



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**Dirección General de Investigación**  
**Coordinación General de Programas**

**PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN**  
**EN RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE**

**INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN 2011**

**CÓDIGO 2-22**

**Título del proyecto:**  
**Filogeografía de los ratones de montaña del grupo**  
***Peromyscus mexicanus* en el norte de Centroamérica**

**Equipo de investigación:**  
**Sergio Guillermo Pérez C., Coordinador**  
**Liza Carola Ixcot Yon, Investigadora**  
**Hugo Enríquez Ortíz, Auxiliar de Investigación II**

**Guatemala, marzo de 2012**

**Instituciones participantes y co-financiantes:**  
**Dirección General de Investigación, USAC**  
**Museo de Historia Natural, USAC**  
**Instituto de Ecología, UNAM**



*Peromyscus yucatanicus*

# Índice General

		<b>Página</b>
<b>1.</b>	<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Introducción</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>8</b>
<b>4.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>4.1</b>	<b>Generales</b>	<b>10</b>
<b>4.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>10</b>
<b>5.</b>	<b>Métodos</b>	<b>11</b>
<b>5.1</b>	<b>Recopilación de muestras de colecciones y trabajo de campo</b>	<b>11</b>
<b>5.2</b>	<b>Extracción de ADN</b>	<b>11</b>
<b>5.3</b>	<b>Amplificación del gen citocromo b</b>	<b>13</b>
<b>5.4</b>	<b>Secuenciación</b>	<b>15</b>
<b>5.5</b>	<b>Alineación y edición de secuencias</b>	<b>15</b>
<b>5.6</b>	<b>Diversidad genética</b>	<b>15</b>
<b>5.7</b>	<b>Modelo de sustitución nucleotídica</b>	<b>15</b>
<b>5.8</b>	<b>Estimación de árboles de haplotipos</b>	<b>15</b>
<b>5.9</b>	<b>Estimación de red de haplotipos</b>	<b>16</b>
<b>5.10</b>	<b>Análisis de clados anidados</b>	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>17</b>
<b>6.1</b>	<b>Diversidad genética</b>	<b>17</b>
<b>6.2</b>	<b>Filogenia molecular</b>	<b>19</b>
<b>6.3</b>	<b>Red de haplotipos y análisis de clados anidados</b>	<b>22</b>
<b>7.</b>	<b>Discusión de resultados</b>	<b>24</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>27</b>
<b>9.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>28</b>
<b>10.</b>	<b>Referencias</b>	<b>29</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos</b>	<b>30</b>

# Índice de Ilustraciones

## Figuras

No.	Figura	Página
1	<i>Peromyscus</i> del grupo <i>mexicanus sensu lato</i>	2
2	Núcleo de Centroamérica	8
3	Filogenia del género <i>Peromyscus</i>	9
4	Equipo de campo	11
5	Mapa de localización de muestras	12
6	Protocolo de extracción de ADN	12
7	Muestras de tejido y extracciones de ADN	13
8	Electroforesis	13
9	Amplificación	14
10	Gel de agarosa	14
11	Cromatograma de secuencia de ADN	15
12	Grafica de diferencias pareadas	18
13	Filograma de haplotipos	20
14	Red de haplotipos	22

## Tablas

No.	Tabla	Página
1	Diversidad haplotípica	17
2	Análisis Molecular de Varianza	18
3	Matriz de distancias genéticas	19

# 1. RESUMEN

La filogeografía es una disciplina biológica de reciente aparición que trata del estudio de la variación genética de los organismos vivos, al nivel de poblaciones de una misma especie o de especies cercanamente emparentadas, y sus patrones de distribución geográfica. Este estudio en particular se enfoca en un grupo de seis especies de ratones de montaña del grupo *Peromyscus mexicanus*, que tienen en general distribuciones alopátridas y que alcanzan su mayor diversidad en el llamado Núcleo de Centroamérica, es decir las montañas que se encuentran delimitadas por el Istmo de Tehuantepec, en México, hasta la depresión de Nicaragua. En los bosques húmedos de montaña del norte de Centroamérica, principalmente bosques de pino-encino y nuboso-pluviales, son en muchas ocasiones los ratones dominantes y sus capturas con trampas Sherman son muy frecuentes en estudios de mamíferos menores que se realizan en las áreas protegidas de bosques nubosos de la región. La importancia de su estudio radica en que todavía desconocemos los patrones históricos que conformaron la biota de esta región montañosa tan particular y su estudio contribuirá, junto a al conocimiento de otros *taxa*, al mejor entendimiento de esta riqueza natural, para entre otras cosas, generar estrategias de conservación mas efectivas.

