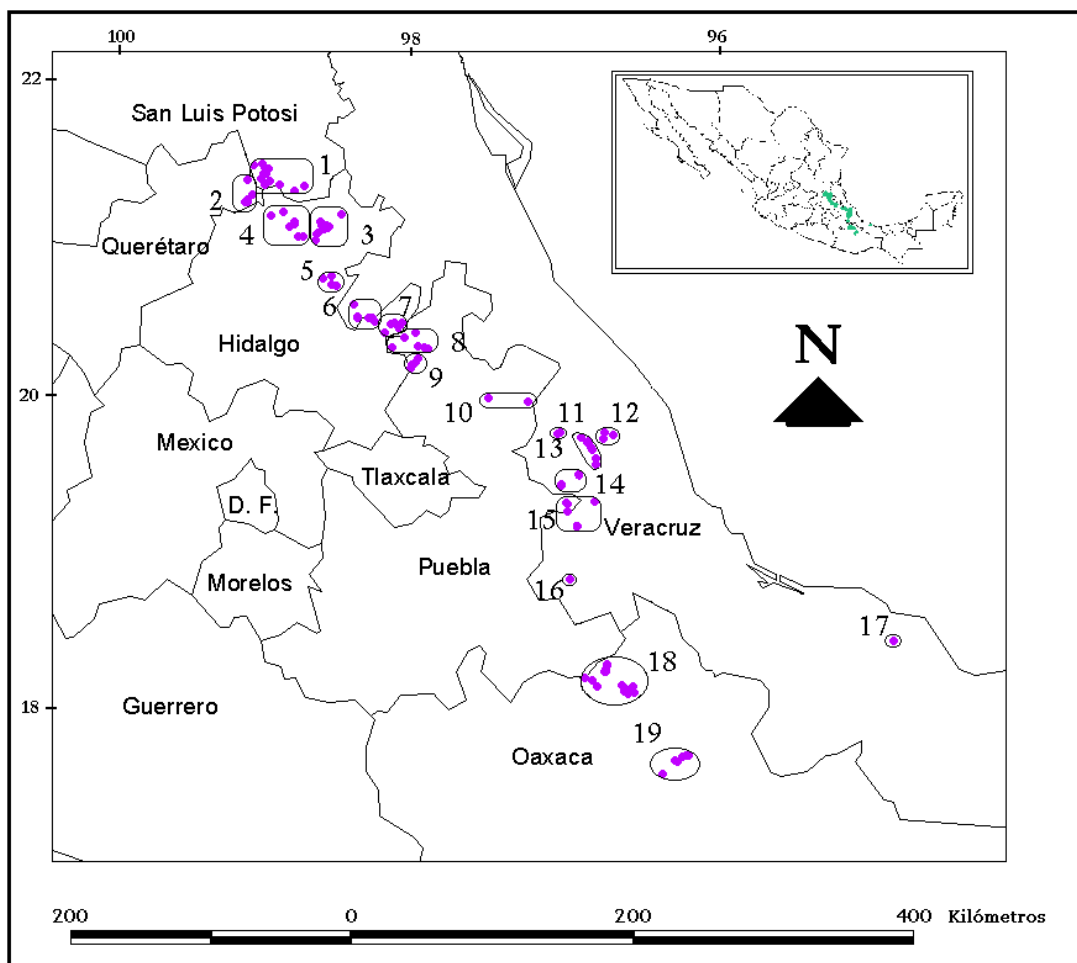


Figura 2.- Mapa de *Peromyscus fuvus*. Para ver el nombre de la localidad grupo (LG) referirse al cuadro 1.

Finalmente, cabe mencionar que este protocolo forma parte de una colaboración entre la Dra. Alondra Castro Campillo (Laboratorio de Mamíferos), el Dr. José Ramírez Pulido (Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana), ambos adscritos al Departamento de Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y la M. en C. Livia León Paniagua, adscrita al Área de Mastozoología del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Asimismo, esta tesis forma parte del proyecto aprobado por el Consejo Divisional DCBS, “Estudios biológicos de especies selectas de mamíferos silvestres. Fase I”, a cargo de la Dra. Alondra Castro Campillo. Además, se contó con el apoyo de la Mtra. León y de la Dra. Blanca E. Hernández Baños a través del proyecto de “Aves y mamíferos del Bosque Mesófilo de Montaña” a cargo del Dr. Alfonso Navarro.

OBJETIVOS

General:

Esclarecer las relaciones filogenéticas de las poblaciones consideradas bajo la designación de *Peromyscus fuvvus* a lo largo de la Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transversal y norte de la Sierra de Oaxaca.

Particulares:

1. Realizar un análisis filogenético de la especie con base en los genes mitocondriales ND3-ND4.
2. Establecer la variación genética de la especie.
3. Determinar los límites de especie de *Peromyscus fuvvus*.
4. Establecer si *P. fuvvus* es una especie monotípica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ho: Si los datos moleculares no muestran una variación genética que permite observar procesos de diversificación génica reconocibles y congruentes con la distribución geográfica de la especie, entonces toda el área de distribución debe ser considerada como una sola unidad de historia.

Ha: Si los datos moleculares muestra la existencia de un patrón relacionado con una diversificación génica y la distribución geográfica de la especie, a lo largo del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental y Sierra Norte de Oaxaca, entonces, se puede establecer la presencia de varias entidades en *P. fuvvus*.

METODOS

A. Obtención de muestras

En el cuadro 2 se muestra la relación de los ejemplares depositados en las cinco colecciones nacionales [Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAMI = 265); Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias (MZFC = 158) e Instituto de Biología (CNM = 150), Universidad Nacional Autónoma de México; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB = 107); Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Veracruz (UV = 77)]. Para realizar la extracción de DNAm, se consideraron dos opciones: extracción a partir de dedo y/o piel en ejemplares de colecciones y extracción a partir de tejidos de órganos internos (hígado, corazón y riñón) en ejemplares capturados en el campo o depositados en colecciones (cuadro 3).

1. Piel (dedos)

En México y en los Estados Unidos, existen 1073 ejemplares de *Peromyscus furvus*, procedentes de las localidades analizadas por Ávila-Valle (2002), de los cuales se escogieron algunos para su inclusión en la obtención de DNAm a partir de piel. Los ejemplares seleccionados se encuentran depositados en la Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana y en la colección de mamíferos del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Para acceder a los ejemplares, se consiguió la autorización del curador de esta colección, dando los créditos en las presentaciones o publicaciones resultantes. Para obtener las muestras de dedo y piel y estandarizar la técnica de extracción, se consideró un número de 6

ejemplares para la localidad de Santa Inés, Qro. y 3 para La Esperanza, Oax. de donde se obtuvo una muestra pequeña de piel (5x5 mm) y la primer falange del 2º dedo de las patas delanteras, por ser estructuras o áreas que no comprometen el uso de caracteres taxonómicos y que dañan en menor grado a los ejemplares.

2. Tejido

La colección de donde se tomaron las muestras de tejidos internos (hígado, corazón y riñón) congelados fueron el MZFC de las localidades grupo (LG's) de Tenango de Doria, Hgo., Zacualpan, Ver y Puerto de la Soledad Oax. y la UAMI de las LG's de Otongo y Tlanchinol, Hgo. (agosto del 2003). Se realizó una salida al campo hacia las LG's de Tequila y Tebanca, Ver. (octubre del 2003), de donde no se colectaron ejemplares. De los ejemplares recolectados en la salida al campo realizada del 11 al 15 de agosto del 2003 se tomaron muestras de tejido fresco (hígado, corazón y riñón) que se preservaron en nitrógeno líquido en el campo y posteriormente se depositaron en un ultracongelador a -72°C . Algunas muestras se conservaron en alcohol al 100%. Las muestras de tejido fueron depositados en la colección de tejidos del MZFC. Los esqueletos y pieles fueron depositados en la UAMI.

B. Análisis de laboratorio

Una vez en el laboratorio, se procedió con la estandarización de la técnica de extracción de DNA a partir de los dedos y tejidos (cuadro 4). Se utilizó dedos en el caso de los ejemplares de las localidades de Xilitla, S. L. P. y La Esperanza, Oax. depositados en la UAMI y de Santa Inés, Qro. de la colección del MZFC (fig. 4-A; cuadro 3).

Se utilizaron tejidos en el caso de los ejemplares de las localidades de Tenango de Doria, Otongo y Tlanchinol, Hgo., Zacualpan, Ver. y Puerto de la Soledad Oax.

Cuadro 2. Ejemplares de *Peromyscus furvus* depositados en colecciones nacionales (UAMI =Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana; MZFC = Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias (158) y CNM = Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; ENCB =Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; UV =Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Veracruz). En cada recuadro se indica el número de ejemplares existentes en cada colección y el total por localidad grupo (**LG**). La ✓ indica LG con tejidos.

LG	MZFC	UAMI	CNM	ENCB	UV	TOTAL
1 (Xilitla, S. L. P)	1	34	2	8	--	45
2 (Santa Inés, Qro.)	23	4	--	--	--	27
3 (Tlanchinol, Hgo.)	--	✓43	--	26	--	99
4 (Otongo, Hgo.)	--	✓27	--	--	--	27
5 (Molango, Hgo)	--	2	1	24	--	27
6 (Zacualpan, Ver.)	✓8	--	1	--	--	9
7 (Tenango de Doria, Hgo.)	✓42	3	--	8	--	53
8 (Xicotepc de Juárez, Pue.)	--	6	--	--	--	6
9 (Huauchinango, Pue.)	5	1	--	5	--	11
10 (Zacapoaxtla, Pue.)	--	9	--	--	--	9
11 (Las Minas, Ver.)	--	--	--	--	1	1
12 (Naolinco, Ver.)	--	34	6	3	33	76
13 (Xalapa, Ver.)	--	9	9	11	25	54
14 (Ixhuacán de los Reyes, Ver.)	--	34	--	--	8	42
15(Coscomatepec, Ver.)	--	28	1	9	--	38
16 (Tequila, Ver.)	--	--	1	--	--	1
17 (Tebanca, Ver.)	--	--	--	--	--	--
18 (Puerto de la Soledad, Oax.)	✓7	2	95	--	--	104
19 (La Esperanza, Oax.)	--	30	1	--	8	39
TOTAL	86	259	117	94	75	661

Cuadro 3. Ejemplares de *Peromyscus furvus* utilizados para el análisis de caracteres moleculares. En **Ejemplar** está el número de catálogo y el acrónimo de la colección a la que pertenece (los números de ejemplar con * pertenecen al MZFC); **Localidad** se refiere al sitio de colecta del ejemplar, y **Muestra** si es piel o tejido.

