

190



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Filogeografía de una especie de roedor múrido endémico al Eje Volcánico Transversal (*Reithrodontomys chrysopsis*)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

JUAN CARLOS RUIZ GUAJARDO

DIRECTOR DE TESIS: DRA ELIZABETH ARELLANO ARENAS



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: *Filogeografía de una especie de roedor muido endémico al Eje Volcánico Transversal Reithrodontomys chrysopsis.* realizado por Juan Carlos Ruiz Guajardo con número de cuenta 9753960-9 , quién cubrió los créditos de la carrera de biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Elizabeth Arellano Arenas

Propietario

Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza

Propietario

M. en C. Livia Socorro León Paniagua

Suplente

M. en C. Octavio Rafael Rojas Soto

Suplente

M. en C. Pilar Gabriela Ibañez Hernández

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEDICATORIA

A Dalia de la Peña, por encausarme a vivir el maravilloso mundo del teatro y con ello, a disfrutar el teatro de la vida. Y a todo aquel profesor que con su ejemplo de superación incansable, orientó mi camino para llegar hasta aquí.....

A MI FAMILIA:

A mis padres Juan Antonio y Guadalupe, ya que sin ustedes simplemente no sería lo que soy.

A mi abuela Carmenchu, dónde quiera que este, por enseñarme con su ejemplo a vivir siendo feliz.

A mis hermanos: wichololo, Eugenio, Rodrigo y Ana Paula; por su apoyo incondicional en todo momento.

A todos los que por razones múltiples no pudieron ver este trabajo terminado, y que sin embargo son parte fundamental de él.

(Además, ellos saben perfectamente porque)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Arellano, por su invaluable apoyo no sólo en la dirección y realización de este trabajo, sino porque a pesar de lo rudo del camino, su amistad y consejos me hicieron crecer; y porque juntos aprendimos mucho durante el trayecto.

Al Dr. Oscar Dorado, por su gran apoyo moral y académico, y por que en medio de la tormenta supo orientar este barco a puerto seguro Pero sobretodo, por su amistad incondicional que hizo que el trabajo fuera más ameno y ligero.

A la Dra. Dulce Maria Arias, por ser un ejemplo cotidiano de superación y lucha, y porque a pesar de sus múltiples ocupaciones, siempre encontró un momento para escucharme y orientarme, de manera muy especial agradezco los consejos y el apoyo que siempre encontré en usted. Y todas las facilidades otorgadas para la impresión de este trabajo.

Al Dr. Francisco Xavier González, por su valiosa cooperación y apoyo, para la realización de este proyecto, principalmente en el trabajo de colecta y por su indispensable enseñanza y colaboración en la preparación de los ejemplares; gracias también porque siempre encontré en usted apoyo académico para resolver dudas metodológicas y teóricas.

Gracias a todos y cada uno de los miembros del jurado revisor de este proyecto de investigación: Dra. Elizabeth Arellano Arenas, Dr. Adolfo Gerardo Navarro Siguenza, M. en C. Livia Socorro León Paniagua, M. en C. Octavio Rojas Soto y M. en C. Pilar Gabriela Ibáñez Hernández, por sus atinados comentarios y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A toda la gente en la UNAM, que me apoyó y me dio su confianza de manera particular:

Al Dr. Adolfo G. Navarro y a la M. en C. Livia S. León Paniagua, por su apoyo incondicional, por su amistad y su ayuda para acelerar los trámites burocráticos en la UNAM. Sin lugar a dudas son dos de las personas que más han influido en mi vida académica alentándome a superarme cada día más.

Al M. en C. Octavio Rojas Soto y a la M. en C. Pilar Gabriela Ibáñez Hernández, por comprender la premura de mi situación y confiar en mi trabajo, apoyándome en todo momento

A Esaú Leyva, por su colaboración y enseñanza sobre vudú y danza taq-polinesa, en otras palabras gracias, porque sin sus atinados consejos para concluir el trabajo de secuenciación en laboratorio, este trabajo no existiría. Pero sobretodo, por su amistad incondicional y los ratos de solaz que pasamos juntos.

A Lolita Reyes, por su total apoyo en el trabajo de laboratorio, en particular durante la extracción de ADN y de manera particular por su amistad y preocupación por evitar que muriera de inanición, a merced del trabajo cotidiano.

A Karla Quintana, quien en todo momento demostró ser una gran compañera y amiga. ¡Gracias por darme refugio en el asilo científico, por prestarme tu hombro para llorar en los momentos más duros, y por demostrar que la paciencia es una virtud que ostentas con orgullo, ya que de otra manera sería imposible aguantar a mis alumnos durante 3 semanas!!!.

A todos los voluntarios que hicieron posible el trabajo de campo soportando: lluvias, hambre, frío, desvelos, leptospirosis y hanta virus; en particular gracias a: Pedro Siverstone García, Juan Luis Torres Madagán, Katia Robles Gil, Frank Contreras Rosas, Eli Nava García y Rachel Mercado Vallejo.

Al CEAMISH de la UAEM, por prestar sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto de Investigación y de manera especial a todo el personal que en él labora.

Al personal académico del departamento de ecología del CEAMISH, en particular a los Drs.: Antonio Guillén Servent, Néstor Mariano Borigo y David Valenzuela, quienes siempre estuvieron dispuestos a responder mis dudas y a discutir, profundizar y cuestionar en el análisis de mis resultados. Gracias también por alejarme de la ignorancia mediante su apoyo bibliográfico; pero sobretodo gracias por su amistad y comprensión.

A mis amigos, en especial a Felipe, Daniel, Betsabé, Laura, Paola, Edgar, Katia, Luis Felipe, Jorge, Juan Manuel y Ana, porque con su presencia le dieron un nuevo significado a la cotidianidad (trabajo, chelas, colectas, clases, UNAM, CEAMISH, etc.) e hicieron de mi vida una fiesta.

A Lorena Leija, porque su luz ha iluminado mi camino, su paso reconfortado mi cansancio y su presencia ha hecho de mi devenir un tranquilo paseo por el mundo. Gracias mil por acompañarme en esta aventura de existir y con tanto ímpetu impulsarme a cumplir mis metas.

A todos los tesistas del CEAMISH mil gracias por compartir esa jornada conmigo.

A Jimena Pérez, por su apoyo y amistad en los momentos más difíciles de esta carrera contra el tiempo.

A Luis Felipe Acevedo, por impulsarme a terminar a tiempo y solicitar la beca para East Anglia, pero más que eso por su incondicional amistad.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos.

Pero hay los que luchan toda la vida, esos son...los indispensables.”

Bertolt Brecht

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	11
MÉTODOS	12
Obtención de Tejidos	14
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	16
Análisis de datos	20
Inferencias filogenéticas	22
RESULTADOS	25
Variación de las Secuencias y Divergencia	25
Análisis filogenéticos	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	32
LITERATURA CITADA	33
FIGURAS	37
CUADROS	46
ÁRBOLES	51

DESCRIPCIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía del hábitat de *R. chrysopsis* mezcla de pino y zacatonal, típica del Eje Volcánico Transversal.

Figura 2. Bosque de pino (*Pinus sp.*), Volcán de Colima, en Colima.

Figura 3. Fotografía de un claro con vegetación arbustiva secundaria, dentro de bosque combinado de pino y encino, situación repetitiva a lo largo del Eje Volcánico Transversal

Figura 4. Fotografía donde se aprecia la tala del bosque de pino y la aparición de vegetación secundaria, cerro Tancitaro en Michoacán, México.

Figura 5. Zacatonal típico de las zonas altas del Eje Volcánico Transversal, varios individuos se colectaron en este tipo de vegetación.

Figura 6. Mapa que ilustra la localización general en México del Eje Volcánico Transversal, aparece en color gris (Fa y Morales, 1991). Los números son provincias bióticas reconocidas por ellos.

Figura 7. Distribución de las localidades geográficas incluidas en el estudio, marcadas en color rojo (Fa y Morales, 1991).

Figura 8. Altura en metros sobre el nivel del mar de los principales picos que forman las tierras altas del Eje Volcánico Transversal (Fa y Morales, 1991).

Figura 9. Vista ventral de un individuo de *R. chrysopsis* en esta fotografía se aprecia la coloración de un adulto.

Figura 10. Vista dorsal superior de *R. chrysopsis*, en donde se aprecia en claramente la coloración de un adulto.

Figura 11. Acercamiento superior a un individuo de *R. chrysopsis*.

Figura 12. Vista frontal de *R. chrysopsis*, individuo colocado sobre un tronco caído.

Figura 13. La flecha muestra la posición sobre el suelo de una trampa Sherman para individuos vivos, tipo de trampa utilizada para la captura de los ejemplares.

Figura 14. Cámaras para hacer electroforesis con geles de agarosa fina, técnica que se utilizó para visualizar los PCR realizados.

Figura 15. Equipo de cómputo y software utilizado para la alineación, edición y análisis filogenéticos de los datos obtenidos.

Figura 16. Secuenciador capilar automático ABI Prism 310, utilizado para obtener los cromatogramas.

Figura 17. Cromatograma producto de la secuencia de ADN mitocondrial de un individuo de *R. chrysopsis*.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Lista sobre la información relativa a los individuos incluidos en este trabajo y sobre las poblaciones geográficas donde se capturaron. Los números entre paréntesis, se refieren a que de la población de Colima se incluyeron dos individuos, y de manera abreviada, se les asignó el 1 o 2 para poder identificarlos en los cladogramas, sin poner el número de catálogo.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar y / o amplificar las secuencias, en la dirección 5'-3' y la posición del primer dentro del gen. La literal L se refiere a la cadena en sentido original o heavy, mientras que la literal H se refiere a la cadena en sentido opuesto o light (Bibb, *et al.*, 1981).

Cuadro 3. Porcentajes de variación de los caracteres y de la señal filogenética presente (valores de g_1 en el citocromo b. Se incluyen también las frecuencias de nucleótidos para cada posición.

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas entre los individuos analizados, bajo el criterio de Tamura-Nei, (1993). Se incluyen tanto el grupo interno, como los externos.

LISTA DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Árbol 1. Cladograma construido bajo el criterio de parsimonia con igual peso a los caracteres o parsimonia simple, con búsqueda exhaustiva. Los números sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap, y el valor de C.I. se refiere al índice de consistencia para el árbol.

Árbol 2. Construido bajo el criterio de parsimonia, pero asignando pesos diferenciales a las bases, según su posición dentro del codón: 1 para las terceras posiciones, 2 para las primeras posiciones y 3 para las segundas posiciones. Los números sobre las ramas se refieren a valores de bootstrap, mientras que el valor C.I. se refiere al índice de consistencia para el árbol.

Árbol 3. Evaluado bajo parsimonia, con búsqueda exhaustiva, pero asignando valores diferenciales de peso a transiciones 1 y a transversiones 10, según se calculó bajo el modelo de HKY. Los números sobre las ramas se refieren a los valores de bootstrap, mientras que C.I. denota el valor del índice de consistencia.

Árbol 4. Construido bajo similitud o distancias de neighbor-joining, evaluando el modelo de Kimura 2 parámetros (K80), en el se muestra una escala de distancia, por lo que la longitud de las ramas si representa la divergencia genética entre los individuos.

Árbol 5. Filogeografía obtenida para *Reithrodontomys chrysopsis*, con base en secuencias de ADN mitocondrial.

Resumen

El ratón múrido *Reithrodontomys chrysopsis* es una de las 20 especies que conforman al género *Reithrodontomys* y uno de los 38 taxa de mamíferos endémicos al Eje Volcánico Transversal (EVT), una de las regiones biológicamente más ricas de México. Sus poblaciones se distribuyen de manera alopátrica en los manchones de bosque de pino- encino a lo largo del EVT, esto es entre los 3000 y 4500 msnm. Por ser una especie con distribución geográfica tan restringida y sobre todo, disyunta, es de suma importancia conocer su patrón evolutivo. Con este fin se realizó un estudio para obtener una hipótesis evolutiva o filogeografía de *R. chrysopsis*. Para este estudio se colectaron 5 localidades situadas en los estados de Veracruz, Distrito Federal, Morelos, Michoacán y Colima. Para determinar la historia evolutiva se construyó una filogeografía utilizando como marcador molecular secuencias de ADN mitocondrial del gen citocromo b. Los datos moleculares se analizaron bajo los criterios cladísticos de Parsimonia simple y empleando diversas estrategias de asignación de peso a los caracteres, así como también bajo el método de distancia al vecino más cercano.