El estudio se basó en la secuenciación de ADN de un fragmento de 400 pares de bases del gen mitocondrial citocromo b. En total se trabajaron 144 muestras originarias de 25 localidades entre Veracruz y Costa Rica. La extracción del ADN y su amplificación (PCR) se realizaron en los laboratorios del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que este estudio forma parte de una tesis de doctorado que se realiza bajo un convenio entre la Universidad de San Carlos y la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los resultados de este estudio muestran que el grupo *P. mexicanus* es monofilético si incluimos solamente a seis especies que habitan los bosques húmedos de montaña del Núcleo de Centroamérica: (***P. zarhynchus*, ((*P. mexicanus*, *P. gymnotis*), (*P. guatemalensis* (*P. grandis*, *P. nudipes*)))**). *Deben excluirse del grupo (para cumplir con el requisito de monofiletismo) las especies de tierras bajas que tradicionalmente se incluían en el mismo en estudios anteriores, como *P. yucatanicus* y *P. stirtoni*.*

En general, la diversidad genética del grupo es muy alta, con 70 sitios (de 435) variables, y 79 mutaciones distintas. Los sitios informativos parsimoniosos fueron 49. El número promedio de diferencias nucleotídicas fue  $k: 13.10033$  y la diversidad nucleotídica  $Pi: 0.05261$ . Se encontraron 44 distintos haplotipos y la diversidad haplotípica es en general muy alta (0.96303), aunque muy variable en cada una de las distintas localidades. Existen diferencias significativas en las distancias haplotípicas (FST) entre las 25 localidades analizadas (AMOVA: FST total 0.06398,  $P:0.00000 \pm 0.00000$ , 1023 permutaciones), aunque la mayor variación (93.60%) es debida al interior de las poblaciones locales y una menor cantidad (6.40%) es entre poblaciones. Los datos genéticos en general indican una alta estructuración genética asociada a la geografía local, apoyando la hipótesis de la naturalidad de las especies actualmente reconocidas e indicando la posible presencia de especies crípticas aún desconocidas.

Las seis especies de montaña tienen en general un patrón de distribución (y especiación) alopátrida, aparentemente similar a lo encontrado en otros organismos de montaña co-distribuidos, como escarabajos y salamandras, aunque los análisis muestran una gran variedad de historias evolutivas a lo interno del grupo, incluyendo flujo genético restringido con aislamiento por distancia, fragmentación alopátrida reciente (este de Guatemala-oeste de Honduras-El Salvador), dispersión genética restringida con indicios de dispersión a gran distancia (este de Honduras-Costa Rica), y expansión de rango continua (occidente de Guatemala-este de Chiapas). Las barreras biogeográficas propuestas como el Río Lempa, Río Ixcán, Istmo de Tehuantepec y Depresión de Nicaragua no coinciden con los límites de los clados mayores en la filogenia general del grupo. La importancia aparente del Valle del Motagua (principalmente en la cuenca alta) como barrera biogeográfica entre linajes o clados distintos, parece ser la excepción a esa regla. Se hace necesario continuar con estudios mas específicos de los linajes particulares y hacer una revisión taxonómica de todo el grupo que incluya aspectos morfológicos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde el primer trabajo evolutivo y filogenético planteado por Carlos Darwin hace ya casi doscientos años, principalmente en relación a los pinzones de las Islas Galápagos, se han realizado muchos esfuerzos para comprender los procesos evolutivos en diferentes biotas del mundo, pero aún hoy, a principios del siglo veintiuno, la biota del norte de Centroamérica es una de las menos conocida.