Ejemplares	Localidad	Muestra	Ejemplares	Localidad	Muestra
12504 UAMI	Xilitla, S. L. P.	Piel	050 HBR*	Zacualpan, Ver.	Tejido
12505 UAMI		Piel	056 HBR*		Tejido
12506 UAMI		Piel	057 HBR*		Tejido
13979 UAMI	La Esperanza, Oax.	Piel	073 HBR*	Puerto de la Soledad, Oax.	Tejido
13980 UAMI		Piel	080 HBR*		Tejido
13981 UAMI		Piel	088 HBR*		Tejido
2386 MZFC	Santa Inés, Qro.	Piel	116 HBR*		Tejido
2392 MZFC		Piel	121 HBR*		Tejido
7375 MZFC		Piel	4019 JP*	Otongo, Hgo.	Tejido
002 BCTD*	Tenango de Doria, Hgo.	Tejido	4020 JP*		Tejido
024 BCTD*		Tejido	4022 JP*		Tejido
065 BCTD*		Tejido	4024 JP*	Tlanchinol, hgo.	Tejido
142 BCTD*		Tejido	4025 JP*		Tejido
149 BCTD*		Tejido	4026 JP*		Tejido
047 HBR*	Zacualpan, Ver.	Tejido	4027 JP*		Tejido
048 HBR*		Tejido			

Cuadro 4. Descripción de las técnicas moleculares empleadas en la obtención de los análisis de datos.

Técnica	Descripción
Extracción	Se utilizó el protocolo de extracción por Dneasy®, kit de producción comercial para extraer DNA de la marca Qiagen Blood and Cell Culture DNA Mini Kit Cat. No. 13323 (2002).
Amplificación	Para la amplificación del DNAm _t (Mullis, 1990; Saiki, 1990; Casey, 1992; Barrera-Saldaña, 1993), se usó el método de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) descrito en detalle por Palumbi (1996): Se utilizó para la Master Mix 30.5µl de agua ultrapura, 1µl de cada primer (10pmol/µl), 5µl de amortiguador de reacción (10x), 5µl Cloruro de magnesio (20x, 30mM), 5µl de solución (2mM, 10x) con todos los desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1µl de enzima taq-polimerasa (5U/µl) y 1.5µl de DNAm _t de la muestra logrando un volumen total de 50µl. Para la amplificación se utilizaron un termociclador GeneAmp 9700 de Applied Biosystem y otro Techgene Block TG 20x0.5 ml versión 10.19 de Techne. El protocolo que se usó generalmente fue 95°C a 1', 95°C a 30'', TO a 30'', 72°C a 30'', 72°C a 7' y 4°C a α a 40 ciclos (Innis y Gelfand, 1990). Para consultar los primer usados y sus temperaturas óptimas de amplificación (TO) consultar el cuadro de la figura 4 (Compton, 1990).
Purificación	Una vez obtenido el producto de la PCR, se purificaron los fragmentos obtenidos con ayuda del kit de purificación comercial de la marca Millipore®. Se colocan los 50µl de la amplificación en un reservorio contenido en un tubo, se agrega 450µl de agua ultrapura y se centrifuga a 3300 rpm por 15 min. Se retira el reservorio, se le colocan 20µl de agua ultrapura, se coloca de cabeza en otro tubo y se centrifuga por 2 min a 3300 rpm. Se coloca en el congelados de -20°C
Reacción de secuencia	Para poder leer la secuencia de DNAm _t aislado y purificado, se usó la secuencia cíclica térmica basada en el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos de Sanger y colaboradores descrito en detalle en Hillis <i>et al.</i> (1996). Para la Master Mix se utilizó 2µl de Big Dye 3.1, 2µl de Buffer, 0.5µl de primer (4%), 2.5µl de agua ultrapura y 3µl de producto de la amplificación. El protocolo a seguir es el siguiente:
Limpieza reacción de secuencia	<p>Una vez obtenida la reacción de secuencia se limpió por medio de dos técnicas:</p> <p>a. Columnas de Sephadex. Se colocan 750 µl de sephadex rehidratado en una columna, se deja reposar 5 min hasta que se vean dos capas en la columna, se aprieta a manera de que salga una gota y posteriormente se centrifuga a 2800 rpm por 2 min. Al producto de la reacción se le agregan 10µl de agua ultrapura, se coloca la columna en un tubo de 1.5ml y se le agregan los 20µl (producto de la reacción y agua). Posteriormente se centrifuga a 2800 rpm durante 3.5 min y finalmente se coloca lo colectado a -20°C.</p> <p>b. Isopropanol al 65%. Se agregan 40µl de isopropanol a los 10µl de producto de la reacción de secuencia y se deja reposar por 30 min., se centrifuga a 14000 rpm por 30 min y se elimínale isopropanol. Después se agregan 250µl de etanol al 70% y se centrifuga 5 min a 14000 rpm. Finalmente se elimina el etanol y se seca en un thermoblock.</p>

Después de la extracción se procedió a realizar las reacciones de PCR del DNAm_t, tanto de las pieles como de los tejidos. Con el fin de obtener la secuencia completa de los genes ND3-ND4, se amplificó éste en dos partes con los siguientes pares de oligonucleótidos: la primera que va de Gly a R1 y la segunda que va de F2 a R2 (cuadro 5, fig. 4). En el caso de las pieles, se utilizó el oligo F1 en vez de Gly debido a que el DNAm_t está muy fragmentado en las pieles. Los oligos escogidos para secuencias los genes ND3, Arginina-tRNA, ND4L y un fragmento de ND4 fueron tomados siguiendo a Engel *et al.* (1998; Fig. 3), ya que proporcionan muy buena información en análisis filogenéticos de otras especies de la familia Muridae (Engel *et al.*, 1998) y en especial del género *Peromyscus*.

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes ND3-ND4. En **Nombre** se encuentra región y tamaño en número de bases (b), en **Secuencia**, el lugar que presenta cada secuencia.

León Paniagua		Engel <i>et al.</i>	
Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
F1 (21b). 48°C AGTAATAAATATACTCGTGCC	115-135	Gly (20b). 48°C TAAGTAGTACAAGTGAATTC	0-20
R1 (19b). 48°C TGATATAAGGTGTGAACGG	504-522	MargRev (b). 48°C TGACTAAACAAAGGACTAGAATGAAC	290-315
F2 (20b). 49°C CCAAAAATGTCACCTGTAACC	433-454	Marg (18b). 48°C CAAAAAGGACTAGAATGA	341-358
R2 (20b). 49°C GAGTCAGTCGAGAATAACAGTG	886-907	ND ₄ LRev ₂ (25b). 49°C TGAGATTTTGTACGTAGTCTGTTTC	338-358
		ND ₄ Lrev (20b). 49°C TAGCAGGTTTAAGTTTTGTACATAGTC	694-718

Además, se consideraron los oligos propuestos por la M. en C. Livia León Paniagua (*comp. pers.*; cuadro 5, fig. 4) y se consultó al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 1988) de donde se obtuvieron secuencias de 13 roedores diferentes (*Peromyscus maniculatus* (AF374578), *P. gossypinus* (U40246), *P. leucopus*

(U40252), *P. eremicus* (U83861), *P. mexicanus* (U83862), *P. boylii* (U83864), *Microtus pennsylvanicus* (U83806), *Neotoma ledipa* (U83826), *N. floridana* (U83827), *Reithrodontomys megalotis* (U40031), *R. fulvescens* (U83832), *Habromys lophurus* (U83863), *Sigmodon ochrognatus* (U83822) y *Baiomys taylorii* (U83829)), las cuales se alinearon por medio del programa T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000) con el fin de encontrar los consensos que pudieran existir entre estas secuencias y así compararlas con los oligos utilizados por Engel *et al.* (1998) y los propuestos por la M. en C. Livia León-Paniagua (*comp. pers.*), asegurando que servirían en la amplificación de estos genes para *P. furvus*. (Compton, 1990; Fig. 3). En algunos casos se utilizó el programa ABI Auto-Assembler (Perkin Elmer) con el fin de corregir algunas secuencias que no se pudieran limpiar con otros programas.

Para poder determinar que se extrajo y se amplificó el fragmento de DNA se realizaron corrimientos de las muestras en geles de agarosa al 1% a 100_A durante 30 minutos preparado con un buffer TAE-1X (Tris-Acetate-EDTA al 1%). Con la ayuda de un transiluminador, se identificó la banda de DNA correspondiente al fragmento del número de bases deseado (fig. 3-B).

Una vez que se obtuvieron las amplificaciones de las localidades grupo de mencionadas en el cuadro 3, se purificaron utilizando el kit de Purificación Millipore[®] con el fin de eliminar los restos de oligos y fragmentos de DNA no deseados. Posteriormente, se realizó la reacción de secuenciación utilizando el Big Dye 3.1, después se limpiaron algunas muestras con columnas de Sephadex[®] y otras con isopropanol al 65% y finalmente, se mandaron a secuenciar.