Los resultados obtenidos muestran para algunas poblaciones, altos niveles de divergencia, que podrían señalar que los individuos de esas poblaciones se encuentran en proceso de especiación. Así mismo la filogeografía obtenida muestra una monofilia consistente para todas las poblaciones de *R. chrysopsis* incluidas en el estudio, y postula a Orizaba como la más distante genéticamente de todas, lo que podría significar su aislamiento temprano del resto de las poblaciones, así mismo, la siguiente población que debió aislarse fue la Michoacana, dejando unidas a Colima y el centro del país, situación que claramente indica un aislamiento que no corresponde a un orden geográfico definido, sino más bien a eventos ecológicos y geográficos de escala regional.

Introducción

La diversidad de especies no se distribuye uniformemente sobre el planeta; en general las regiones tropicales son las que albergan la mayor proporción de la diversidad del globo. Dentro de esta faja de biodiversidad que ciñe a los trópicos quizá del 50% al 80% se concentra en unos seis a doce países. Los siete países con mayor diversidad biológica son: Brasil, Colombia, México, República Democrática del Congo, Madagascar, Indonesia y Australia, por ello se les denomina megadiversos. En cuanto a la importancia para la conservación, México es tal vez el tercer país más importante del mundo pues se calcula que alberga entre el 8% y 12% de las especies del planeta (Challenger, 1998, Primack *et al*, 2002). Al igual que el resto de los países con megadiversidad, tiene una alta proporción de las especies y los ecosistemas en mayor riesgo del planeta (Mittermeier, 1988; Ceballos y Rodríguez, 1995). En cuanto a grupos específicos de organismos, México ocupa el primer lugar mundial en riqueza de reptiles con 717 especies; el segundo en mamíferos terrestres con 456 especies, 79% de las cuáles son roedores (215 especies) y murciélagos (133 especies); y el cuarto en anfibios con 285 especies. En conjunto, los reptiles y anfibios de México representan el 9.8% del total de la riqueza mundial, siendo así la herpetofauna más diversa del planeta con 978 especies. Nuestro país tiene 30% más especies de aves que EUA y Canadá juntos y 51% de sus especies migratorias pasan aquí de seis a nueve meses cada año invernando (Challenger 1998). En aguas mexicanas se cuentan más de 2000 especies de peces y por lo que se refiere a los insectos, México es el hogar de 25, 000 palomillas y mariposas y de más de

1,500 especies de abejas. En cuanto a flora vascular, aunque el conocimiento es incompleto, es probable que su riqueza alcance el cuarto lugar mundial, con al menos 21,600 especies conocidas y se estima que podrían llegar a ser entre 29,000 y 34,000 especies de plantas (Mares y Schmidly, 1991; Heywood, 1995).

Aunado a los datos anteriores, cabe aclarar que México no solo es privilegiado por su gran riqueza de especies, sino también por su elevado número de taxones endémicos en los distintos grupos de organismos. Por ejemplo, se sabe que de la fauna mexicana el 31.6% de los vertebrados terrestres de México son exclusivos o endémicos del país (especies con distribución geográfica restringida), entre estos se incluye el 32% de los mamíferos (Challenger, 1998; May, 1992). Estas especies endémicas resultan de gran interés para la conservación biológica, no sólo por habitar exclusivamente en el país, sino porque se distribuyen geográficamente bajo ciertos patrones medioambientales y en áreas que pueden estar en algún riesgo importante o bajo explotación intensa. Una caracterización de los mamíferos endémicos de México indica que tienden a ser terrestres, con áreas de distribución limitadas, tamaños corporales pequeños y de alimentación herbívora. Estas características están asociadas a ciclos de vida cortos y capacidades de dispersión limitadas, que a su vez se encuentran relacionadas con la velocidad de especiación. Por ello, la mayoría de las especies endémicas son roedores 75%, seguidas por murciélagos 10% e insectívoros 7% (Ceballos y Rodríguez, 1995).

Los patrones geográficos de endemidad en el país y las características de las especies endémicas sugieren que una proporción mayoritaria de estos taxones se originó por las contracciones, expansiones, fragmentaciones y aislamiento de las comunidades vegetales, provocadas por los cambios climáticos y geológicos asociados a eventos históricos y paleoecológicos como las glaciaciones durante el Pleistoceno, o a otros cambios mayores de escala regional (Lynch 1988). Evidencias genéticas, paleontológicas y taxonómicas sugieren que la mayoría de estos taxa endémicos son de origen relativamente reciente, con una antigüedad que varía de dos millones a decenas de miles de años (Ceballos y Rodríguez, 1995; Hall, 1981).

Las montañas del centro del país, que en conjunto ocupan el primer lugar en riqueza de especies y géneros endémicos de la biota nacional, han sido señaladas como uno de los centros de origen y refugio para especies que quedaron aisladas durante las glaciaciones del Pleistoceno. Este proceso de aislamiento geográfico y ecológico ha promovido una alta tasa de recambio de especies a lo largo del Eje Volcánico Transversal (EVT), lo que explica la elevada riqueza en toda la región (diversidad gamma) y la gran diferencia encontrada entre la identidad de las especies que habitan un punto y otro del Eje (diversidad beta, Mittermeier, 1988; Fa y Morales, 1991).

El ratón múrdo *Reithrodontomys chrysopsis* es una de las veinte especies que conforman el género *Reithrodontomys* y uno de los 38 taxones endémicos al EVT (Ceballos y Rodríguez, 1995). Sus poblaciones se distribuyen de manera

fragmentada en manchones compuestos por pino- encino y/o *Abies*, pastos o zacatonales a lo largo del EVT, desde Veracruz (Pico de Orizaba y Cofre de Perote) en el oeste; Puebla, Tlaxcala, Edo. de México, Morelos y D. F. en el centro del país y en Michoacán (Cerro Tancítaro) y Colima-Jalisco (Volcán de Colima) en el este (Figuras 1-8). Todos los registros de recolecta de que se tiene noticia se encuentran en zonas frías y húmedas y por arriba de los 3000 msnm (Hooper, 1952; Arellano, 1999; may, 1991). Por ser una especie con distribución geográfica restringida y sobre todo con poblaciones disyuntas, y debido a que no existe mucha información sobre las especies que viven de manera aislada a lo largo de las tierras altas del Eje Volcánico Transversal, *Reithrodontomys chrysopsis*, resulta ser un modelo importante para el desarrollo de estudios de historias evolutivas en especies endémicas, del mismo modo, es valioso para intentar comprender procesos evolutivos y de divergencia que puedan estar ocurriendo a lo largo de las poblaciones de una especie con distribución altamente insularizada (Fa y Morales, 1991).

Basado en la morfología, *R. chrysopsis* (figuras 9-12) es la especie más grande del subgénero *Reithrodontomys* en cuanto a tamaño del cuerpo y cráneo. La medida de las patas oscila aproximadamente entre los 20 a 22 mm de longitud y el largo del cráneo entre los 23.0 a 25.3 mm. De manera general, la cola es más larga que el cuerpo y la cabeza juntos, la coloración de juveniles o subadultos es de color más pálido en la parte ventral que en la dorsal; mientras que en adultos es usualmente brillante, bicolor y bien cubierta de pelo. El pelo que cubre el cuerpo suele tener una longitud entre los 8 a 10 mm. Y su coloración en adultos es

una mezcla entre café rojizo y negro en la parte dorsal, pero existe variación dependiendo de la época del año y la edad. Externa y cranealmente varía poco de lugar a lugar, lo que nos da poca información morfológica acerca de la gran insularidad de sus poblaciones. No obstante lo anterior, se reconocen dos subespecies basadas en caracteres morfológicos únicamente: *R. ch. chrysopsis*, presente en las partes altas de la mayor parte del Eje Neovolcánico, y *R. ch. perotensis*, restringida al Cofre de Perote, Veracruz (Hooper, 1952). Esta situación taxonómica resulta interesante de corroborar a través de datos moleculares, porque a pesar de que la taxonomía tradicional se basa en la morfología, los estudios moleculares han revelado que las variaciones morfológicas significativas, son responsabilidad de unos pocos genes (Gottlieb, 1984), circunstancia que justifica la utilización de la filogeografía como herramienta para el estudio poblacional de especies altamente insularizadas con subespecies determinadas morfológicamente. Si atendiéramos solamente a la divergencia morfológica, veríamos que ésta tiene poco que ver con la diferenciación genética entre los linajes, y sería difícil predecir el grado de cohesión genética de un grupo basándonos en la diferenciación morfológica o estado taxonómico únicamente; situación que de la cual trata la filogeografía. Como ejemplo claro de esta relación entre la morfología y los datos moleculares tenemos la denominada radiación adaptativa (Templeton, 1983).

Como se mencionó anteriormente la distribución de *R. chrysopsis* refleja un modelo alopátrico, bajo el cual se sugiere que las poblaciones geográficas comienzan a diferenciarse cuando existen barreras que impiden el intercambio

genético. Estos impedimentos extrínsecos o barreras al flujo génico son típicamente visualizados como prerequisite para la divergencia genética y para la evolución intrínseca (genética) eventual de las barreras reproductivas que son la guía del concepto tradicional de especie biológica (Avise, 2000). Por otro lado, se sabe que la fragmentación del hábitat puede influir negativamente en el tamaño poblacional debido a que las unidades demográficas pueden ser eliminadas, reducidas o divididas, las fuentes potenciales de inmigración pueden desaparecer y las poblaciones pueden quedar aisladas, sin poder dispersarse a otras áreas. Si la disminución de las poblaciones es grande estas tienen mayores probabilidades de extinguirse por procesos ambientales estocásticos, accidentes, enfermedades y desórdenes genéticos (Wilcox *et al.*, 1985). Estas características de los modelos alopátricos sugieren que las poblaciones de *R. chrysopsis* podrían estar bajo presiones evolutivas diversas que eventualmente llevarían a la divergencia entre ellas (Hall, 1981), proceso que puede evaluarse adecuadamente utilizando datos genéticos y análisis cladísticos.

Antes del surgimiento de los análisis filogenéticos, las aproximaciones tradicionales al análisis de la estructura genética dentro y entre poblaciones de la misma especie, recaían básicamente en el estudio del intercambio genético entre los individuos de las poblaciones como única explicación recurrente, y de manera general se desatendía por completo las relaciones histórico-evolutivas. Algunos modelos clásicos, por ejemplo los estadísticos F de Wright (1951), no permiten ver o estimar los procesos de coalescencia, sino sólo la estructura actual de las poblaciones y por ende no distinguen los procesos históricos de los denominados procesos recurrentes.

Sin embargo, durante los últimos diez o doce años se ha visto en múltiples ocasiones que el uso de filogenias intraespecíficas o filogeografías ha demostrado ser una adecuada herramienta para estimar el grado de diferenciación entre poblaciones conespecíficas con distribución alopátrica, tales como las que ocupa *R. chrysopsis* en las partes altas del EVT (Moore, 1995; Bermingham y Moritz 1998; Avise, 1984). Esto se debe en gran medida a que la estructuración genética de los organismos de una población, y finalmente el establecimiento de linajes evolutivos independientes, están fuertemente influidos por el patrón de intercambio genético (flujo génico) entre y dentro de las poblaciones; y también a que la variación en los factores que influyen la ecología reproductiva de las poblaciones puede tener profundos efectos en la naturaleza del intercambio genético entre los individuos de una población. Sin embargo, la variación genética no sólo está estructurada por las fuerzas contemporáneas del flujo génico, sino que también depende íntimamente de patrones de relaciones históricas (historias evolutivas). Para un nivel determinado de variación genética actual, las poblaciones poseedoras de ancestría común reciente serán genéticamente más similares que aquellas con ancestría común distante (May, 1992). Finalmente, si el intercambio genético entre las poblaciones o especies cesa completamente, entonces la ancestría común sería el único factor determinante para explicar la similitud genética entre dichas poblaciones. Por lo anterior, podemos afirmar que las relaciones históricas son un factor que contribuye en alguna medida para moldear la estructura genética de las especies (Bermingham y Moritz, 1998).