Desde la época de Darwin la biología ha tenido importantes avances conceptuales y metodológicos, incluyendo entre otros la comprensión del funcionamiento básico de los genes, las leyes de la herencia y su relación directa con la evolución y distribución de los organismos vivos. Otro cambio conceptual muy radical lo constituyen la aparición de los conceptos de la sistemática moderna que, entre otras cosas, han permitido la aplicación del método científico en temas de evolución, biogeografía, ecología, y tantas otras disciplinas biológicas que se han revolucionado junto a sus aplicaciones prácticas.

La filogeografía es una de las disciplinas biológicas de más reciente aparición, y tiene sus orígenes parcialmente en la sistemática y en la genética de poblaciones, principalmente. Se basa en la idea general de que las especies presentan una estructura (variación) genética que es correspondiente con su distribución geográfica y que esta estructura puede ser explicada por eventos históricos (biológicos) que le precedieron. Para esto se utilizan marcadores moleculares (genes) que nos permiten describir esa variación genética y evidenciar su historia evolutiva. Probablemente el estudio filogeográfico más conocido es de la “Eva humana”, con la que se ha re-confirmado el origen Africano de la humanidad. Una desventaja de los métodos moleculares es que son onerosos, sin embargo cada día estos análisis se abaratan más.

El presente trabajo es parte de una tesis de doctorado en ciencias biológicas establecido en Guatemala, que pretende realizar, entre otras cosas, la primera investigación en el país en este tema tan apasionante como es la evolución de la vida en Centroamérica desde el punto de vista intraespecífico y de especies cercanamente emparentadas.

Se seleccionaron los ratones del grupo *Peromyscus mexicanus* porque son organismos no voladores (baja capacidad de dispersión), pequeños y con altas tasas reproductivas (y mutacionales) que restringen su hábitat a los bosques húmedos de montaña.

### 3. ANTECEDENTES

La biota centroamericana es el resultado de complejos fenómenos donde han intervenido la historia geológica, la dispersión de grandes grupos de fauna y flora, cambios climáticos y la radiación adaptativa local, entre otros; lo que ha hecho de la misma, una de las regiones más biodiversas del planeta. La regionalización biogeográfica del área es aún incompleta, debido en parte al desconocimiento que se tiene de cada uno de estos fenómenos mencionados, pero en general se considera que las montañas del sur de México y norte de Centroamérica forman una unidad biótica particular, como parte de la Provincia Mesoamericana de Montaña, donde frecuentemente se presenta patrones de distribución alopátrida.

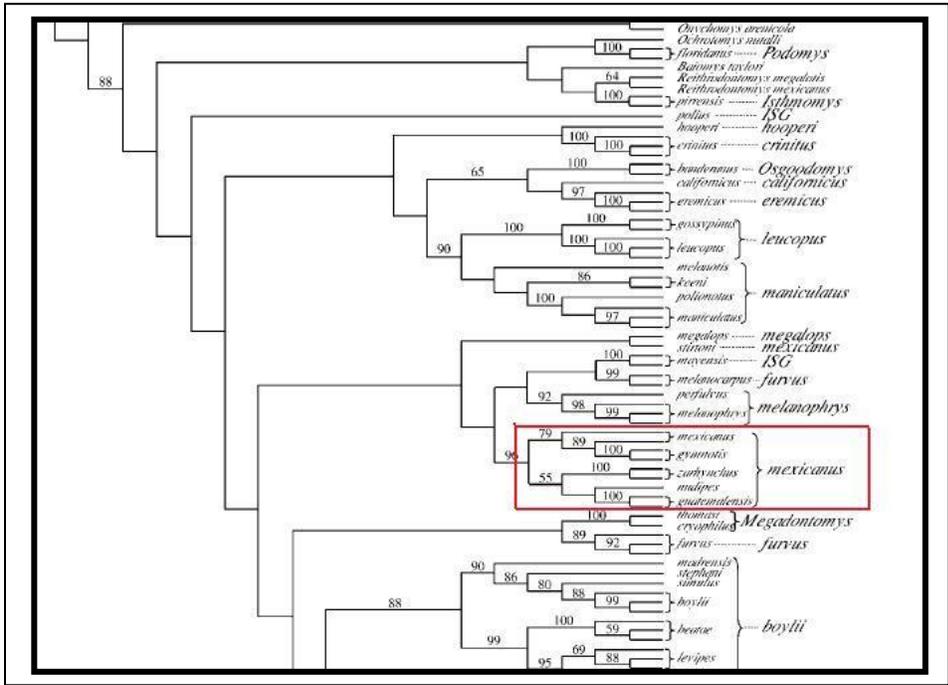


**Figura 2.** Centroamérica Nuclear, delimitada por los istmos de Tehuatepec y Depresión de Nicaragua, y el área de endemismo de las tierras altas de Chiapas y Guatemala, en azul (Flores Villela y Goyenechea, 2001).