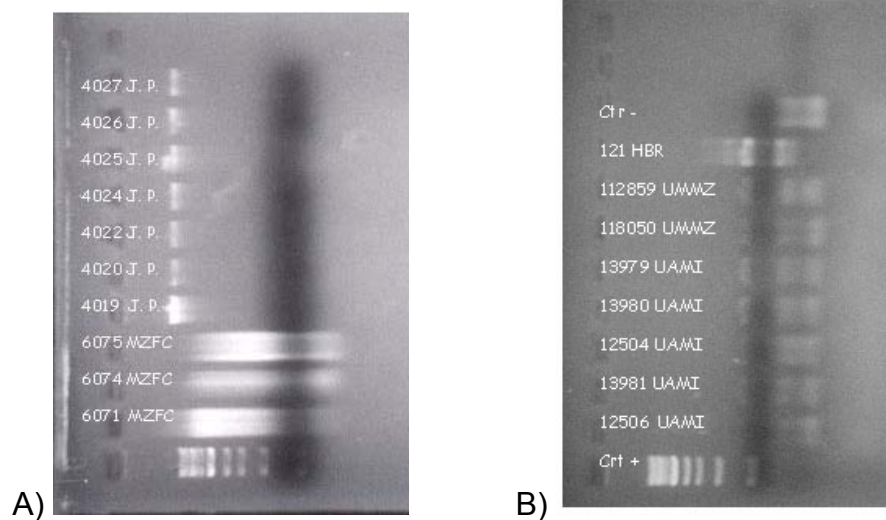


Figura 3. A) Análisis electroforético de la extracción de DNAm_t utilizando el kit de extracción de QiaGen “DNeasy[®]”. Los ejemplares 4019, 4020 y 4022 JP, pertenecen a Otongo, Hgo.; 4024, 4025, 4026 y 4027 JP, pertenecen a Tlanchinol, Hgo., (Ejemplares de *Peromyscus fuvvus*). Los ejemplares 6075, 6074 y 6071 MZFC son ejemplares de *Habromys* sp. Los sitios del gel que presentan una banda pequeña (concentrada) son aquellos que pertenecen a tejidos, lo que indica que existe una cantidad de DNA concentrada y sin fragmentaciones, mientras que la zona donde se observa una banda muy ancha (barrida) indica las extracciones a partir de pieles que poseen un DNA fragmentado.

B) Análisis electroforético de los productos de la amplificación del fragmento F3-Nap2 utilizando un termociclador a 47°. Los ejemplares 12504, 12506, 13979, 13980 y 13981 UAMI de *Peromyscus fuvvus* y los ejemplares 112859 y 118050 UMMZ de *Habromys* sp. son pieles (dedos), y 121 HBR de MZFC es tejido. Los ejemplares 12504 UAMI y 12506 UAMI, proceden de Xilitla, S. L. P.; 13979 UAMI, 13980 UAMI y 13981 UAMI, corresponden a La Esperanza, Oax.; los ejemplares 112859 UMMZ, 118050 UMMZ y 121 HBR (tejido) sirvieron de control.

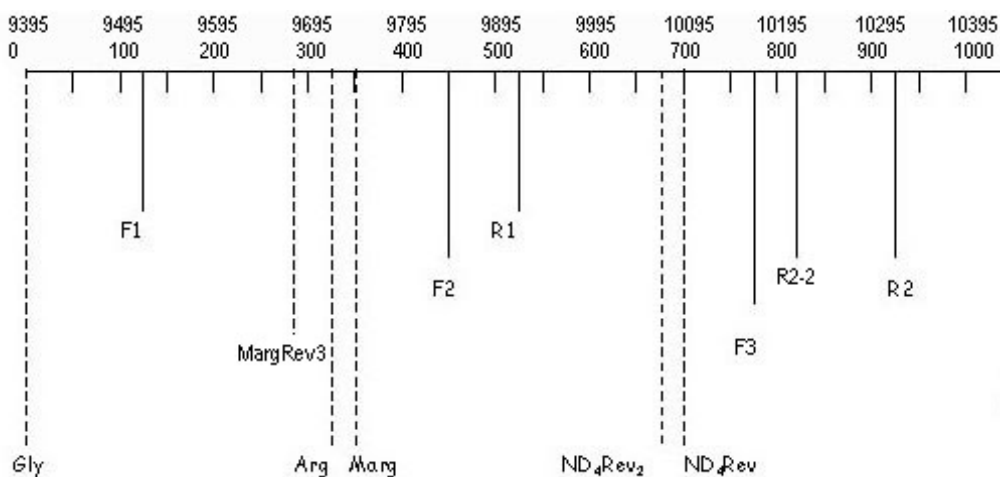


Figura 4. Diagrama de la secuencia de los genes ND3-ND4. La primera hilera de números en la parte superior se muestra la ubicación de los genes en el del genoma de *Mus musculus* (NCBI, 1988); la segunda hilera de números muestran el número de bases. Las líneas continuas (—) son las regiones propuestas por León-Paniagua (*com pers*); las líneas punteadas (---) son las regiones propuestas por Engel *et al.* (1998). En la parte inferior de cada línea se encuentra el nombre del oligonucleótido a utilizar.

Las técnicas de extracción, amplificación y reacción de secuenciación se estandarizaron en el Laboratorio Molecular del Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo de la Dra. Blanca Estela Hernández Baños y de la M. en C. Livia León Paniagua. La purificación con Millipore® se estandarizó en el Instituto de Ecología y posteriormente se implementó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias. La secuenciación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM bajo la dirección de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar.

C. Análisis de datos

Las secuencias de los genes mitocondriales ND3-ND4, se analizaron utilizando los siguientes programas:

Para la edición y limpieza de las secuencias, se utilizó el programa Chromas 1.45 (McCarthy, 1996). Esta corrección se hizo por medio de la comparación de secuencias pertenecientes a ejemplares de la misma localidad grupo con el fin de detectar mejor los errores que pudieran encontrarse en algunas secuencias. Una vez corregidas las secuencias, se colocaron en un block de notas formando una matriz de secuencias donde se colocaron tanto las secuencias del grupo de estudio como los grupos externos y, posteriormente, esta matriz fue introducida en el programa Clustal-X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) donde fueron alineadas. En caso de que las alineaciones resultaran muy diferentes o se tuviera duda de las bases que componen alguna secuencia se regresó a la secuencia original para corroborar que no hubiera errores y en ciertos casos se volvió a editar y limpiar la secuencia. Una vez que ya se

revisaron las secuencias y la alineación se obtuvo una matriz para identificar los haplotipos, la cual fue convertida a formato MEGA y NEXUS para los siguientes análisis.

Con la matriz de haplotipos se realizaron dos análisis. Por un lado, con ayuda del programa Mega 3.0 (Kumar et al., 2004) se obtuvieron la composición nucleotídica, el porcentaje de caracteres filogenéticamente informativos, la tasa de transición vs. transversión y la matriz de distancia genética. Esta matriz de distancia se usó para la construcción de árboles de distancia a partir de los métodos de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y Minimum Evolution (Rzhetsky y Nei, 1987), por medio del modelo evolutivo 2-parámetros de Kimura, donde las tasas de transición (α) y transversión (β) se consideran diferentes y cada nucleótido está sujeto a dos transversiones y una transición (Li y Graur, 1991; Avise, 1994). Además, a ambos árboles se les aplicó una prueba de bootstrap con 10,000 réplicas. Los resultados obtenidos con estos análisis nos sirven para apoyar el análisis de parsimonia

Por otro lado, con ayuda del programa PAUP 4.0 (Swofford, 2001), se realizó un análisis de parsimonia por medio de una búsqueda heurística simple sin peso en los caracteres, utilizando la opción de TBR, a la cual se le aplicó una prueba de bootstrap con 100 réplicas. El análisis obtenido en este programa sirvió para ver las relaciones filogenéticas que se presentan en el grupo de estudio.

Tanto para los análisis de distancia como el de parsimonia se utilizaron como grupos externos cuatro ratones: *Peromyscus mexicanus*, *P. eremicus*, y *P. maniculatus* como especies más cercanas y *Baiomys taylori* como grupo más lejano

RESULTADOS

En el caso de los ejemplares de Xilitla, S. L. P. solo se pudo amplificar el último fragmento (F4-Nap2), el cual no fue analizado en este trabajo, por lo que no se consideraron en el presente trabajo. Con el fin de completar la muestra de la parte norte de la distribución de *Peromyscus furvus*, se tomaron ejemplares pertenecientes a Santa Inés, Qro.

De los ejemplares mostrados en el cuadro 3, solo se pudieron secuenciar 19 ejemplares. Se obtuvieron 819 pares de bases que se separaron en dos grupos, los cuales corresponden a los genes ND3 (287b) y tRNA-Arg (68b) para el primer grupo y ND4L (298b) y la primera parte de ND4 (180b) para el segundo.

A. Composición Nucleotídica

Los haplotipos encontrados para los genes ND3 y RNA^t-Arg tienen una longitud de 448 pares de bases, con una composición nucleotídica del 32% para timina, el 24% para citosina, el 33% para adenina y el 11% para guanina (fig. 5). De los 448 sitios de los haplotipos analizados en este fragmento se presentan 241 (54%) sitios conservados, 206 (46%) sitios variables y 115 (26%) sitios filogenéticamente informativos. Para las frecuencias promedio de pares de bases, se obtuvo que 358 son idénticas, con 24 transiciones y 24 transversiones dada una relación de 1.4 (TT=123, TC=13, TA=5, TG=2, CT=12, CC=86, CA=3, CG=2, AT=5, AC=4, AA=133, AG=4, GT=2, GC=2, GA=5, GG=43).

Por otro lado, para los genes ND4L y principio de ND4 existe una longitud de 371 pares de bases. En la composición nucleotídica se observa que el 31% corresponde a timina, el 25% a citosina, el 35% a adenina y el 9.0% a guanina (fig. 5), que repre-

sentan 202 (54%) sitios conservados, 164 (44%) sitios variables y 98 (27%) sitios filogenéticamente informativos. Por otro lado, se obtuvo que en promedio la frecuencia de pares de bases idénticas es de 320, con 28 transiciones y 10 transversiones dada una relación de 2.7 (TT=98, TC=11, TA=2, TG=1, CT=11, CC=78, CA=2, CG=0, AT=2, AC=3, AA=116, AG=3, GT=0, GC=0, GA=3, GG=28).