De manera contraria a lo propuesto por los modelos clásicos de genética poblacional; por encima del nivel de especie, las relaciones históricas han sido enfatizadas como la causa única determinante de la similitud genética. De hecho, la metodología cladística utilizada en inferencias filogenéticas asume que las unidades taxonómicas representan linajes evolutivos no reticulados. Hennig (1966) fue cuidadoso en marcar la diferencia entre relaciones genealógicas reticuladas o toco-genéticas, que caracterizan el intercambio genético entre los individuos de las poblaciones, y las que llamó relaciones jerárquicas filogenéticas ordenadas que caracterizan a las especies divergentes o a categorías taxonómicas supraespecíficas. Dado que las inferencias cladistas sobre las relaciones filogenéticas requieren que las variantes genéticas no formen linajes reticulados, los acercamientos de tipo filogenético no pueden aplicarse directamente a los niveles individuales o poblacionales. Con algunas excepciones, ambos niveles de organización biológica están caracterizados por patrones reticulados de intercambio genético (recombinación sexual y flujo génico). Sin embargo, si las variables genéticas a considerar se encuentran a nivel del gen en lugar de a nivel individuo, fragmentos no recombinantes de ADN pueden organizarse en redes jerárquicas descendentes ordenadas y proveer información histórica que los individuos no podrían.

Debido a que las genealogías construidas a partir de información proveniente de los genes pueden sentar bases sólidas para lograr una aproximación histórica al estudio de los procesos intraespecíficos, los métodos genealógicos cladistas aplicados a información molecular proporcionada por

análisis genéticos, puede aplicarse al estudio de la evolución reticulada por debajo del nivel de especie, es este análisis de la distribución espacial de las genealogías genéticas el fundamento de la filogeografía, herramienta que permite identificar con claridad los puntos de coalescencia de las poblaciones (Schaal, *et al.*, 1998). De una manera más puntual, la filogeografía es una herramienta concerniente con los principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos, especialmente aquellos que se encuentran muy relacionados o al interior de una misma especie. Tal como lo explica la palabra misma, la filogeografía trata con los componentes filogenéticos e históricos de las distribuciones espaciales de los linajes de los genes; en otras palabras el tiempo y el espacio son juntos, los ejes de la filogeografía, a través de la cual idealmente se mapean las genealogías de determinados genes de interés (Avice, 2000). Por otro lado, es importante recalcar que utiliza la información inherente en los árboles genéticos y no es simplemente una extensión de los principios filogenéticos a nivel de intraespecie; más bien caracteriza la subdivisión de las poblaciones mediante el reconocimiento de patrones geográficos de la estructura genealógica a lo largo del nivel de especie (Avice 1994, 1998).

El análisis y la interpretación de las genealogías alélicas o haplotipos para inferir procesos de genética de poblaciones ha sido promovido por avances en el estudio de la teoría de coalescencia (Lara *et al.*, 1996). Por todo esto, la filogeografía proporciona una nueva visión acerca del papel que juega el flujo génico en la estructuración de las poblaciones y específicamente permite detectar de manera clara eventos de flujo génico históricos y recurrentes y potencialmente

discriminar entre los patrones causados por flujo génico y aquellos causados por polimorfismos ancestrales. Los análisis filogeográficos se basan en la interpretación de patrones de congruencia o de falta de ella entre la distribución geográfica de los haplotipos y de sus relaciones genealógicas. Un patrón de congruencia se observa si los clados de los haplotipos relacionados cercanamente se encuentran geográficamente restringidos y ocurren en proximidad unos de otros. Dicha congruencia indica un aislamiento genético estricto ocurrido hace ya mucho tiempo (ausencia de flujo génico total). Asumiendo que las poblaciones no son panmícticas, este patrón surge debido a que las nuevas mutaciones permanecen localizadas dentro de los límites geográficos donde surgieron (Templeton *et al.*, 1995). De manera general podemos decir que los haplotipos más antiguos deberían estar localizados en el centro del árbol genético y su distribución geográfica sería amplia, mientras que los haplotipos más recientes se encontrarían en las puntas de las ramas y tendrían una distribución geográfica local, es decir mucho menor (Smouse, 1998; Castelleo *et al.*, 1994).

Objetivos

El objetivo de este trabajo es pues evaluar el grado de divergencia genética existente entre algunas de las poblaciones alopátricas de *R. chrysopsis*, y realizar una filogeografía basada en el análisis de secuencias de ADN del gen mitocondrial citocromo b.

Métodos

Obtención de Tejidos.

Se realizaron cuatro viajes de colecta entre los años 2000 y 2001 que abarcaron los estados de Veracruz, Tlaxcala, México, Morelos, D.F., Michoacán, Jalisco y Colima (Cuadro 1, Figura 7).

Los roedores se capturaron utilizando trampas Sherman para ejemplares vivos (Fig. 13). Estas se pusieron sobre el suelo procurando cubrir o abarcar la mayor distancia posible sin perder la visibilidad entre cada trampa, por ejemplo en los sitios donde existían claros en la vegetación o la visibilidad era grande y era posible el libre desplazamiento, se ponían con una separación de 10 a 15 m entre cada una de ellas; mientras que en aquellos sitios donde la vegetación era abundante y no había visibilidad, se colocaron con una separación de entre 3 y 5 m. Se pusieron un promedio de 300 trampas durante cada noche de estancia en la localidad, procurando escoger para su colocación aquellos sitios que presentaban el tipo de vegetación reportado en la literatura como típica o conservada para los sitios de colecta de la especie durante expediciones anteriores. Para evitar la pérdida de trampas, se colocaba una señal cada cinco trampas, de manera que al recogerlas al siguiente día, se pudieran encontrar con facilidad. Las trampas se colocaban durante la tarde, entre las 17:30 y las 19:30 hrs. y se recogían al día siguiente alrededor de las 6:00 hrs., evitando así tanto que fueran movidas o removidas de su sitio original por los pobladores de la localidad, como que los animales sufrieran si las condiciones del clima eran extremas.

Una vez capturados los ratones, se identificaba el ejemplar y se sacrificaba registrando en el catálogo de campo los datos merísticos estándar: longitud de la pata delantera derecha, oreja derecha, longitud de la cola, longitud del cuerpo y longitud total (longitud desde la última vértebra hasta la nariz), peso y sexo del mismo; todos estos datos resultan muy importantes para estudios morfológicos comparativos y para la identificación correcta de los ejemplares.

De cada ejemplar se extrajeron muestras de los siguientes tejidos: hígado, corazón y riñones. Estos se colocaron en tubos de criogenia etiquetados y se preservaron en nitrógeno líquido, hasta su depósito final en el ultracongelador REVCO del laboratorio de Sistemática Molecular del Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Una parte de los tejidos utilizados para el presente trabajo fueron obtenidos a través de préstamos permanentes provenientes de colecciones de tejidos congelado en la universidad de Brigham Young en Provo, Utah, Estados Unidos.

Todos los especímenes colectados para este estudio fueron preparados según las normas dictadas por colecciones científicas para mamíferos y se encuentran depositados en la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México o en la Universidad de BYU en Utah, USA.

Extracción de ADN

Se utilizó un individuo de cada una de las poblaciones geográficas muestreadas, excepto de Colima, donde se incluyeron dos (Cuadro 1). El tamaño de la muestra dependió en gran medida del grado de éxito de las capturas en cada población.

Para llevar a cabo este estudio se usaron secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) debido a que este marcador ofrece un amplio rango de niveles de conservación y es relativamente fácil de aislar. Además, las secuencias de ADNmt, mejoran la probabilidad de reconstruir el árbol filogenético cuando los eventos cladogenéticos se encuentran separados por períodos cortos de tiempo. Esto las hace una fuente atractiva de caracteres adecuados para estimar filogenias de taxones recientemente evolucionados, y/o que han evolucionado rápidamente (Moore, 1995). Para este estudio se trabajó con el gen citocromo b (cit b), que codifica para proteínas que intervienen en la cadena respiratoria dentro de las células. El gen se secuenció en su totalidad (1144 pares de bases) para cada individuo. Este gen se eligió porque ha sido utilizado exitosamente con anterioridad en estudios filogenéticos de roedores y en particular porque se ha usado recientemente para evaluar filogenias dentro del género *Reithrodontomys* (Arellano, 1999; Engel *et al.*, 1998; Smith y Patton, 1993; Sullivan *et al.*, 1995).

El ADN genómico total fue aislado de tejido congelado (hígado) a través de dos diferentes métodos. El primero de ellos, fue modificado por Fetzner (1997) a

partir del protocolo de Gentra Systems y consiste en colocar un pedazo de tejido (alrededor de 50 mg en una solución de lisis celular (10 mM Tris Base, 100 mM EDTA, 2% SDS, pH 8), posteriormente se añaden 9 μ l de Proteinasa K y se incuba a 55 °C hasta que las partículas de tejido se han disuelto por completo (generalmente 8 horas, pero dependiendo para cada individuo de la cantidad de lípidos presentes en el tejido). Para lograr la precipitación de proteínas y la degradación del ARN, se le da un tratamiento con 1.8 μ l de RNAsa (10mg/ml) y 300 μ l de Acetato de Amonio (7.5 M), se centrifuga a 13, 000 rpm. para que las proteínas se precipiten del ADN quedando este último en suspensión y se coloca el sobrenadante (que contiene el ADN en suspensión) en 900 μ l de Isopropanol (2 propanol), para causar con ello la precipitación del ADN y una vez precipitado, se centrifuga a 13,000 rpm formándose con ello una pastilla de ADN de color blanco, al fondo del tubo eppendorf. Para limpiar el ADN de cualquier residuo final se dan de dos a tres lavados sucesivos de etanol al 70% antes de su hidratación final. Para la hidratación del ADN, se coloca la pastilla obtenida en la solución de hidratación (10 mM Tris Base, 0.1 mM EDTA, pH 8), y se deja toda la noche a temperatura ambiente.

Aquellas muestras que mostraron problemas para su extracción mediante la técnica de Fetzner, fueron procesadas con la técnica de Fenol-Cloroformo.

Para la cual, se coloca un pedazo pequeño de tejido en 700 μ l de buffer de lisis celular TN2E (100 Mm Tris Cl a ph 7.8, 100 Mm NaCl, 2 Mm EDTA), 60 μ l SDS (10%), 10 μ l Proteinasa K (10 mg/ml), y pasados 20 minutos, se rompe el

tejido utilizando un pistilo o navaja para facilitar con ello la disolución pronta del tejido. Posteriormente se incubaba de 2 a 8 horas a 65 °C en constante agitación. Se continúa con dos tratamientos de 500µl cada uno de fenol / cloroformo (25:24) y posteriormente otros dos de alcohol isoamílico (24:1), teniendo cuidado de utilizar únicamente la capa superior de la mezcla de fenol-cloroformo, ya que ésta forma dos fases. Para finalizar la extracción, se lleva a cabo la precipitación del ADN usando 900 µl de Acetato de Sodio 7M y para los lavados finales de impurezas y residuos se hace con etanol al 100%. Por último, para evaporar por completo el alcohol, se seca el ADN a 30°C utilizando una centrifuga de vacío con ajuste de temperatura y finalmente se lleva a cabo la hidratación con 50 a 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA).