Los ratones más abundantes en el norte de Centroamérica son los del grupo de especies *Peromyscus mexicanus*, los cuales presentan, en su mayoría, una distribución alopátrida y fragmentada. El grupo también es muy conservador en sus cariotipos (Smith *et al.* 1986), pero heterogéneo en el ADN mitocondrial (Lorenzo y García 2007), características que podrían coincidir con las categorías filogeográficas I y II de Avise (2000), es decir que en general presentan estructura filogeográfica bien definida.

Pero el problema es que las especies fueron inicialmente definidas en base a criterios principalmente morfométricos (Huckaby 1980) y no están nada claras las barreras reproductivas ni los límites entre las mismas. En este trabajo se interpreta el grupo *Peromyscus mexicanus* en el sentido de Bradley *et al.* (2007), poniendo en un solo clado a especies mesoamericanas que habitan bosques húmedos latifoliados de montaña, desde el centro de México (con *P. mexicanus* y *P. melanophrys*), Centroamérica Nuclear (*P. mexicanus*, *P. zarhynchus*, *P. guatemalensis*, *P. grandis* y *P. gymnotis*) hasta Centroamérica Meridional (*P. nudipes*).

Del clado de Bradley *et al.* (2007) claramente se excluyen *P. mayensis*, *P. yucatanicus* y *P. stirtoni*, que tienen posiciones muy controversiales dentro de la filogenia general de *Peromyscus* y que además se distinguen por el hábitat que ocupan (bosques secos), aunque en este estudio se utilizarán algunas muestras de estos ratones por motivos de comparación. Este estudio se restringe entonces a las cinco especies de montaña que se distribuyen en el norte de Centroamérica: *P. mexicanus*, *P. guatemalensis*, *P. zarhynchus*, *P. grandis* y *P. gymnotis*.



**Figura 3.** Filogenia del género *Peromyscus* según Bradley et al. (2007), mostrando la monofilia del clado de ratones de montaña del grupo *mexicanus*, que se muestra encerrado en cuadro rojo. *P. stirtoni* no pertenece al mismo clado y se distribuye en una zona biogeográfica distinta (bosque seco).

Debido a estos problemas biogeográficos, morfológicos y filogenéticos en este trabajo se hace caso omiso (en gran parte) a las categorizaciones previas y se plantea un nuevo enfoque del problema desde un punto de vista filogeográfico-poblacional, lo que nos permitirá abordar el tema de una manera menos sesgada.

Muchas decisiones y prioritizaciones en relación a la protección de la naturaleza se basan en criterios que no siempre son correctos o suficientes. Algunos estudios de biodiversidad se realizan solo al nivel de especies y en una o pocas localidades cercanas, olvidándose de otros niveles de la biodiversidad como el de diversidad genética intraespecífica o poblacional. Los criterios de endemismo y extinción pueden ya no ser tan claros cuando entramos en discusiones taxonómicas, genéticas, biogeográficas, etc. Otro ejemplo puede ser la incorrecta clasificación de las zonas boscosas (p.e. nubosas) basados solo en imágenes aéreas o satelitales, ya que podemos estar pasando por alto importantes procesos evolutivos que nos ayudarían a dirigir mejor nuestras acciones de conservación. Algo similar ocurre en el tema de los corredores biológicos, el rescate y reintroducción de fauna, etc.

## 4. OBJETIVOS

### General

El objetivo general es inferir la historia evolutiva y filogenética de las poblaciones de ratones del grupo *P. mexicanus* en el norte de Centroamérica.