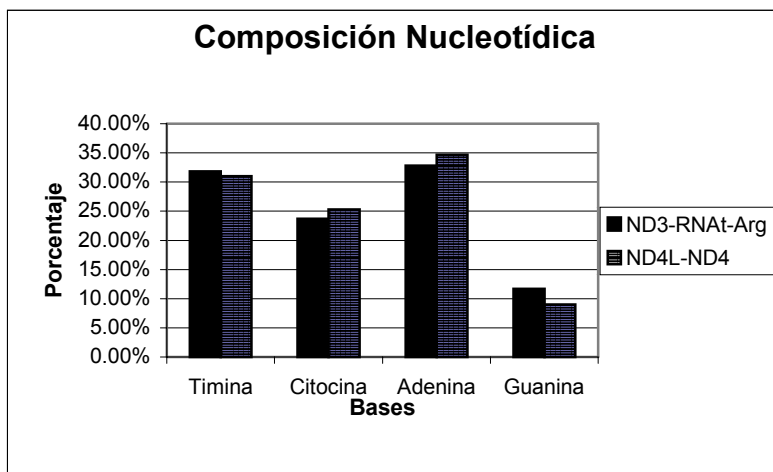


Figura 5. Porcentaje de la composición nucleotídica. Las barras sólidas pertenecen a los genes ND3 RNAt-Arg y las barras con líneas horizontales corresponden a los genes ND4L y primer fragmento del gen ND4. Se observa que la composición nucleotídica en ambos fragmentos es casi igual.

B. Análisis de Distancia

Se obtuvo la matriz de distancia de los genes ND3 y RNAt-Arg (cuadro 6-A), se analizaron 16 individuos, 12 pertenecientes a *P. furvus* y 4 al grupo externo. Las distancias más pequeñas se observan en los ejemplares provenientes de Puerto de la Soledad, Oax ($\bar{x}=0.1055$), los ejemplares pertenecientes al centro de la distribución de *Peromyscus furvus* presenta una distancia promedio de 0.1614, mientras que las distancias más grandes se presentan en los grupos externos ($\bar{x}=0.2480$). La matriz de distancia obtenida para los genes ND4L y el primer fragmento de ND4 (cuadro 6-B) se construyó a partir de 22 individuos, 18 de *P. furvus* y 4 del grupo externo. En

este caso, la distancia más pequeña se presenta entre los ejemplares de Puerto de la Soledad con un valor de 0 lo que indica que los haplotipos de estos individuos son iguales. Los individuos de La Esperanza Oax. presentan una distancia de 0.0470, seguida del grupo del centro de la distribución (\bar{x} =0.0811). Finalmente, el grupo externo presenta las distancias más grandes (\bar{x} =0.4118).

Cuadro 6. Matrices de Distancia. A: Genes ND3 RNAt-Arg. Se incluye un ejemplar de Santa Inés, Qro. (7375 MZFC). Genes ND4L y primer fragmento del gen ND4. Se incluyen ejemplares del centro de la distribución (047HBR, 048HBR, 050HBR, 056HBR, 057HBR, 024BCTD, 065BCTD,) y de La Esperanza Oax. (13979UAMI y 13980UAMI) . EJEMPLARES ANALIZADOS PARA AMBOS FRAGMENTOS: Puerto de la Soledad: 080HBR, 088HBR, 116HBR y 121HBR; Centro de la distribución: 002HBR, 4020JP, 4022JP, 4024JP, 4025JP, 4026JP y 4027JP; grupo externo: *Peromyscus mexicanus* (Pmex), *P. eremicus* (Pere), *P. maniculatus* (Pman) y *Baiomys taylori* (Btay) .

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	088HBR															
2	121HBR	0.079														
3	116HBR	0.062	0.082													
4	080HBR	0.057	0.085	0.057												
5	002BCTD	0.138	0.161	0.122	0.112											
6	4027JP	0.127	0.155	0.119	0.088	0.04										
7	4026JP	0.111	0.139	0.106	0.076	0.042	0.021									
8	4020JP	0.122	0.15	0.114	0.093	0.06	0.047	0.03								
9	4024JP	0.103	0.128	0.101	0.088	0.055	0.047	0.026	0.023							
10	4022JP	0.141	0.175	0.138	0.122	0.092	0.077	0.059	0.059	0.057						
11	4025JP	0.149	0.169	0.144	0.125	0.074	0.059	0.047	0.074	0.067	0.074					
12	7375MZFC	0.119	0.135	0.116	0.091	0.082	0.075	0.062	0.08	0.07	0.106	0.09				
13	Pmex	0.174	0.207	0.165	0.154	0.179	0.158	0.148	0.164	0.153	0.187	0.193	0.173			
14	Pere	0.239	0.272	0.24	0.207	0.238	0.222	0.198	0.206	0.194	0.237	0.26	0.203	0.173		
15	Pman	0.265	0.294	0.263	0.226	0.228	0.212	0.191	0.212	0.199	0.243	0.239	0.225	0.203	0.191	
16	Btay	0.235	0.268	0.235	0.193	0.236	0.204	0.19	0.214	0.208	0.252	0.239	0.217	0.199	0.226	0.218

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	13980UAMI																					
2	13979UAMI	0.047																				
3	073HBR	0.215	0.192																			
4	080HBR	0.215	0.192	0																		
5	088HBR	0.215	0.192	0	0																	
6	116HBR	0.215	0.192	0	0	0																
7	047HBR	0.232	0.187	0.061	0.061	0.061	0.061															
8	048HBR	0.228	0.183	0.058	0.058	0.058	0.058	0.009														
9	024BCTD	0.228	0.183	0.061	0.061	0.061	0.061	0.012	0.009													
10	065BCTD	0.224	0.179	0.055	0.055	0.055	0.055	0.006	0.003	0.006												
11	4020JP	0.228	0.183	0.058	0.058	0.058	0.058	0.009	0.006	0.003	0.003											
12	4025JP	0.237	0.191	0.072	0.072	0.072	0.072	0.028	0.025	0.028	0.022	0.025										
13	4026JP	0.238	0.192	0.065	0.065	0.065	0.065	0.022	0.019	0.022	0.015	0.019	0.006									
14	4027JP	0.238	0.192	0.065	0.065	0.065	0.065	0.022	0.019	0.022	0.015	0.019	0.006	0								
15	4019JP	0.242	0.196	0.068	0.068	0.068	0.068	0.025	0.022	0.019	0.019	0.015	0.009	0.003	0.003							
16	056HBR	0.224	0.179	0.055	0.055	0.055	0.055	0.012	0.009	0.006	0.006	0.003	0.028	0.022	0.022	0.019						
17	057HBR	0.224	0.179	0.055	0.055	0.055	0.055	0.012	0.009	0.006	0.006	0.003	0.028	0.022	0.022	0.019	0					
18	050HBR	0.219	0.175	0.058	0.058	0.058	0.058	0.022	0.019	0.015	0.015	0.012	0.031	0.025	0.025	0.022	0.009	0.009				
19	Pmex	0.244	0.219	0.179	0.179	0.179	0.179	0.191	0.187	0.191	0.183	0.188	0.204	0.196	0.196	0.201	0.192	0.192	0.188			
20	Pere	0.257	0.231	0.217	0.217	0.217	0.217	0.238	0.234	0.23	0.23	0.234	0.252	0.243	0.243	0.248	0.23	0.23	0.239	0.248		
21	Pman	0.234	0.201	0.205	0.205	0.205	0.205	0.213	0.217	0.214	0.213	0.217	0.217	0.217	0.217	0.222	0.213	0.213	0.209	0.236	0.244	
22	Btay	0.307	0.288	0.283	0.283	0.283	0.283	0.321	0.317	0.317	0.313	0.318	0.338	0.328	0.328	0.334	0.313	0.313	0.313	0.293	0.322	0.304

C. Árboles de distancia

1. NEIGHBOR-JOINING (NJ)

Para ambos fragmentos, en general, el grupo de estudio presenta un bootstrap de 100% lo que indica un apoyo fuerte con el empleo de los genes ND3, RNAt-Arg, ND4L y primer fragmento de ND4 (fig. 6).

Para el primer fragmento (genes ND3 y RNAt-Arg), se observa la formación de dos grupos (fig. 6-A), uno formado por los individuos pertenecientes a Puerto de la Soledad, Oax. apoyado fuertemente por un bootstrap de 100%, el cual está unido al resto de los individuos en la parte más basal del grupo, el segundo también está fuertemente apoyado (bootstrap de 94%), consta de los individuos pertenecientes al centro de la distribución de *P. furvus* y que comprende las localidades de Zacualpan, Ver. y Otongo, Tenanago de Doria y Tlanchinol, Hgo.; finalmente, el ejemplar de Santa Inés, Qro. se encuentra entre el grupo de Puerto de la Soledad y del grupo central estando en la parte basal del último apoyado con un bootstrap de 95%. El grupo externo se encuentra apoyado por un bootstrap de 69%.

Para el segundo fragmento (genes ND4L y 1^{er} fragmento de ND4) se presenta una topología muy similar (fig 6-B), presentando la formación de 3 grupos. El primero constituido por los ejemplares de La Esperanza, Oax. (bootstrap de 100%), el cual, junto con *Peromyscus maniculatus*, se unen al resto de los ejemplares de *P. furvus*. El segundo contiene los ejemplares de Puerto de la Soledad, Oax., mientras que en el tercero se agrupan los ejemplares del centro de la distribución (bootstrap de 99% para ambos casos), además entre ambos grupos existe un soporte de 100% lo que indica que este sigue siendo un grupo fuertemente apoyado, teniendo como grupo más

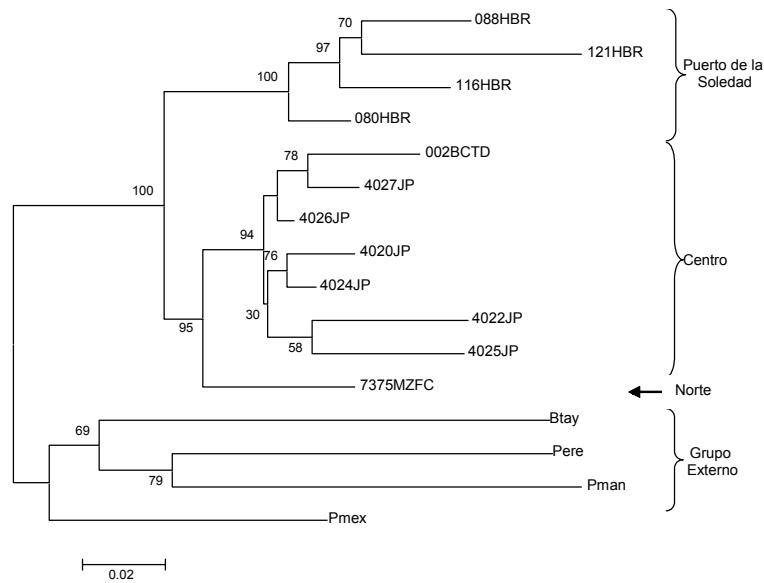
cercano a *Peromyscus mexicanus*, seguido de los ejemplares de La Esperanza, Oax. y *P. maniculatus*, después a *P. eremicus* y finalmente a *Baiomys taylori*.