Amplificación

El cit. b se amplificó utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; Erlich, 1989) con aproximadamente 0.01µg de ADN extraído para cada reacción. Para la mayoría de las muestras se usaron los oligonucleótidos externos MVZ-05-M y MVZ-14-M (Smith, *et al.*, 1993; Cuadro 2). Sin embargo, para algunas muestras en las que el ADN se encontró parcialmente degradado, la amplificación se hizo en fragmentos utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos internos, amplificando así fragmentos de alrededor de 400 pares de bases; (Cuadro 2 para una lista de primers usados, sus secuencias y su posición relativa dentro del mapa de ADNmt (Bibb, *et al.*, 1981). Los parámetros para llevar a cabo la amplificación fueron los

siguientes: un período de desnaturalización inicial de 4 minutos a 94° C, donde las cadenas de ADN se separan dejando descubiertas las bases nitrogenadas. Una vez separadas las cadenas, se someten a 40 ciclos de 4 minutos a 94° C para asegurar la separación total, 1 minuto de anillamiento a 50° C periodo en el cual los oligonucleótidos se pegan a las hebras de ADN y 1 minuto de extensión a 72°C para asegurar que los primers hubieran tenido el tiempo adecuado para su acoplamiento con el templado. Al final los productos de PCR obtenidos se refrigeraron a 4° C para su utilización posterior.

Para aquellas muestras con ADN frgmentado, la temperatura de anillamiento se redujo a 45° C, con la finalidad de facilitar un acoplamiento mayor de los primers con el templado y obtener mejores amplificaciones.

Los productos amplificados de PCR se visualizaron a través de una electroforesis con geles de agarosa fina al 10%. La visualización permite confirmar la amplificación del gen adecuado .

El tamaño del fragmento amplificado se determinó usando un marcador de pesos moleculares denominado kb ladder (ADN fragmentado de distintas longitudes). Además se incluyó un control negativo en cada visualización que permitió detectar si las muestras de PCR estaban contaminadas o no. Los geles de electroforesis eran revelados en una solución de bromuro de etidio (3mg/ml), El bromuro de etidio se adhiere al ADN que fluoresce bajo luz Ultra Violeta y permite con ello el poder ser fotografiado.

El citocromo b amplificado se purificó utilizando el método de Gene-Clean (Bio 101, La Jolla, CA). En este método, se colocan los productos de PCR en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se les añaden 500 μ l de solución de NaI 3M y 4 μ l de "glass milk" (fragmentos finos de vidrio en suspensión) y se dejan en constante agitación por un período que va de 20 minutos hasta 8 horas. Durante este tiempo el ADN se adhiere al "glass milk" separándose del resto de los reactivos. Posteriormente, se centrifuga durante 5 segundos a 13,000 rpm para que el "glass milk" junto con el ADN precipite y se tira el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla con el ADN. Se añaden 500 μ l de "New Wash" solución que contiene alcohol y buffer, que permite, a través de 3 lavados sucesivos y de agitación mediante vortex, eliminar cualquier residuo de primer, taq polimerasa o subproductos de no deseados de PCR.

Finalmente, se cuantificó el ADN amplificado y purificado utilizando un espectrofotómetro de masas (Amersham Biotech Pharmacia) para ADN y ARN. La cuantificación de los productos es fundamental, dado que la concentración de ADN en una reacción de secuenciación es un factor determinante para obtener secuencias limpias y legibles.

Reacciones de Secuenciación

Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación se colocaron de 90 a 120 η g de producto de PCR purificado, una concentración de 3.2 μ M de primer y 6 μ l de Big Dye Terminator. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 25 ciclos con 1 minuto de desnaturalización a 94° C, 10 segundos a 50° C para el anillamiento de los primers y 5 segundos de extensión a 72° C, para completar cada ciclo.

Para secuenciar el cit. b completo fue necesario hacer un total de 6 reacciones de secuenciación para cada individuo, porque cada oligonucleótido puede leer solamente alrededor de 450 pares de bases, de manera que para leer las 1140 bases, se usaron 3 primers en un sentido (3'-5') y otros 3 en la dirección opuesta (5'-3') con la finalidad de poder editar o corregir las secuencias y tener secuencias consenso con una precisión mayor.

El producto de las reacciones de secuenciación se purificó con columnas de separación y una solución de sephadex 50G. Se añadió 800 μ l de solución de sephadex (3gr/50ml) en cada columna de separación y se centrifugó a 4 000 rpm durante 2.5 minutos eliminando con eso el exceso de agua y creando con ello el filtro por donde pasaba el ADN. Una vez que se tenía la columna de sephadex formada, se colocó la muestra de ADN secuenciado (~20 μ l) en la columna de sephadex (una columna por muestra a purificar) y se centrifugó nuevamente a 4 000 rpm durante otros 2.5 minutos. De esta manera, por gravedad el ADN secuenciado pasaba a través del filtro de la columna y se eliminaba con ello todas las impurezas o residuos que pudieran dificultar la lectura en el secuenciador.

Las secuencias fueron leídas en un Secuenciador Automático Capilar ABI Prism 310 (Fig. 16), dentro del cual cada muestra es inyectada a través de un capilar de electroforesis que contiene buffer TAE para secuenciación. Las muestras pasan por un lector óptico láser que proyecta el rayo a través de la muestra y que es rebotado por el Big Dye adherido, proporcionando así una lectura de color que la máquina interpreta como una de las cuatro bases nitrogenadas guanina (negro), timina (rojo), adenina (verde) y citosina (azul). Cada muestra es leída en 2.5 horas en promedio.

El producto de la lectura es un cromatograma (sucesión de picos en colores que indican la secuencia de bases y la calidad de la lectura en el secuenciador y que permite ver gráficamente la secuencia de nucleótidos leída por el aparato, Fig. 17). Las reacciones de secuenciación deben mantenerse en todo momento a 4° C y tapadas de la luz, ya que esta daña el Big Dye.

Análisis de Datos

Para utilizar secuencias de ADN en análisis filogenéticos, es necesario que estén alineadas, para asegurar que las posiciones a analizar sean homólogas (Mindell, *et al.* 1996). La edición y alineación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa Sequencher (versión 3.1; Gene Codes Corporation) y utilizando las dos cadenas de ADN para confirmar los nucleótidos (Fig. 15). Los análisis filogenéticos, variaciones de las secuencias y estimación de las distancias se llevaron a cabo utilizando el software Phylogenetic Analysis Using Parsimony 4.0b (PAUP*; Swofford, 1998).

Se obtuvo información general sobre la variación en las secuencias (frecuencia de los nucleótidos y sitios variables), así como también información filogenética (número de sitios informativos). La cantidad de señal filogenética de los datos se determinó a través del cálculo del estadístico g_1 que evalúa la distribución del tamaño de un número determinado de árboles tomados al azar; en este caso se evaluaron 1,000 árboles. Un valor de g_1 negativo, significa que la distribución dista de ser azarosa y cuanto más se aleje de cero, indicará que la señal filogenética es mayor, mientras que en la medida que el valor obtenido se acerque a cero, la señal filogenética decrecerá aumentando la probabilidad de las distribuciones de los árboles evaluados sean producto del azar (Hillis, 1991; Hillis y Huelsenbeck, 1992).

Se calculó la distribución genética ajustada al modelo propuesto por Tamura y Nei (1993), en la que se toma en cuenta las desviaciones en la composición de bases y las diferencias en las tasas de substituciones entre las bases. Además, el uso de este modelo permitió hacer comparaciones con trabajos previamente realizados para el género *Reithrodontomys* (Arellano, 1999). Las bases a lo largo de la secuencia de ADN, se encuentran agrupadas tripletes, lo que permite la posición que ocupa cada una dentro del codón y asignar con base en la probabilidad de cambio que cada posición tiene dependiendo de su velocidad de mutación, un valor diferencial para cada base. A su vez se sabe que la frecuencia de ocurrencia de una transversión con respecto a una transición es

en mamíferos de alrededor de 1 a 14 respectivamente, (Guillén A. *com. pers*) y por ello se pueden asignar valores de peso diferenciales que ponderen esta diferencia.

Inferencias Filogenéticas

Para llevar a cabo la polarización de los caracteres se utilizó el criterio del grupo externo (Watrous y Wheeler, 1981). Se eligieron como grupos externos a las especies *R. sumichrasti*, y *R. megalotis*, ya que en estudios filogenéticos previos del género *Reithrodontomys*, han resultado ser grupos hermanos de *R. chrysopsis* (Arellano, 1999). Además con la finalidad de determinar aún más las relaciones entre estos taxones, se incluyó como un tercer grupo externo a la especie *R. fulvescens*, taxón más lejanamente emparentado.

La inferencia filogenética se llevó a cabo con base en dos métodos distintos: análisis de caracteres y análisis de distancias genéticas. Para el método basado en los caracteres, se aplicó el criterio de parsimonia y cada posición en la secuencia fue tratada con cuatro estados alternativos de carácter (G, A, T, C). Dado que el número de taxa no es muy grande, todos los análisis bajo el criterio de parsimonia se llevaron a cabo mediante búsqueda exhaustiva con rompimiento de politomias (TBR Arellano, 1999; Swoford, 1996).

El análisis filogenético mediante valores de distancias, se aplicó usando el criterio de neighbor joining o distancia al vecino más cercano, utilizando para ello un modelo evolutivo denominado Kimura dos parámetros (K 80), el cual asume que las transiciones y transversiones suceden bajo frecuencia distinta y que existe una

ocurrencia mayor de transiciones que de transversiones.

Para el primer análisis de caracteres se aplicó el criterio de parsimonia simple o no pesada con búsqueda exhaustiva, que postula que todos los caracteres poseen el mismo valor y peso dentro del árbol y simplemente se busca el árbol con menor número de pasos evolutivos, asumiendo que todos los caracteres son igualmente informativos.

Asumiendo la posibilidad de que las secuencias variaran siguiendo un modelo evolutivo y atendiendo a que se sabe que en genes que codifican para proteínas, la tercera posición de los codones muta o varía a una velocidad mayor que la primera y segunda posición (Irwin *et al.*, 1994), se decidió otorgarle menor peso a estos caracteres que evolucionan rápidamente y evaluar si recuperando la información filogenética a partir de la segunda y primera posiciones, el análisis filogenético nos daba un resultado diferente (Griffiths, 1997). Por lo anterior, para el segundo análisis de caracteres, se utilizó el criterio de parsimonia con búsqueda exhaustiva y se asignaron a los datos valores de pesos diferenciales: uno a la tercera posición, dos para la primera y tres a la segunda posición por ser la más conservada de todas.

El tercer método utilizado para asignar pesos diferenciales a los caracteres consistió en proporcionar valores diferentes a las transiciones y a las transversiones, para el cual se ejecutó una matriz en la que las transiciones tenían un valor de 1, mientras que las transversiones valían 10: el cociente de los valores

diferenciales entre transiciones y transversiones T_i/T_v fue obtenido de un programa denominado model test, en el cual a través del modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85; Hasegawa *et al.*, 1985) que evalúa sustituciones con distribución gamma, asumiendo que algunos sitios permanecen invariables el valor adecuado para hacer significativa la diferencia en la frecuencia con la que ocurre una transversión, comparativamente con la que ocurre una transición.

Para evaluar la consistencia o solidez de los clados en las topologías resultantes de cada uno de los análisis bajo el criterio de parsimonia, se realizó un análisis de bootstrap tipo branch-bound. (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Y con el fin de cuantificar la homoplasia existente, se calculó el índice de consistencia para cada árbol obtenido.

Según Cunningham (1997), debido a que la resolución en las relaciones entre los taxa puede verse afectada por los métodos de pesado de los caracteres, es conveniente medir la cantidad de señal filogenética involucrada en cada modelo de reconstrucción. Por ello, para poder distinguir entre señal filogenética y ruido o distribuciones azarosas de nuestros datos, se evaluó el estadístico g_1 propuesto por Hillis (1991). A pesar de que este estadístico ha sido considerado por algunos como inexacto, en realidad proporciona una estimación adecuada de la fortaleza de la señal filogenética y permite analizar si ocurre o no un cambio en la señal al aplicar determinados modelos de asignación de pesos diferenciales a los caracteres.

Resultados

Variación en las Secuencias y Divergencia

El gen citocromo b completo esta compuesto por 1,144 nucleótidos que al ser alineados, no presentaron la necesidad de gaps por inserciones o deleciones; de acuerdo a cualquier gen codificante. .