### Específicos

- a) Obtener la filogenia molecular (filograma) del grupo utilizando ADN mitocondrial (gen citocromo b).
- b) Realizar un análisis de la distribución genealógica y geográfica de los haplotipos, así como un análisis exploratorio de correspondencias geográficas (Análisis de Clados Anidados –ACN-)
- c) Identificar procesos evolutivos responsables de la distribución actual de los ratones del grupo *P. mexicanus*.
- d) Identificar áreas prioritarias para la conservación, según los datos moleculares y poblacionales de este grupo de ratones.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Recopilación de muestras de colecciones y trabajo de campo:

Se realizaron solicitudes de muestras de tejidos a cuatro instituciones: Universidad de San Carlos de Guatemala, Ecosur-Chiapas, Museum of Vertebrate Zoology y Carnegie Museum of Natural History. De esta manera se obtuvieron muestras de *Peromyscus* de cuatro países: México (Chiapas y Veracruz), Guatemala, El Salvador y Honduras.

También se realizaron exploraciones y nuevas colectas en varias localidades de Guatemala y El Salvador. Las capturas de ratones se realizaron mediante el uso de trampas Sherman y Museum Special. Se prepararon en el campo pieles de estudio y ejemplares en líquido, obteniéndose también muestras de tejidos (riñón, hígado, corazón o piel), preservados en viales (Nalgene) con alcohol etílico al 95% (Figuras 4 y 7).

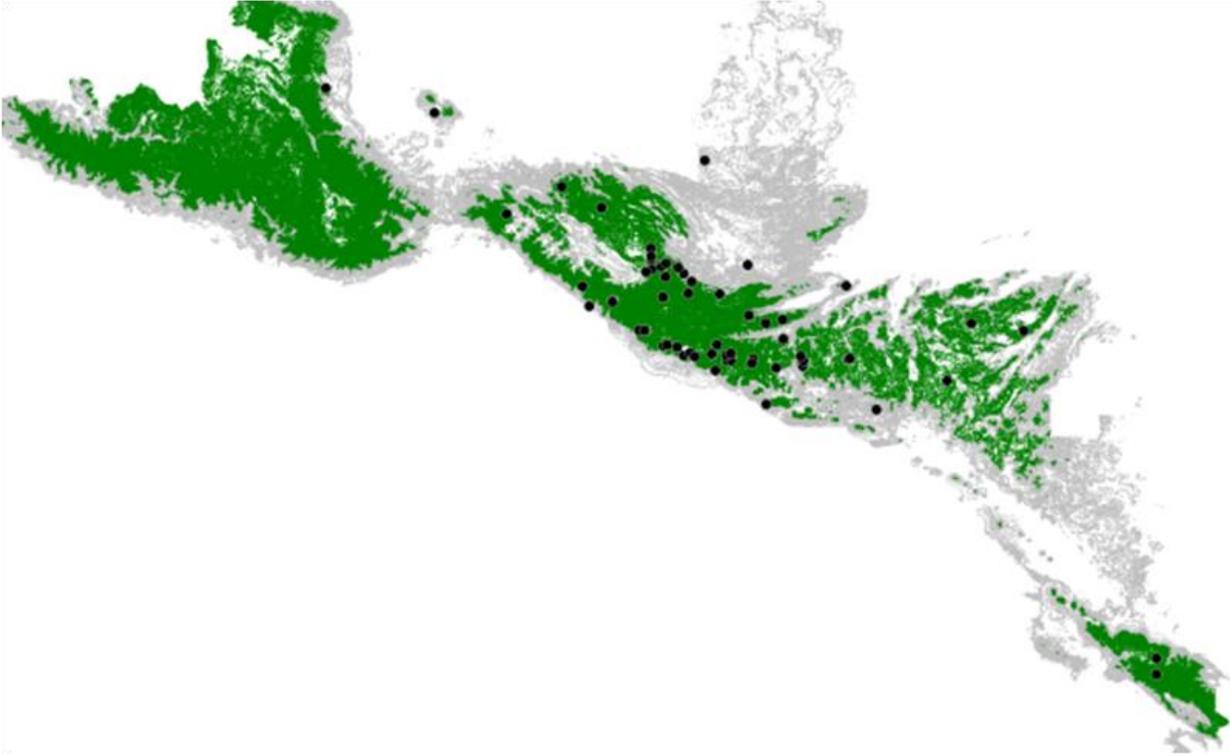


**Figura 4:** Equipo de campo: trampas Sherman y de golpe para la captura de ratones (izquierda) y viales para la preservación de tejidos en el campo (derecha).