2. MINIMUM EVOLUTION (ME)

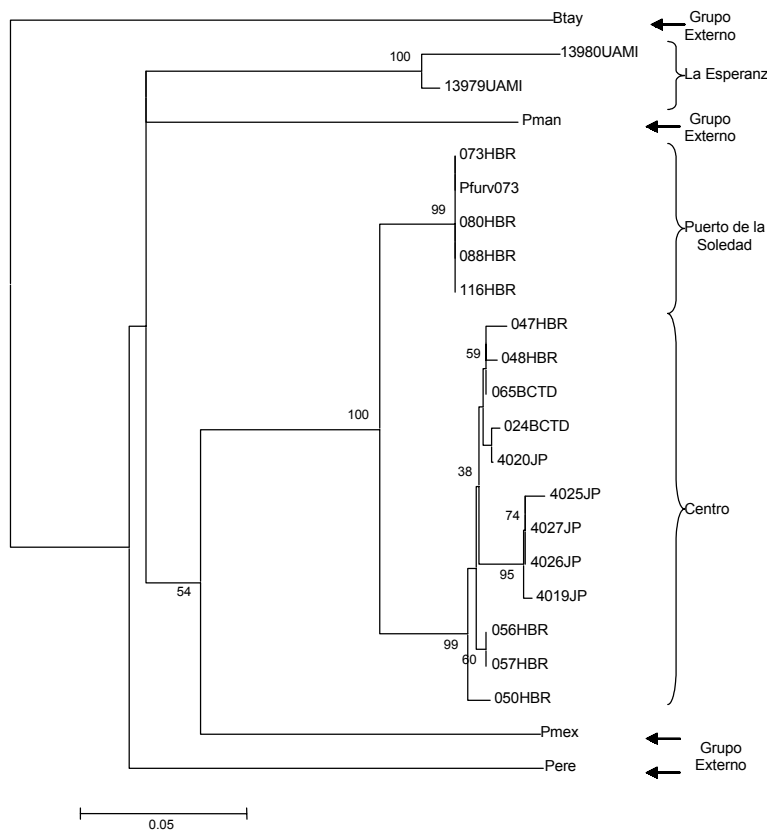
Al realizar la evaluación de distancia genética con ME, los resultados encontrados son similares a los obtenidos con NJ. En ambos fragmentos, el grupo de estudio presenta valores de bootstrap altos (100%) lo que muestra un gran apoyo mediante el uso de los genes ND3, RNAt-Arg, ND4L y primer fragmento de ND4. (fig 7)

En el primer fragmento (genes ND3 y RNAt-Arg), se observa un árbol similar al obtenido por NJ, aunque presenta niveles de bootstrap ligeramente más bajos. En el caso de los ejemplares del centro de la distribución de *P. furvus*, se observa un bootstrap de 92% y la topología del árbol cambia, con respecto al análisis de NJ, entre los ejemplares 4022JP, 4024JP, 4025JP y 4027JP que pertenecen a ejemplares de Tlanchinol y Otongo, Hgo (fig 7-A), Mientras que el individuo de Santa Inés, Qro. se encuentra entre el grupo de Puerto de la Soledad, Oax. y del grupo central como en el caso anterior (bootstrap de 81%). El grupo externo sigue siendo un clado aparte apoyado por un bootstrap de 66%.

Finalmente, para el segundo fragmento tenemos que el análisis realizado por ME proyecta una la topología del árbol resultante idéntica al obtenido por NJ, con niveles de bootstrap levemente diferentes (fig 7-B).

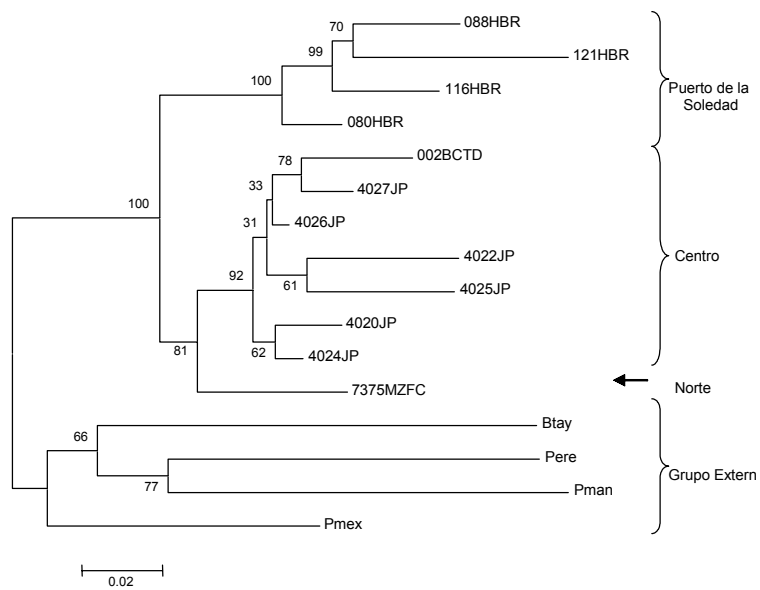


A

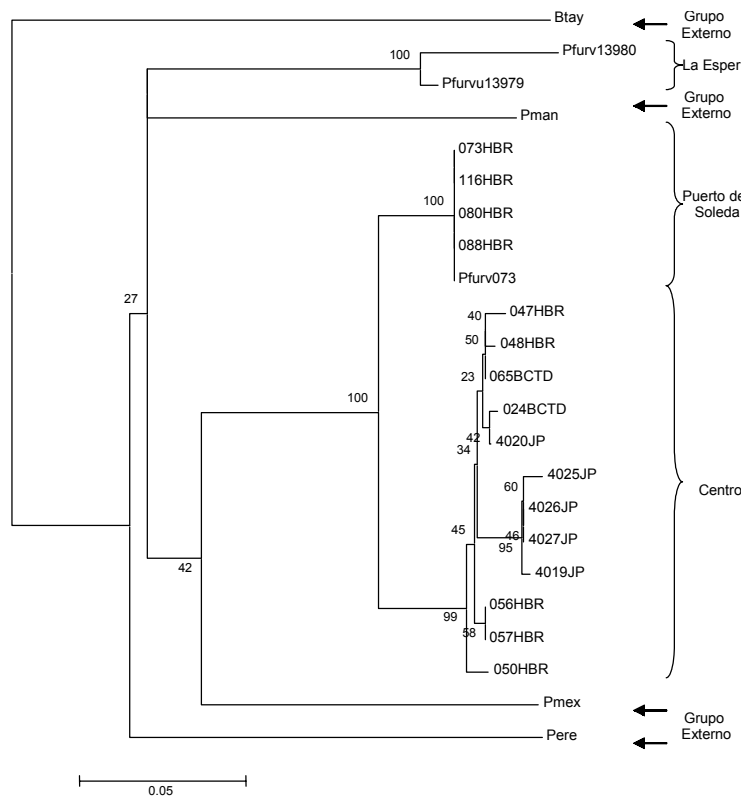


B

Figura 6. Árbol obtenido a partir de Neighbor-Joining utilizando el algoritmo de 2 parámetros de Kimura, para los genes ND3 RNAt-Arg (A) y ND4L y primer fragmento del gen ND4 (B). Ambos árboles muestran valores de bootstrap mayores al 50%. Grupo externo: *Peromyscus mexicanus* (Pmex), *P. eremicus* (Pere), *P. maniculatus* (Pman) y *Baiomys taylori* (Btay) .



A



B

Figura 7. Árbol resultante utilizando Minimum Evolution a partir del algoritmo de 2 parámetros de Kimura, para los genes ND3 RNA^t-Arg (A) y ND4L y primer fragmento del gen ND4 (B). Ambos análisis muestran valores de bootstrap mayores al 50%. Grupo externo: *Peromyscus mexicanus* (Pmex), *P. eremicus* (Pere), *P. maniculatus* (Pman) y *Baiomys taylori* (Btay) .

D. Análisis de Parsimonia

Para el primer fragmento se obtuvieron 4 árboles igualmente parsimoniosos, por lo que se calculó un árbol consenso (fig. 8). En este se observan dos grupos que concuerdan con los de distancia. El primero comprende a los individuos de Puerto de la Soledad, Oax. (99%) y el segundo a los ejemplares del centro de la distribución (Zacualpan, Ver.; Otongo, Tlanchinol y Tenango de Doria, Hgo.) de *Peromyscus fuvvus* (90%), incluyendo al ejemplar de Santa Inés, Qro. (93%). Los niveles de boot-strap obtenidos en ambas agrupaciones son altos, lo que sugiere que es un grupo fuertemente apoyado. El grupo externo presenta un bootstrap de 80%.

En el caso del segundo fragmento, se obtuvieron 17 igualmente parsimoniosos, por lo que también se calculó un árbol consenso (fig. 9), el cual no muestra claramente algunas relaciones, presentando politomías en algunas ramas del árbol. A pesar de la topología obtenida, podemos ver que los ejemplares analizados se segregan en cuatro grupos. El primero de ellos comprende a los ejemplares de La Esperanza, Oax. (bootstrap del 100%), los cuales no resuelven su relación con el resto de los ejemplares pertenecientes a *Peromyscus fuvvus*, ya que establecen una politomía con el grupo externo (*P. mexicanus*, *P. eremicus*, *P. maniculatus* y *Baiomys taylori*). Dentro del segundo grupo, representado por los individuos de Puerto de la Soledad, Oax., seguimos obteniendo valores de bootstrap altos (100%), lo que indica que esta población está fuertemente apoyada como un clado bien definido. Finalmente, para los ejemplares de la distribución central, se observan dos agrupaciones que se encuentran fuertemente apoyadas (100%): la primera, correspondiente al tercer grupo, considera a las poblaciones de Zacualpan, Ver. y de Otongo y Tenango de Doria, Hgo. (cuadro 3) quienes presentan una politomía entre ellas (bootstrap de 100%), y la segunda,

correspondiente al cuarto grupo, comprende las poblaciones de Otongo y Tlanchinol, Hgo., las cuales tampoco presentan una resolución entre ellas, presentando un nivel de bootstrap alto (94%).