El cuadro 3 resume los valores de variación nucleotídica para el gen completo y por posición en el codón. Del total de posiciones 253 (22.11%) fueron sitios variables, de estos 161 (14.08%) fueron filogenéticamente informativos. Por posiciones, la tercera es la que incluía la mayoría de estos datos

La composición diferencial de bases muestra un sesgo en la segunda y tercera posición, así como en la secuencia total. Los valores obtenidos para el estadístico g_1 indican que los datos analizados contienen más señal de la esperada para una distribución azarosa. (Hillis y Huelsenbeck, 1992).

Los valores de divergencia estimados (Tamura y Nei, 1993) entre los individuos del grupo interno son en general bastante variables para el nivel poblacional (intraespecífico), llegando incluso a igualar la divergencia existente entre especies distintas. El rango va de 0.004 entre poblaciones de *R. chrysopsis* del D.F. y Morelos hasta 0.101 entre las poblaciones de Orizaba y Morelos. Esta distancia es semejante a la que existe entre *R. megalotis* y *R. sumichrasti*

especies distintas tomadas como grupos externos (Cuadro 4).

Análisis Filogenéticos

En todos los análisis realizados, las muestras geográficas de *R. chrysopsis* formaron un grupo monofilético con respecto a los grupos externos. El árbol obtenido por el análisis de neighbor-joining con el modelo de Kimura 2 parámetros, se presenta en (Árbol 4). En este árbol, el clado I está compuesto por los individuos del centro del país (D. F. y Morelos), que se encuentra cercanamente relacionado al clado II constituido por los dos individuos de Colima. Estas dos relaciones forman el clado III emparentado con Michoacán. Finalmente la población de Orizaba queda como la rama más basal de las relaciones del grupo interno (clado IV). En cuanto a los grupos externos, la especie *R. megalotis* y *R. sumichrasti* formaron un clado hermano (V) al grupo interno, mientras que la especie *R. fulvescens* resultó ser la más distante (clado VI). Las relaciones hacia fuera del grupo interno, concuerdan con lo reportado por Arellano (1999).

Al hacer el análisis bajo el criterio de parsimonia simple o no pesada, con búsqueda exhaustiva, y utilizando los taxones definidos como grupos externos, se encontraron 135,135 árboles, de los cuales solamente uno resultó el más parsimonioso con una longitud de 402 pasos, índice de consistencia de 0.75 y un valor de g_1 de - 0.80 (Árbol 1). La topología del árbol fue la misma que la evaluada por el análisis de neighbor-joining.

El análisis de parsimonia pesando diferencialmente la primera, segunda y tercera posiciones del codón resultó en 135,135 árboles. El único árbol más parsimonioso tuvo 481 pasos, un índice de consistencia de 0.76 y un valor de g_1 de -0.82 (Árbol 2). De la misma manera la topología se repitió.

Finalmente cuando se peso diferencialmente a las transiciones y las transversiones se obtuvo un solo árbol más parsimonioso con una longitud de 816 pasos, un índice de consistencia de 0.77 y una g_1 con valor de -1.0 . Una vez más se repitió la topología descrita (Árbol 3).

Para evaluar la robustez o solidez de las relaciones obtenidas, se llevó a cabo para cada árbol un análisis de los valores de bootstrap. Los valores que fueron siempre mayores a 90 se presentan en cada filogenia obtenida.

La posición filogenética de Colima y Michoacán en los árboles obtenidos no era de esperarse dada su posición geográfica. Por esta razón, por esta razón se decidió realizar un análisis de parsimonia con búsqueda exhaustiva excluyendo aquellos caracteres más variables (tercera posición). Este tipo de análisis reduce las posibilidades de saturación u homoplasia (cambios múltiples en una misma posición, que produce una subestimación de la variabilidad real). Se obtuvieron de nueva cuenta 135,135 árboles, de los cuáles uno resultó el más parsimonioso con 70 pasos, un índice de consistencia de 0.786 y un estadístico g_1 de -0.90 . Se obtuvo la misma topología, pero los valores de bootstrap disminuyeron hasta 76 para algunas ramas

Discusión

La variación en los nucleótidos muestra que el citocromo b aportó un número considerable de datos informativos para este tipo de análisis. Y dado que las bases no se encuentran distribuidas en igual proporción, es decir 25%, podemos inferir que las secuencias obtenidas siguen un modelo evolutivo.

Los porcentajes de bases se encuentran dentro de lo reportado para el género por Arellano (1999), siendo la base más abundante la adenina ~31%, seguida por la timina ~32%, citosina ~22% y la menos abundante guanina ~11%. Por otro lado, los valores obtenidos para el estadístico de g_1 señalan que existe buena señal filogenética en los datos, lo que permite asegurar que los cladogramas obtenidos no son agrupaciones azarosas de los taxones.

El rango de valores de distancia genética es bastante amplio, considerando que son poblaciones de la misma especie. Resulta relevante la distancia que existe entre las poblaciones de Orizaba y las poblaciones de Morelos y D.F. o con Michoacán. Si bien para algunos autores como Smith y Patton, (1993); Mink *et al.*, (1996) basta con una divergencia del 3% entre poblaciones para considerarlas especies distintas; con los datos obtenidos, no se cuenta con información suficiente para aseverar que *R. chrysopsis* es un complejo de especies y no una sola.

Se analizaron varios métodos como distancias y parsimonia con estrategias múltiples de peso a los caracteres con el fin de incluir en la evaluación procesos evolutivos que regulen los cambios en las secuencias. La consistencia en las topologías obtenidas bajo cualquier criterio, permite ver que los resultados son

reales con base en el marcador utilizado. Por otro lado, los valores de bootstrap en todas las parsimonias señalan que las relaciones de los árboles obtenidos son sólidas y válidas. Así mismo, los índices de consistencia reflejan la existencia de poca homoplasia, hecho que refuerza que los resultados obtenidos de estos datos son confiables. De igual manera, otro factor que apoya la confiabilidad de la topología obtenida es el estadístico g_1 cuyos valores negativos confirman que el arreglo topológico no es producto de distribuciones azarosas, sino de una adecuada señal filogenética.

Es importante señalar que el efecto que se produce al eliminar del análisis la tercera posición fue la disminución de los valores de bootstrap que comparativamente con el resto de las topologías obtenidas decayeron sensiblemente (valores mínimos de 76), sin embargo, se dio a la par un aumento en los índices de consistencia. Todo esto se debió a que siendo la tercera posición la más variable, también es la que aporta el mayor grado de homoplasia y por ello, al eliminarla aumenta el índice de consistencia, es decir disminuye la homoplasia, no obstante por la misma razón, al excluirla se pierden datos informativos valiosos, que producen valores menores de confiabilidad de las ramas del árbol obtenidas por este método (Griffiths, 1997). De cualquier manera, la topología encontrada mediante este análisis es idéntica a las previamente discutidas, por lo que es posible aseverar que la topología del árbol descrito bajo distancias y que se mantiene en todos los demás análisis, representa efectivamente la filogeografía de *R. chrysopsis*.

La cercana relación entre D.F. y Morelos, era de esperarse dada su cercanía geográfica, y esto concuerda con lo propuesto por modelos de especiación alopátrica. Sin embargo la relación de Colima antes que Michoacán parecería geográficamente no esperada, sin embargo si consideramos aspectos diferentes a los meramente geográficos, encontramos que ciertos autores como Fa y Morales (1991) y Lynch (1988) entre otros, hablan sobre áreas geográficas definidas dentro del EVT, con fauna y vegetación determinadas por factores ecológicos de escala regional, y que permiten diferenciar zonas con influencias e interacciones muy distintas unas de otras, a pesar de que todas ellas sean parte I EVT. Dichos patrones ecológicos a escala regional o local pueden ser la causa del aislamiento reproductivo de determinadas poblaciones dentro de una especie con distribución originalmente continua y flujo génico permanente, y en esta medida una vez aisladas, podrían estar sometidas a presiones evolutivas particulares, locales y únicas para esa población. Por otra parte, se sabe que los procesos estocásticos como la deriva génica o ciertos tipos de selección dirigida, en poblaciones pequeñas, pueden acelerar la tasa de evolución (Wilcox *et al.*, 1985) produciendo con ello una divergencia genética mayor si se compara a la de otras poblaciones de la misma especie que aún conserven distribuciones geográficas mayores y/o flujo génico continuo.

Lo antes descrito permite hacer inferencias o hipótesis del porque la distribución de Colima y Michoacán dentro de la filogeografía obtenida, no corresponde a lo esperada geográficamente. Podríamos decir que si bien la relación entre Colima y Michoacán parece incongruente siguiendo un criterio puramente geográfico, los datos obtenidos sugieren que las poblaciones de *R.*

chrysopsis se aislaron sin seguir un patrón geográfico definido, sino más bien procesos evolutivos locales o eventos geológico- ecológicos regionales presentes a lo largo del EVT.

Como ya se mencionó, varios autores reconocen la existencia de estas zonas geográficas con características particulares dentro del EVT, Fa y Morales, (1991), O'Farrel, (1980), Lynch (1985) entre otros. No obstante el reconocimiento de dichas áreas, existen discrepancias en los límites de exactos, por ejemplo Flóres *et al.*, (1974), incluye el pico de Orizaba y Cofre de Perote basado en ciertas características ecológicas como parte de la provincia volcánica del eje, mientras que utilizando factores climático-ecológicos regionales, los coloca en agrupaciones geográficas, distintas al resto del EVT. Estas distintas agrupaciones de la misma área geográfica, pero con criterios locales, resulta relevante dado que acorde con la filogeografía obtenida, el individuo de la población de Orizaba es el más distinto a todos los *R. chrysopsis* incluidos en el grupo interno de estudio, presentando divergencias hasta del 10% con otras poblaciones y además la morfología es coincidente en este punto, ya que para esta zona se reconoce la existencia de una subespecie con características morfológicas ligeramente distintas (Hooper, 1952).

Así pues debido a que genéticamente Orizaba es la población más alejada del resto y a su reconocimiento morfológico como una subespecie, pudo ser la población que se aisló primero del resto de las demás, presentando por ello la mayor divergencia genética. Bajo este escenario, a través de nuevos procesos

ecológico-geográficos de escala regional, Michoacán podría haberse aislado de aquella población con la que se encuentra geográficamente más cercana ubicada en Colima y de la cuál sin embargo diverge genéticamente en un 7%, mismo porcentaje que posee con resto del país y por lo cual resulta ser la segunda población con mayor divergencia. Es posible, que al tiempo que Michoacán se aislaba del resto de las poblaciones, Colima y el centro del país mantuvieran aún durante cierto tiempo a través de algún corredor de vegetación flujo génico, hasta su aislamiento total quizá producto de la fragmentación de dicho corredor o simplemente, las presiones de selección locales para dichas poblaciones fueron de menor magnitud que en el área de Michoacán, produciéndose así una divergencia menor entre ellas.

Para el centro del país es probable que o bien no haya pasado aún el suficiente tiempo para hacer evidente el aislamiento entre las poblaciones del D.F y Morelos, siendo estas las últimas en separarse, o que aún exista flujo génico entre ellas dada la cercanía geográfica.

Conclusiones

Las poblaciones analizadas de *R. chrysopsis* forman un grupo monofilético con respecto a los grupos externos.

Las poblaciones tanto de Orizaba como Michoacán presentan niveles de divergencia altos para los rangos de especie, por lo que podrían estar bajo en proceso de especiación. Sin embargo dicha hipótesis deberá ponerse a prueba utilizando otros marcadores moleculares, como genes nucleares o ribosomales y analizar si los datos obtenidos son congruentes con la variación morfológica.

Los datos generados con el marcador molecular citocromo b resultan confiables, por lo que se confirma su utilidad para el nivel poblacional.

Los factores ecológicos y geográficos combinados a nivel regional o local resultan ser fundamentales para explicar aquellas relaciones propuestas en la filogeografía obtenida y que no corresponden a un patrón de variación geográfica definido.

Las poblaciones aisladas en manchones pequeños son más susceptibles a procesos de presiones evolutivas a escala local, que pueden moldear u orillar a una divergencia genética rápida entre poblaciones de una misma especie.

Literatura Citada

Arellano, E. 1999. Molecular Phylogeny of the Genus *Reithrodontomys* (Rodentia: Muridae). Unpublished Ph. D. Thesis BYU, USA.

Avise, J.C. 1984. Demographic influences of mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20:99-105.

Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, Pp 3-29 y 30-68.

Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7:371-379.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography The history and formation of Species*. Harvard University Press, USA, Pp 3-35, 40-45 y 70-75.

Bibb, M. J., R. A. Vanetten, C. T., Wright, M. Walberg y D. A. Clayton. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26:167-180.

Bermingham, E. y C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7:367-340.

Ceballos, G., P. Rodriguez. 1995. (Diversidad y Conservación de los mamíferos de México, Patrones de Endemicidad) en *Avances en el Estudio de los mamíferos de México*. Medellín, R. y Ceballos Gerardo editores. Asociación Mexicana de Mastozoología AMMAC, México, Pp 87-109.

Challenger, A. 1998. Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México, Pasado, Presente y Futuro. CONABIO y Agrupación Sierra Madre, México, 847 pp.

Cunningham, C.W. 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution*, 14:733-740.

Engel, S. R., K. M. Hogan, J. F. Taylor, and S. K. Davis. 1998. Molecular Systematics and paleobiography of the South American sigmodontine rodents. *Molecular Biology and Evolution*, 15:35-49.

Erlich, H. A. 1989. PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, 246 pp.

Fa, J. E. y Morales L. 1991. Mammals and Protected Areas in the Trans-Mexican Neovolcanic Belt. University of Oklahoma Press, pp 199-223.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

Gottlieb, J. 1984. Traditional taxonomy against molecular data, frontiers and limitations. *Journal of Molecular Evolution*. 33: 135-149.

Griffiths, C. S. 1997. Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7:352-365.

Hagmeier, E. M., 1966. A numerical analysis of the distributional patterns of North American Mammals. *Systematic Zoology*, 13:125-155.

Hall, E. R., 1981. The Mammals of North America, Second Edition John Wiley and Sons Inc, New York pp 1-54

Hasegawa, M. H. Kishino, y T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22:160-174.

Heywood, V. H. 1995. Global Biodiversity and Assessment. Cambridge University Press, Nueva York.

Hillis, D. M. y James J. B. 1993. An empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 42:182-192.

Hillis, D.M. Discriminating between Phylogenetic Signal and Random Noise in DNA Sequences. 1991. *Journal of Heredity*, 83:278-293

Hillis, D.M. y J. P. Huelsenbeck. Signal, noise, and reliability in molecular

phylogenetic analysis. *Journal of Heredity* 83:189-195

Hillis, D. M., Moritz, Craig y Mable, Bárbara. 1996. *Molecular Systematics*. SINAUER Associates Inc., USA, pp 655.

Huelskenbeck, J. P. y Keith A. C. 1997. Phylogeny Estimation and Hypothesis Testing Using Maximum Likelihood. *Annual Review of Ecological Systematics*, 28:437-466.

Hooper, E.T. 1952. A systematic Review of the Harvest Mice (Genus *Reithrodontomys*) of Latin America. University of Michigan Press, USA, Pp 65-83.

Irwing, D. M., T, D, Kocher, y A. C. Wilson. 1991. Evolution of cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32:128-144.

Lara, M. C., Patton, L. J. y Da Silva, M. N. 1996. The Simultaneous Diversification of South American Echimyid Rodents (Hystricognathi) Based on complete Cytochrome b Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5:403-413.

Mares M. y Schmidly D., 1991. *Latin American Mammalogy, History, Biodiversity and Conservation*. Oklahoma Museum of Natural History Publication, USA, pp 199-205.

May, R. M. 1992. How many species inhabit the Earth? *Scientific American*, 267:42-48

Mindell, D. P. y C.E: Thacker. 1996. Rates of molecular evolution: Phylogenetic issues and applications. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:279-303

Mink, D. G. y J. W. Sites, Jr. 1996. Species limits, phylogenetic relationships, and origins of viviparity in *Scalaris* complex of lizards genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae: Sauria). *Herpetologica*, 52:552-571.

Mittermeier, R. A. 1988. Primate Diversity and the tropics forest, case studies from Brazil and Madagascar and the Importance of Megadiversity countries, en *Biodiversity*. Wilson E. O. editor. National Academy Press, USA, Pp 145-154.

Miyamoto, M y Cracraft Soel. 1991. *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. Oxford University Press, UK, Pp 3-45.

Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from MtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution*, 4:718-726.

Myers A. y Paul S. Giller. 1994. *Analytical Biogeography*. Chapman and Hall, USA, Pp 30-45.

O' Farrell, M. J. 1980. Spatial relationships of rodents in a sagebrush community.

Journal of Mammalogy, 61:589-605.

Owen, J.G. 1990. Patterns of mammalian species richness in relation to temperature, productivity, and variance in elevation. *Journal of Mammalogy*, 71:1-13.

Posada, D. Y Crandall K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.

Primack R., Ricardo R., Peter F., Rodolfo D. y Francisca M. 2002. *Fundamentos de Conservación Biológica Perspectivas Latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica pp 74-81.

Schaal, B. A., Hayworth D. A., Olsen K. M., Rauscher J. T. y Smith W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7:465-474.

Smith, M. F. y J. L. Patton. 1993. The diversification of South American muroid rodenys: evidence from mitochondrial DNA sequence data for akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50:149-177.

Smouse P. E., 1998. To tree or not to tree. *Molecular Ecology*, 7:399-412.

Sullivan, J., J.A. Market y C. W. Kilpatrick. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic biology*, 46:426-440.

Swofford, D .L 2000, PAUP. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony.*, version 4.0 Illinois Natural History survey, Champaign.

Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and Evolution*, 10:512-526.

Templeton, A. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution*, 37:221-232.

Watrouts, L. E. y A. D. Wheeler. 1981. The out-group comparison method of character analysis. *Systematic Zoology*, 30:1-11.

Wilcox, B. A. 1985. *Insular Ecology and Conservation*, en *Conservation biology and Evolutionary Ecological Perspective*. Soule M. y Bruce A. Wilcox editores. SINAUER Associates Inc., USA, pp 95-117.