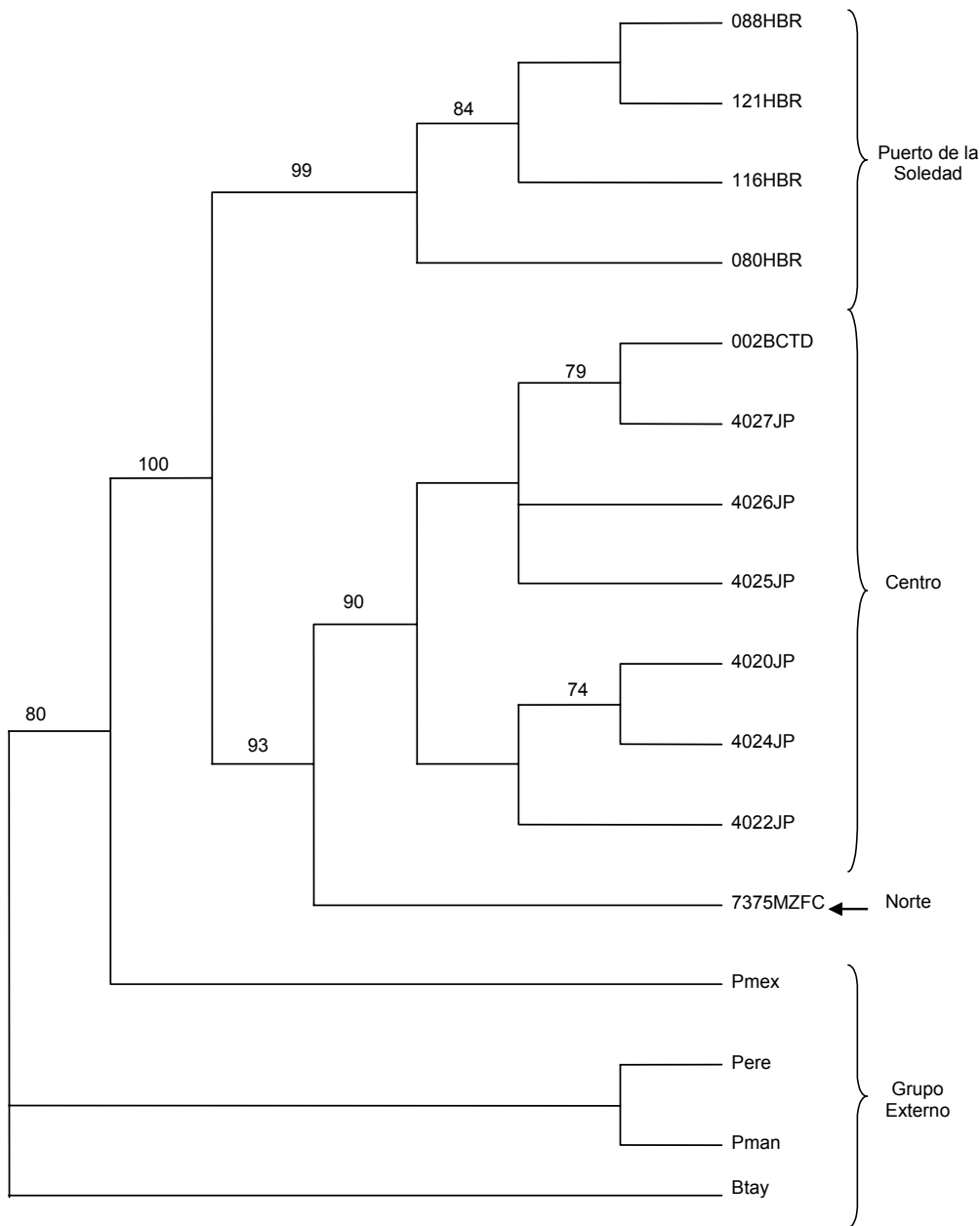


Figura 8. Árbol de parsimonia para los genes ND3 RNAt-Arg. Ambos análisis muestran valores de bootstrap mayores al 70%. Número de pasos = 395; Índice de Consistencia = 0.701; Índice de Retención = 0.609. Grupo externo: *Peromyscus mexicanus* (Pmex), *P. eremicus* (Pere), *P. maniculatus* (Pman) y *Baiomys taylori* (Btay) .

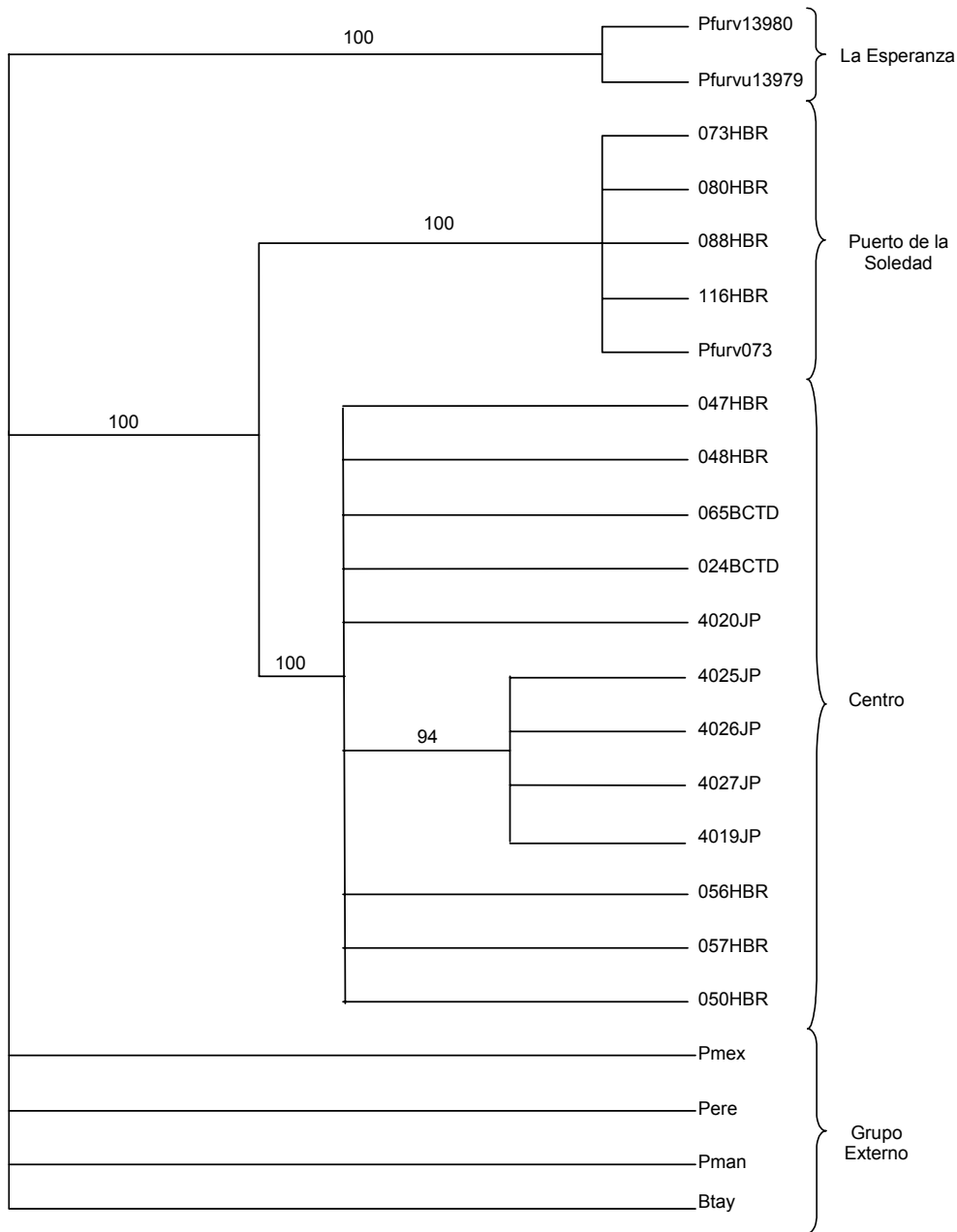


Figura 9. Árbol de parsimonia para los genes ND4L y primer fragmento del gen ND4 (B). Ambos análisis muestran valores de bootstrap mayores al 70%. Número de pasos 0 324; Índice de Consistencia = 0.642; Índice de Retención = 0.631. Grupo externo: *Peromyscus mexicanus* (Pmex), *P. eremicus* (Pere), *P. maniculatus* (Pman) y *Baiomys taylori* (Btay) .

DISCUSIÓN

A pesar de que el presente trabajo pretende aclarar las relaciones filogenéticas de *Peromyscus furvus* a partir de un análisis de parsimonia, la utilización de análisis de distancia nos permite evaluar aquellos casos que no presentan resolución en algunas ramas (politomías), como se observa en la figura 9. De esta manera, podemos explicar la relación entre poblaciones de la misma especie mediante la utilización de análisis que examinen la diversificación genética de la especie en estudio. Además, el empleo de matrices y árboles de distancias genéticas pueden ayudar a entender y explicar los resultados obtenidos en los métodos de parsimonia, principalmente en el caso de estudios a nivel infraespecífico.