Figuras

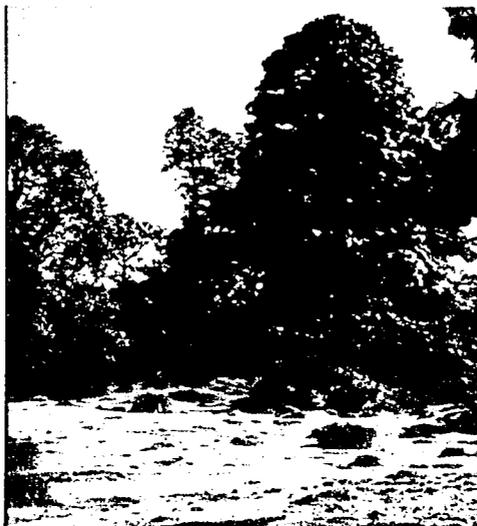


Fig. 1

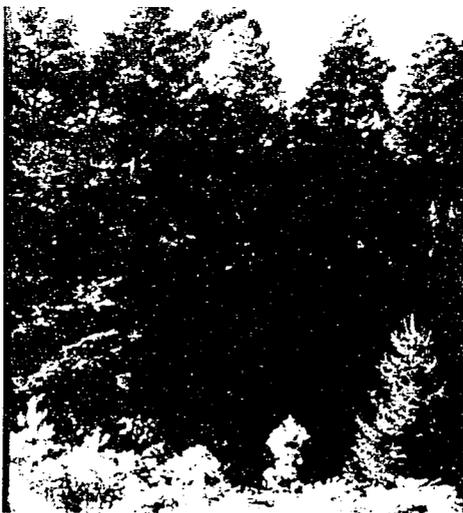


Fig. 2

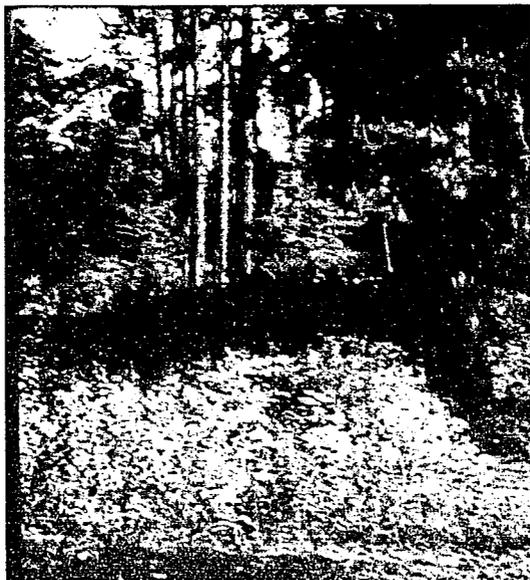


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

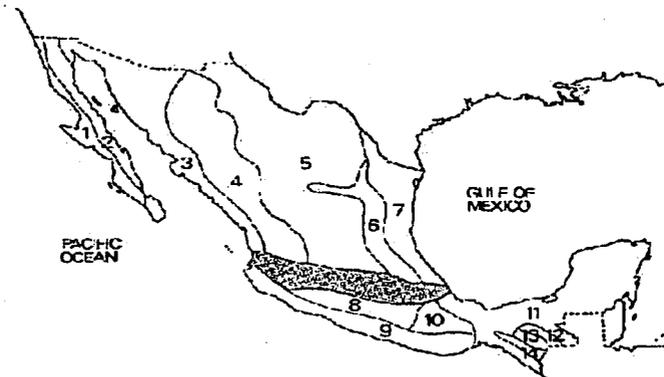


Fig. 6

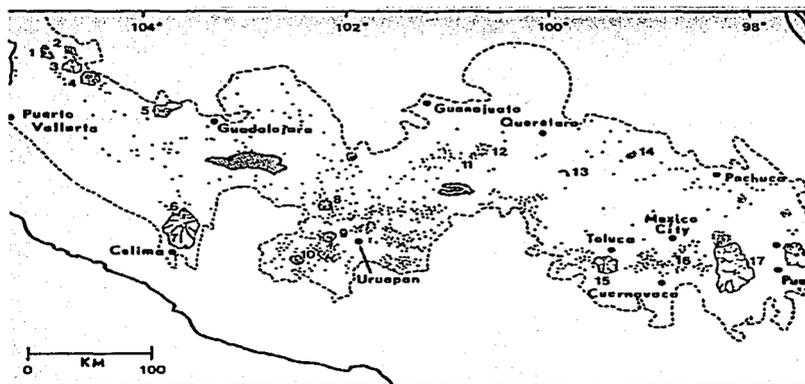


Fig. 7

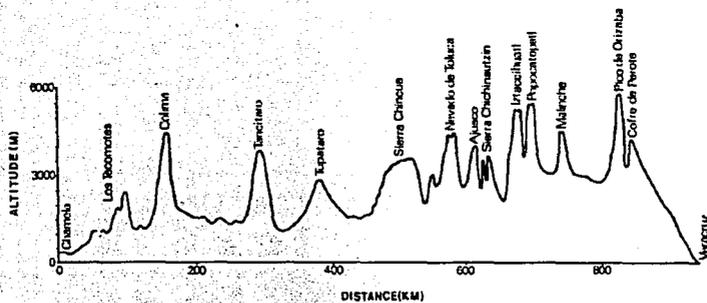


Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10

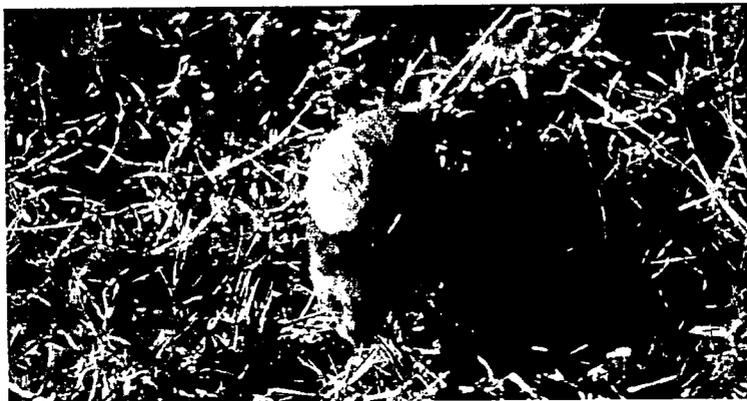


Fig. 11



Fig. 12



Fig. 13

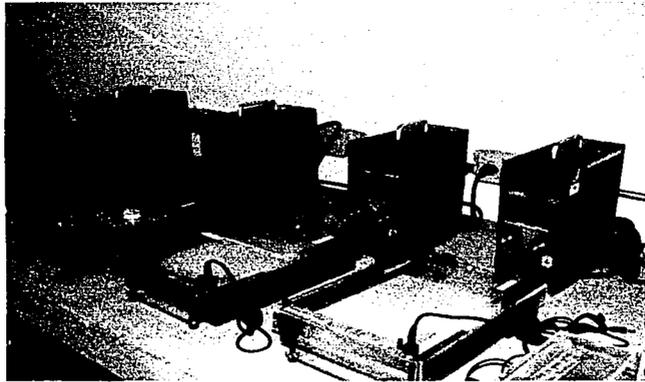


Fig. 14



Fig. 15

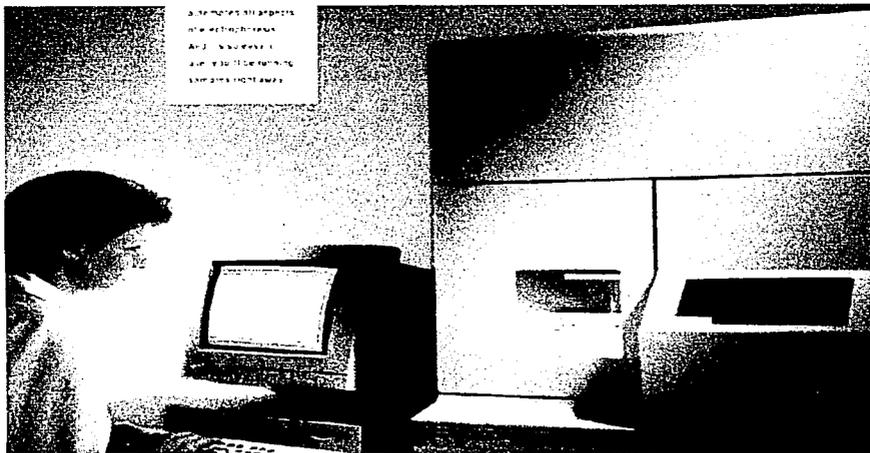


Fig. 16



Fig. 17

Cuadro 1. Lista sobre las poblaciones geográficas e información relativa a los individuos incluidos en este trabajo.

Localidad Geográfica	Número de Individuos Colectados	Número de Catálogo	Número de la Localidad en el Mapa
Colima, Volcán de Colima-Jalisco	2	FXG267 (1) FXG269 (2)	I
Michoacán, Cerro Tancitaro.	1	FXG255	II
Morelos, Lagunas de Zempoala.	1	EAACH4	III
D. F., Los Dinamos	1	EAACH3	IV
Veracruz, Pico de Orizaba	1	EAA1070	V

Cuadro 2. Primers utilizados para amplificar y / o secuenciar citocromo b. Las secuencias están listadas en la dirección 5' a 3' y la posición de cada primer dentro del gen esta dada con relación a la secuencia de ADNmt de *Mus musculus* publicadas por Bibb, et al, en 1981. Las literales L y H denotan ADN ligero o pesado respectivamente.

Citocromo- b	
Nombre del Primer Posición	Secuencia
MVZ-05-M ^{*a}	CTT GAT ATG AAA AAC CAT CGT TG L-14115
MVZ-45-M ^{*a}	GTH ATA GCH ACA GCA TTY ATA GG L-14527
MVZ-41 ^c	CAC CCT TAY TAY ACM AYY AAA GA L-14821
MVZ-17 ^{*c}	CC TCC TAG GAG AYC CAG AHA AYT L-14904
MVZ-O4-M ^{*a}	CCT CAR AAK GAT ATT TGB CCT C H-145542
MVZ-16 ^{*a}	TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT RAT H-14940
MVZ-14-M ^{*a}	TCT TCA TCT YHG GYT TAC AAG AC H-15309

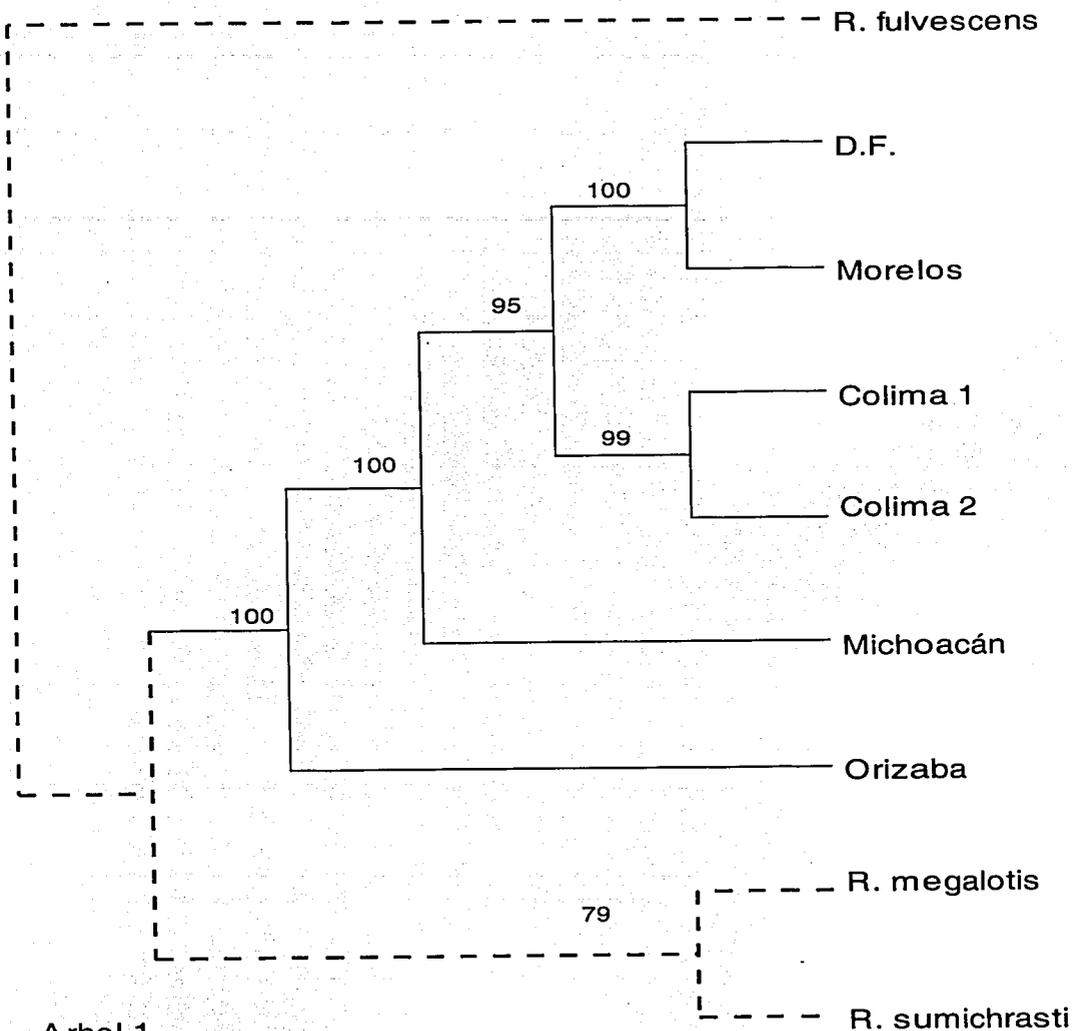
* Primers utilizados para amplificación y secuenciamiento

M Secuencia modificada de la referencia original por Arellano (1999)

Fuente Original:

^a Smith and Patton (1993)

^c Margaret Smith com. pers. (Arellano,1999)



Arbol 1

Parsimonia Simple.

Los numeros sobre el arbol son los valores de bootstrap

C.I. = 0.75

g1 = -0.80

Cuadro 3. Variación de los caracteres y de la señal presente en citocromo b.

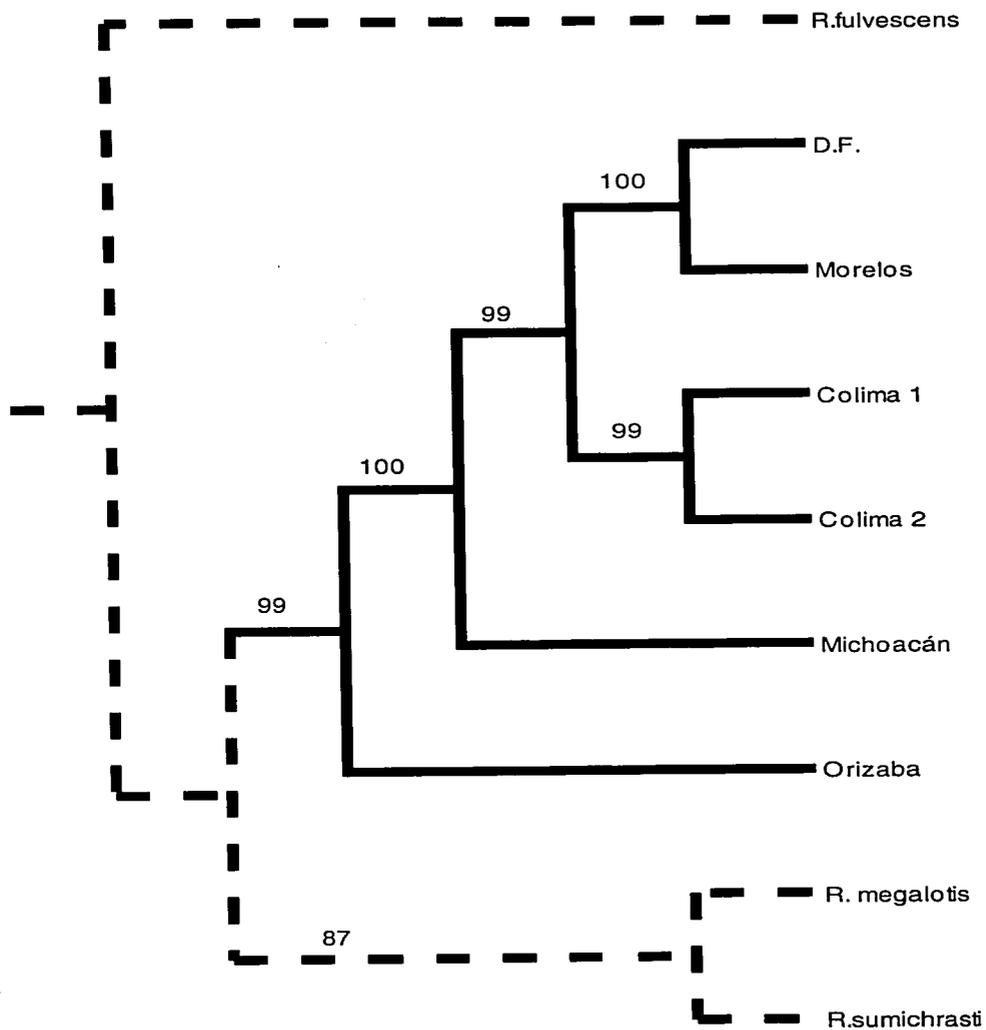
Posición	1a	2a	3a	Total
Caracteres analizados	382	381	381	1144
Número de sitios variables	44	9	200	253
% de sitios variables	11.5	2.3	52.49	22.11
Número de sitios informativos	29	4	128	161
% de sitios informativos	7.5	1.04	33.59	14.08
Frecuencias de nucleótidos				
A	0.29	0.20	0.45	0.31
C	0.22	0.24	0.21	0.22
G	0.22	0.01	0.12	0.11
T	0.24	0.42	0.32	0.32
Valor de g_1				
Todos los taxones	-0.83	-1.54	-0.63	-0.88
Grupo interno	-0.82	-1.6	-0.8	-0.77

Cuadro 4. Matriz de distancias Tamura-Nei

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>R. fulvescens</i>	-								
2 D.F.	0.21654	-							
3 Morelos	0.22539	0.00448	-						
4 Colima 1	0.22809	0.05120	0.05533	-					
5 Colima 2	0.22172	0.04391	0.04784	0.00718	-				
6 Michoacán	0.22578	0.07052	0.07467	0.05801	0.05316	-			
7 Orizaba	0.20882	0.09772	0.10132	0.06808	0.06951	0.07704	-		
8 <i>R. Megalotis</i>	0.19800	0.23091	0.23417	0.22505	0.22495	0.17765	0.09995	-	
9 <i>R. Sumichrasti</i>	0.21445	0.20676	0.21559	0.20926	0.21215	0.16696	0.15788	0.10457	-

Notas: Distribución Gamma = 0.5

Los individuos 2 a 7 pertenecen a la especie *R. chrysopsis*



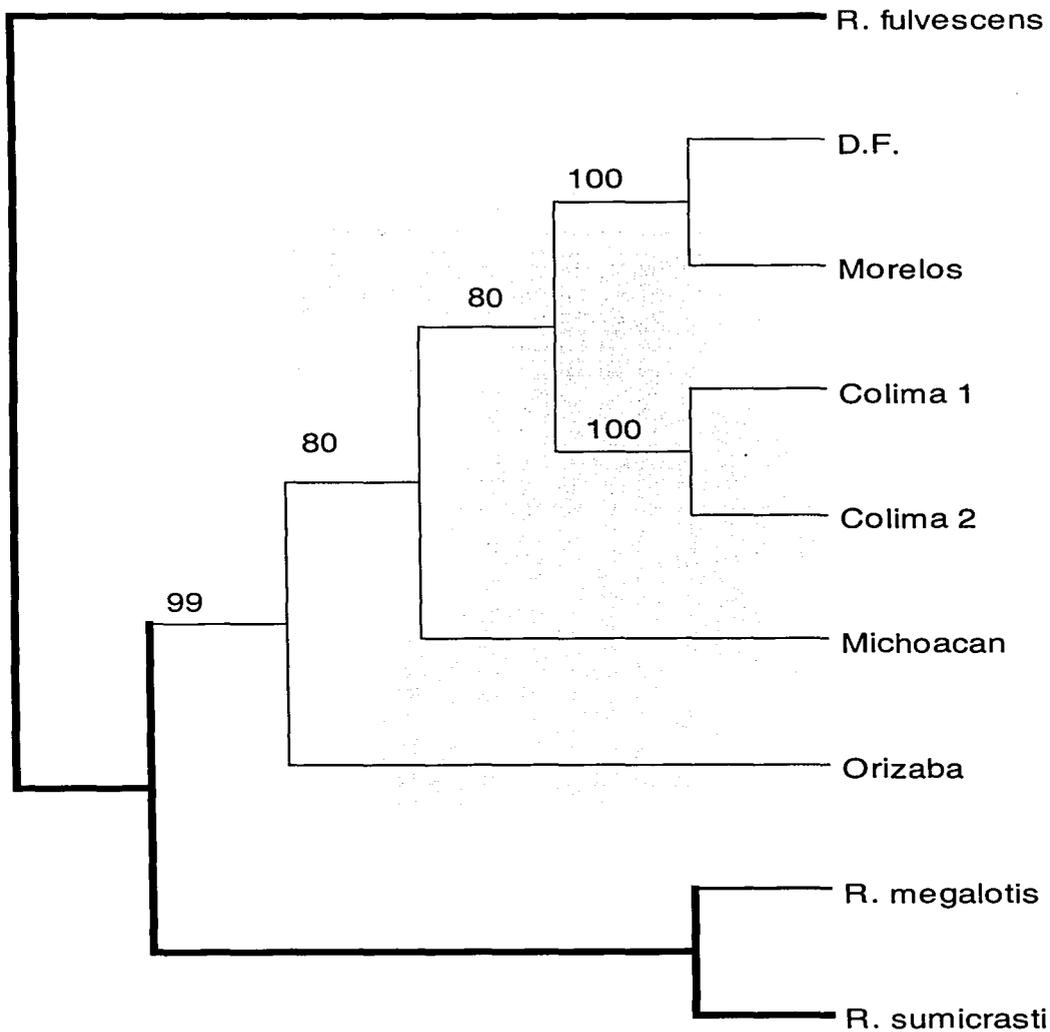
Arbol 2

Parsimonia Pesando Posiciones

Los numeros sobre el arbol indican los valores de bootstrap

C. I. = 0.75

g1 = -0.80



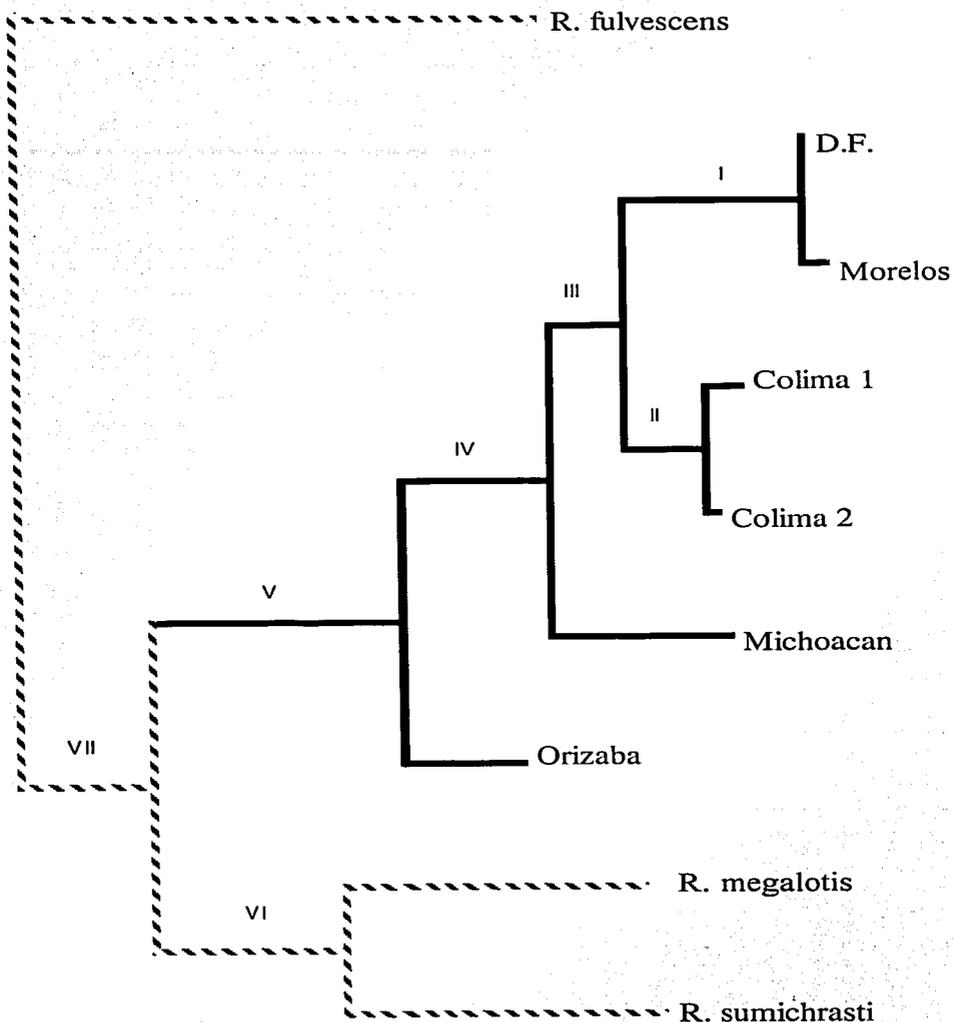
Arbol 3

Numeros en las ramas indican los valores de bootstrap

Parsimonia diferencial para transiciones y transversiones (10:1).

C. I. = 0.77

g1 = 0.79

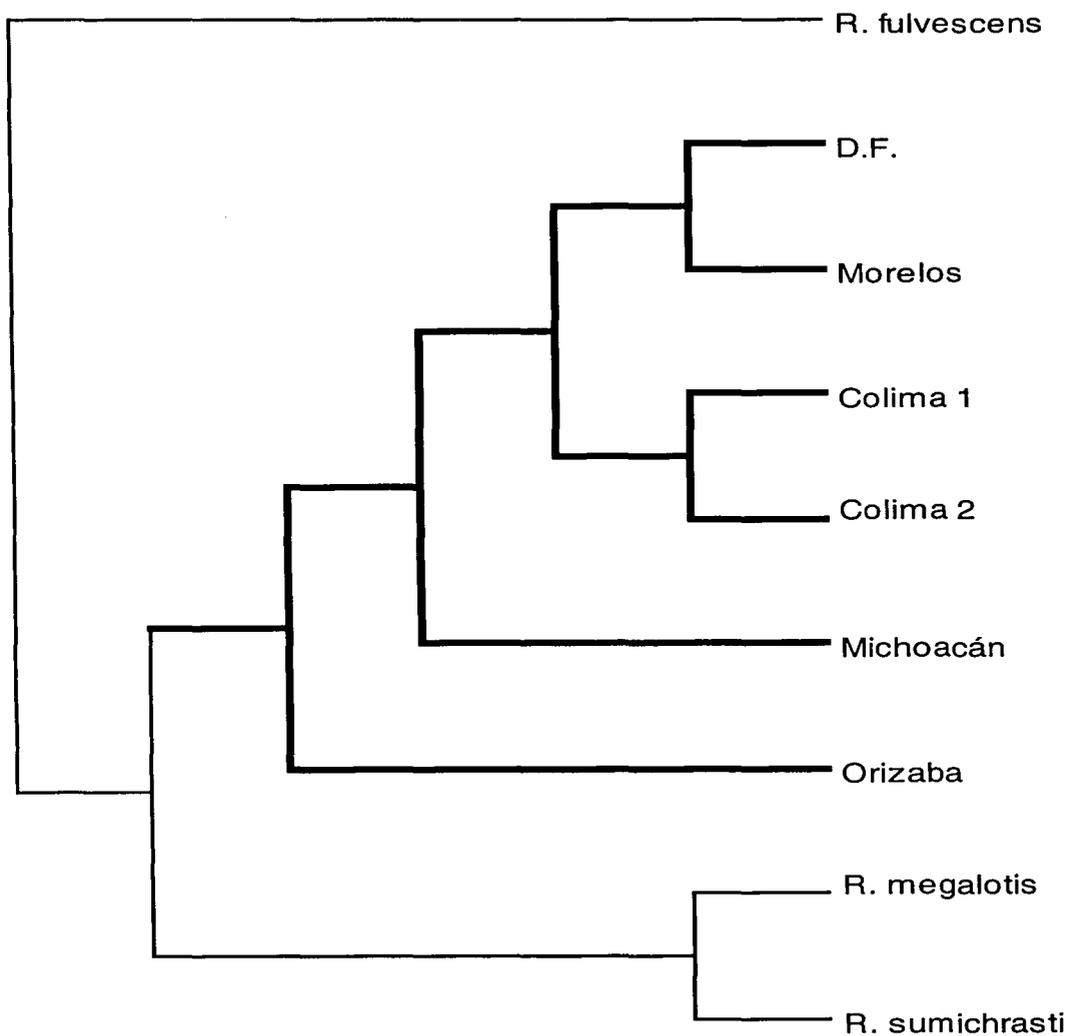


Arbol 4

— 0.01 substituciones/site

Arbol de Neighbor-Joining
Modelo Kimura 2 Parametros

Filogeografía de *Reithrodontomys chrysopsis*



Arbol 5