Tanto en los análisis de distancia (NJ y ME) como en el de parsimonia usados se obtuvieron resultados similares para ambos fragmentos. Si no se consideran los ejemplares de La Esperanza, Oax., se observa que en todos los árboles resultantes se conforman dos grupos dentro de *Peromyscus furvus*, uno con ejemplares de Puerto de la Soledad, Oax. y otro con los individuos pertenecientes a la distribución central de la especie, lo que indica la posible existencia de subgrupos dentro del grupo de estudio (figs. 6-9), el cual se encuentra en todos los casos apoyado con valores altos de bootstrap (100%). A pesar de que el individuo de Santa Inés, Qro. se coloca entre estos dos grupos, el tener solo un fragmento de ese individuo, no permite esclarecer su situación taxonómica como sugieren Harris *et al.* (2000), a pesar de que morfométricamente se separa de los ejemplares del resto de la distribución (Ávila-Valle, 2002). Sin embargo, la formación de estos dos grupos puede explicarse si consideramos la historia geológica y biogeográfica de México. En particular, la zona de distribución de *Peromyscus furvus* comprende parte de la Sierra Madre Oriental desde

el sur de San Luis Potosí hasta la parte centro-sur de Veracruz, llegando al norte de la Sierra Norte de Oaxaca, mostrando así que la especie está en por lo menos dos áreas geológica y biogeográficamente distintas. Por un lado, la provincia de la Sierra Madre Oriental (Ferrusquía, 1998) comprende a los individuos del centro-norte de la distribución de la especie quienes presentan una tasa alta de diversificación reflejada tanto en la matriz de distancia (cuadro 6) como en los árboles resultantes para ambos fragmentos (fig. 6-9), mientras que en la Sierra Norte de Oaxaca, perteneciente a la subprovincia de las Tierras Altas de Oaxaca y Puebla (Ferrusquía, 1998; Ruiz-Jiménez *et al.*, 2000), se presentan individuos de Puerto de la Soledad quienes conforman un grupo sólido y fuertemente apoyado (figs. 6-9). Por otro lado, la relación filogenética de los individuos de La Esperanza, Oax., que presentan una similitud morfométrica con los individuos de Puerto de la Soledad, Oax. y de Xalapa, Ver. (Ávila-Valle, 2002) y que han sido determinados como *Peromyscus fuvvus*, se puede explicar por medio de los análisis de distancia genética (Tiemann-Boege *et al.*, 2000), los cuales muestran una diferenciación genética muy grande, al grado de que estos ejemplares se separan del resto de los individuos pertenecientes al grupo de estudio y se unen al grupo externo, colocándose entre *P. mexicanus* + *P. fuvvus*, por un lado, y entre *P. maniculatus* + *P. eremicus* + *Baiomys taylori*, por otro, provocando una parafilia en *P. fuvvus* (figs., 6-B, 7-B y 9). Esta diferenciación genética presente en esta última población puede deberse a que se encuentra geológicamente dentro de la zona de sierras y tierras altas Mixteco-Zapoteco (Ferrusquía, 1998).

En general, la historia geológica de la zona oriente del país es muy compleja y antigua, y la formación de las zonas montañas empieza geológicamente desde el jurásico-cretácico (Demant y Robin, 1975; Ferrusquía, 1998), lo que culmina con el

establecimiento de una composición florística (Luna-Vega *et al.*, 1989, 1994, 2001; Alcántara-Ayala y Luna-Vega, 1997; Mayorga-Saucedo *et al.*, 1998; Contreras-Medina *et al.*, 1999; Ruiz-Jiménez *et al.*, 2000) y faunística (Honey-Escandón, 2002; Sánchez-González, 2002; García-Deras, 2003; Canseco-Márquez *et al.*, 2004; García-Moreno *et al.*, 2004; León-Paniagua *et al.*, 2004) también compleja, siendo uno de sus máximos exponentes los bosques mesófilos (Rzedowsky, 1996; Luna-Vega *et al.* 1999, 2001; Espinosa *et al.*, 2004) cuya distribución fue muy extensa durante el periodo Terciario (Luna-Vega *et al.*, 2001). Al parecer la diversificación de las especies de roedores, particularmente de aquellos que se encuentran en bosque mesófilos, comienza en el Pleistoceno, cuando comienza el periodo glacial (Schuster, 1999; Still *et al.*, 1999). Las bajas temperaturas ocasionaron una reducción en la distribución de los bosque mesófilos causando su fragmentación y provocando que en la actualidad sean relictos que albergan una cantidad impresionante de especies sobre todo especies endémicas (Rzedowsky, 1996, Luna-Vega *et al.* 2001). Lo anterior, junto con algunos análisis biogeográficos de otras especies de ratones (Schmidly *et al.*, 1993; Hoffmann y Koepp, 1985; Hogan *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2000; Jaarola *et al.*, 2004), nos hace pensar que la diferenciación de la especie comenzó en el Pleistoceno. Además evidencia obtenida tanto florística como faunísticamente, permite pensar que el Pleistoceno da la pauta en el comienzo de un periodo de diversificación en diferentes taxones de roedores (Sullivan *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

En general, el estudio de los roedores es muy complejo, debido principalmente a las similitudes morfológicas y morfométricas que puede existir entre diferentes especies, ya que estas similitudes no permite discernir en ciertas situaciones entre diferentes especies. Esto puede ser reflejo de las condiciones ambientales que en algunos casos suelen ser iguales y, por ende, diferentes especies escogen algunos mecanismos, patrones o características similares como en el caso algunas especies crípticas (Scheffer, 2000). De esta manera, *Peromyscus furvus*, es una especie que posee una diversificación genética muy grande, que se refleja tanto morfológica (Musser, 1964; Hall, 1968) como morfométricamente (Ávila-Valle, 2002) a lo largo de su distribución. Además del presente trabajo, Harris y Rogers (1999) a partir de aloenzimas y Harris *et al.* (2000) con citocromo *b*, también observan una diferenciación dentro de la especie. Sin embargo, aunque en ambos trabajos se observa la separación de las poblaciones de Puerto de la Soledad, Oax. y de Xilitla, S. L. P. del resto de la distribución la especie, en ninguno de estos trabajos se toma alguna decisión acerca de la situación taxonómica de *P. furvus*, dejándola como una especie monotípica. El presente trabajo permite por un lado conocer más acerca de la biología de la especie y por otro conocer más acerca de técnicas que permitan evaluar las relaciones dentro de la especie. De esta manera, podemos decir que los datos moleculares permiten cotejar la existencia de un patrón de diferenciación genética lo que resulta en el estableciendo de varias entidades dentro de *P. furvus* como se menciona en la hipótesis alternativa.

A manera de conclusiones podemos establecer que:

1. *Peromyscus fuvvus* no es una especie monotípica, comprendiendo, por lo menos, dos agrupaciones dentro de la distribución de la especie:
 - a. Centro de la Sierra Madre Oriental (*¿P. fuvvus fuvvus.?*)
 - b. Puerto de la Soledad (sin designación taxonómica)
2. Es necesario completar la muestra correspondiente al norte de la distribución, ya que se encuentra entre las dos agrupaciones encontradas molecularmente y podría, en todo caso, formar otro grupo. (*¿P. fuvvus latirostris?*)
3. En el caso de los individuos pertenecientes a la localidad de La Esperanza, Oax., es necesario obtener más muestras y consultar otras descripciones para poder determinar su estado sistemático.

LITERATURA CONSULTADA

- Alcántara-Ayala, O. y I. Luna-Vega. 1997. Florística y análisis biogeográfico del bosque mesófilo de montaña de Tenango de Doria, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Botánica*, 68:57-106.
- Allen, J. A. y F. M. Chapman. 1897. On a collection of mammals from Xalapa and Las Vigas, State of Veracruz, México. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 9:201-203.
- Arévalo, E., S. K. Davis y J. W. Sites, Jr. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology*, 43:387-418.
- Arita, H. T. y G. Ceballos. 1997. Los mamíferos de México: Distribución y estado de conservación. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 2:33-71.
- Ávila-Valle, Z. A. 2002. Variación geográfica de *Peromyscus furvus* (Rodentia: Muridae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 71 pp.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman y Hall, Estados Unidos.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Estados Unidos.
- Barrera-Saldaña, H. A., R. Ortiz-López, A. Rojas-Martínez y D. Reséndez-Pérez. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*, Febrero:50-60.

- Canseco-Márquez, L., F. Mendoza-Quijano y M. G. Gutiérrez-Mayén. 2004. Análisis de la distribución de la herpetofauna, 417-437 *in*: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental (I. Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa, eds.). CONABIO-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carleton, M. D. 1989. Systematics and evolution, 7-141 *in*: Advances in the study of *Peromyscus* (Rodentia). (G. L. Kirkland, Jr. and J. N. Layne, eds.). Texas Tech Univ. Press, Estados Unidos.
- Casey, D. 1992. Primer on molecular genetics. *DOE Human Genome Program*, 1-44.
- Cervantes, F. A., A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 1994. Mamíferos terrestres nativos de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Zoológica*, 65:177-190.
- Compton, T. 1990. Degenerate primers for DNA amplification, 39-45 *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. Estados Unidos.
- Contreras-Medina, R., I. Luna-Vega y J. J. Morrone. 1999. Biogeographic analysis of the genera of cycadales and conferales (Gymnospermae): a panbiogeographic approach. *Biogeographica*, 75:163-176.
- Dalquest, W. W. 1950. Records of mammals from the Mexican State of San Luis Potosi. *Occasional Papers the Museum Zoology of Louisiana State University*, 23:1-15.
- Dalquest, W. W. 1953. *Mammals of the Mexican State of San Luis Potosí*. Louisiana State University Press. Estados Unidos.
- Darnell, J. H. Lodish y D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2^a ed. Scientific American Books. Estados Unidos.

- Demant, A. y C. Robin. 1975. Las fases del vulcanismo en México: una síntesis en relación con la evolución geodinámica desde el cretácico. *Revista del Instituto de Geología, UNAM*, 75:66-79.
- Dutton, P. H., S. K. Davis T. Guerra y D. Owens. 1996. Molecular phylogeny for marine turtles based on sequences of the ND4-leucine tRNA and control regions of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5:511-521.
- Engel, S. R., K. M. Hogan, J. F. Taylor y S. K. Davis. 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American Sigmodontine Rodents. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 35-49.
- Espinosa, D., C. Aguilar y S. Ocegueda. 2004. Identidad biogeográfica de la Sierra Madre Oriental y posibles subdivisiones bióticas, 487-500 *in*: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental (I. Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa, eds.) CONABIO-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ferrusquía, I. 1998. Geología de México: una sinapsis, 3-108 *in*: Diversidad Biológica de México (Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa eds.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Forstner, M. R., S. K. Davis y E. Arévalo. 1995. Support for the hypothesis of anguimorph ancestry for the suborder serpents from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4:93-102.
- García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Deras, G. M. 2003. Límites de especie dentro del complejo *Cynanthus latirostris* (Aves: Trochilidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 59 pp.

- García-Moreno, J., A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Petersen y L. A. Sánchez-González. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en prensa.
- Gonçalves, P. R. y J. A. de Oliveira. 2004. Morphological and genetic variation between two sympatric forms of *Oxymycterus* (Rodentia: Sigmodontinae): an evaluation of hypotheses of differentiation within the genus. *Journal of Mammalogy*, 85: 148-161.
- Halffter, G. 1965. Algunas ideas acerca de la zoogeografía de América. *Revista Sociedad Mexicana Natural*, 26: 1-16.
- Hall, E. R. 1968. Variation in the blackish deer mouse, *Peromyscus furvus*. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Zoología*, 1:149-154.
- Hall, E. R. 1981. *The Mammals of North America*. John Wiley y Sons, Estados Unidos. Vol. 2.
- Hall, E. R. y T. Álvarez. 1961. A new species of mouse (*Peromyscus*) from northwestern Veracruz, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 74:203-206.
- Hall, E. R. y K. R. Kelson. 1959. *The Mammals of North America*. The Ronald Press, Estados Unidos. Vol. 2.
- Harris, D. y D. S. Rogers. 1999. Species limits and phylogenetic relationships among populations of *Peromyscus furvus*. *Journal of Mammalogy*, 80:530-544.

- Harris, D., D. S. Rogers y J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia: Muridae) based on cytochrome *b* sequence data. *Molecular Ecology*, 9:2129-2135.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable. 1996. *Molecular Systematics*. 2a ed. Sinauer Associates. Estados Unidos.
- Hoffman, R. S. y J. W. Koepl. 1985. Zoogeography, 8:84-115 *in*: Biology of New World *Microtus* (Tamarin, R. H., ed.). American Society of Mammalogists. Special publication. Estados Unidos.
- Hogan, K. M., S. K. Davis y I. E. Greenbaum. 1997. Mitochondrial-DNA analysis of the systematic relationships within the *Peromyscus maniculatus* species group. *Journal of Mammalogy*, 78:733-743.
- Honey-Escandón, M. 2002. Filogeografía de las poblaciones del carpintero arlequín *Melanerpes formicivorus* (Aves: Picidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 45 pp.
- Huckaby, D. G. 1980. Species limits in the *Peromyscus mexicanus* group (Mammalia: Rodentia: Muridae). *Contributions in Science*, Los Angeles County Museum of Natural History, 326:1-24.
- Hull, D. L. 1997. The ideal species concept and why we can't get it, 357-380 *in*: Species: the Units of Biodiversity (M. F. Claridge, H. A. Dawah y M. R. Wilson, eds.), Chapman y Hall, London.
- Hull, D. L. 1999. On the plurality of species: questioning the party line, 23-48 *in*: Species: New Interdisciplinary Essays (R. A. Wilson, ed.), The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

- Innis, M. A. y D. H. Gelfand. 1990. Optimization of PCR's, 3-12 *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. Estados Unidos.
- Jaarola, M., N. Martínková, I. Gündüz, C. Brunhoff, J. Zima, A. Nadachowski, G. Amori, N. S. Buatova, B. Chondropoulos, S. Fragedakis-Tsolis, J. González-Esteban, M. J. López-Fuster, A. S. Kandaurov, H. Kefelioglu, M. I. Mathias, I. Villate y J. B. Searle. 2004. Molecular phylogeny of the species vole genus *Microtus* (Arvicolinae: Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en prensa.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 1993-2004. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis [computer program]. Ver. 3.0. University Park (PA): The Pennsylvania State University.
- León-Paniagua, L., E. García-Trejo, J. Arroyo-Cabrales y S. Castañeda-Rico. 2004. Patrones biogeográficos de la mastofauna, 469-485 *in*: Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental (I. Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa, eds.) CONABIO-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Li, W. H. y D. Graur. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Estados Unidos.
- Lim, K., M. D. Engstrom, N. Simmons y J. M. Dunlop. 2004. Phylogenetics and biogeography of least sac-winged bats (*Balantiopteryx*) based on morphological and molecular data. *Mammalian Biology*, 69: 225-237.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2003. *Biología celular y molecular*. 4ª. edic. Panamericana. Argentina.
- Luna-Vega, I., O. Alcántara-Ayala, D. Espinosa-Organista y J. J. Morrone. 1999. Historical relationships of the Mexican cloud forests: a preliminary vicariance

- model applying Parsimony Analysis of Endemicity to vascular plant taxa. *Journal of Biogeography*, 26: 1299-1305.
- Luna-Vega I., L. Aleida-Leñero y J. Llorente-Bousquets. 1989. Florística y aspectos fitogeográficos del bosque mesófilo de montaña de las cañadas de Ocuilan, Estados de Morelos y México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Botánica*, 59:63-87.
- Luna-Vega, I., S. Ocegueda-Cruz y O. Alcántara-Ayala. 1994. Florística y notas biogeográficas del bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Botánica*, 65:31-62.
- Luna-Vega, I., A. Velázquez y E. Velázquez. 2001. México, 181-277. *in*: Bosques Mesófilos del Neotrópico (M. Kappelle y A. D. Brown, eds.), INBio, Costa Rica.
- Martínez-Coronel, M., A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 1997. Variación no geográfica de *Peromyscus furvus* (Rodentia: Muridae), 183-203 *in*: Homenaje al profesor Ticul Álvarez (Arroyo, C. J. y O. J. Polaco, eds.), Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.
- Mayorga-Saucedo R., I. Luna-Vega y O. Alcántara. 1998. Florística del bosque mesófilo de montaña, Molango-Xochicoatlán, Hidalgo, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 63:101-119.
- Mayr, E. y P. D. Ashlock. 1991. *Principles of systematic zoology*. McGraw Hill, Estados Unidos
- McCarthy, C. 1996. Chromas, ver. 1.4. *School of Biomolecular and Biomedical Science*. Griffith University, Brisbane, Queensland.

- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, Abril:56-65.
- Musser, G. G. 1964. Notes on geographic distribution, habitat, and taxonomy of some mexican mammals. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan*, 636:1-22.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1988. Bethesda, Maryland, Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Nieto-Montes de Oca, A. y J. Llorente-Bousquets. Caracteres moleculares en los métodos de la sistemática, 157-205 *in*: Taxonomía Biológica (J. Llorente-Bousquets y I. Luna-Vega, eds.). UNAM-FCE, México.
- Notredame, C., D. Higgins y J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*, 302: 205-217 (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>).
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction, 205-247 *in*: Molecular Systematics (D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable, eds.), Sinauer Associates, Inc.
- Parkinson, C. L., K. R. Zamudio y H. W. Greene. 2000. Phylogeography of the pitviper clade *Agkistrodon*: historical ecology, species status, and conservation of cantils. *Molecular Ecology*, 9:411-420.
- Peppers, L. L., D. S. Carroll y R. D. Bradley. 2002. Molecular systematics of the genus *Sigmodon* (Rodentia: Muridae): evidence from the mitochondrial cytochrome-b gene. *Journal of Mammalogy*, 83: 396-407.

- Peter, S. L., B. K. Lim y M. D. Engstrom. 2002. Systematic of dog-faced bats (*Cynomops*) based on molecular and morphometric data. *Journal of Mammalogy*, 83: 1097-110.
- QIAGEN. 2002. *DNeasy Tissue Handbook*. QIAGEN Distribution, 39 pp.
- Ramírez-Pulido, J. y C. Müdespacher. 1987. Estado actual y perspectivas del conocimiento de los mamíferos de México. *Ciencia*, 38:49-67.
- Ruiz-Jiménez, C., J. Meave y J. I. Contreras-Jiménez. 2000. El bosque mesófilo de la región de Puerto de la Soledad (Oaxaca), México: análisis estructural. *Boletín de la Sociedad botánica de México*, 65:23-37.
- Rzedowski, J. 1981. *Vegetación de México*. LIMUSA, México.
- Rzedowsky, J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana*, 35:25-44.
- Rzhetsky, A. y M. Nei. 1987. Theoretical foundation of the Minimum-Evolution method of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Saiki, R. K. 1990. Amplification of genomic DNA, 13-20 *in*: PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press. Estados Unidos.
- 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-González, L. A. 2002. Variación geográfica y límites de especies en las poblaciones de *Chlorospingus ophthalmicus* (Aves: Thraupidae) de Mesoamérica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 43 pp.

- Scheffer, S. J. 2000. Molecular evidence of cryptic species within the pea leafmiller *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Economic Entomology*, 93:1146-1154.
- Schmidly, D. J., K. T. Wilkins y J. N. Derr. 1993. Biogeography, 319-357 in: Biology of New World *Heteromys* (Genoways, H. H. y J. H. Brown, eds.) American Society of Mammalogist. Special publication.
- Schuster, J. C. 1999. Chemical prospecting: an evolutionary-biogeographically approach-Mesoamerican cloud forest as an example. *IUPAC*, 1-5 (<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/schuster.html>).
- Sites, J. W., Jr. y J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 462-470.
- Still, C. J., P. N. Foster y S. H. Schneider. 1999. Simulating the effects of climate change on tropical montane cloud forest. *Nature*, 398:608-610.
- Sullivan, J., E. Arellano y D. S. Rogers. 2000. Comparative phylogeography of mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*, 155:755-768.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony, ver. 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Smithsonian Institution, Estados Unidos.
- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10:779-791.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882.

Tiemann-Boege, I., C. W. Kilpatrick, D. J. Schmidly y R. D. Bradley. 2000. Molecular phylogenetics of the *Peromyscus boylii* species group (Rodentia: Muridae) based in mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16:366-378.

Wiens, J. J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review in Ecology and Systematics*, 30: 327-362.

Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics*. Wiley Interscience. Estados Unidos.