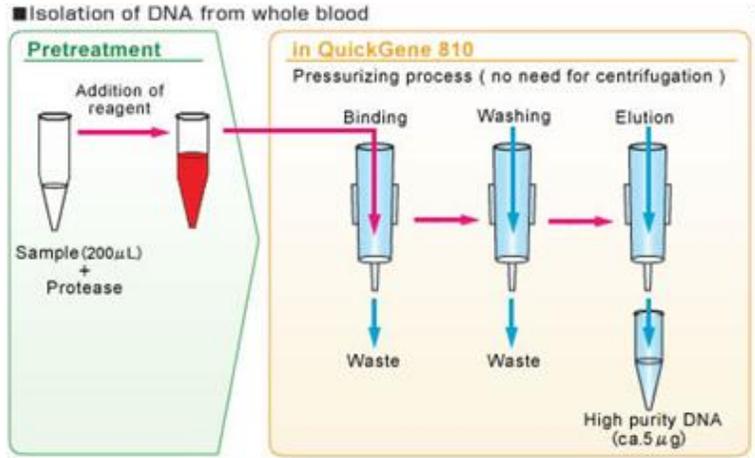
### 5.2 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído principalmente de muestras de hígado, riñón, corazón y músculo, utilizando los kits Fujifilm (Figura 6) y Qiagen DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, California) siguiendo los protocolos establecidos para esos casos. Los datos fueron corroborados en gel de agarosa (Figura 8), antes de continuar con la fase de amplificación (Figura 9).

Los productos de la extracción fueron almacenados en congelación hasta iniciado el proceso de amplificación (Figura 7):



**Figura 5.** Mapa preliminar de localización de los ejemplares de seis especies del grupo *P. mexicanus* en el sur de México y Centroamérica. En colores verde y azul se indican los principales sistemas montañosos de la región.



**Figura 6.** Muestras de tejido, a la izquierda, y sus correspondientes extracciones de ADN a la derecha



**Figura 7.** Muestras de tejido, a la izquierda, y sus correspondientes extracciones de ADN a la derecha.



**Figura 8.** A la izquierda, cámaras de electroforesis y a la derecha un transiluminador de luz ultravioleta para visualización del ADN marcado con bromuro de etidio.

### 5.3 Amplificación del gen Citocromo b:

Se amplificó un primer fragmento de 400 pares de bases (pb) del gen mitocondrial Citocromo b, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los siguientes cebadores universales para vertebrados:

MVZ-05-M (forward): CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G (Invitrogen)

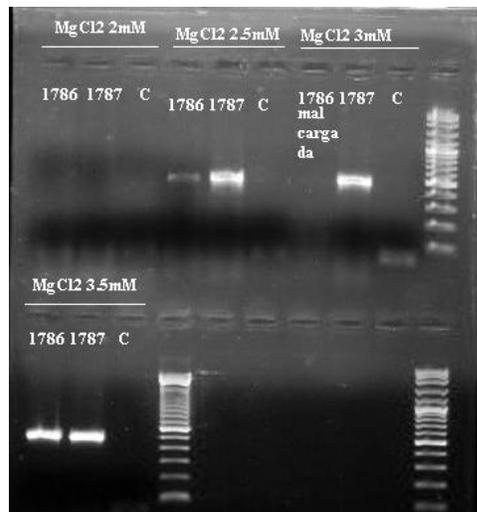
MVZ-04-M (reverse): GCA GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT C (Invitrogen)

Primero se realizaron varias pruebas con diferentes concentraciones del “Master Mix”, que fueron primero corroboradas en gel de agarosa y posteriormente mediante los resultados de la secuenciación (Figura 4). Finalmente se estandarizó el Master Mix y cada muestra de PCR de 25mL (microlitros) contenía las siguientes cantidades de compuestos (en microlitros): H<sub>2</sub>O: 12.05, MgCl (50mM): 1.75, Buffer A 10X: 2.5, dNTP’s (2mM): 2.5, Primer forward (MVZ-05, 10uM): 2.5, Primer reverse (MVZ-04, 10uM): 2.5, Taq Polimerasa (2.5 U): 0.2, y un mL de muestra de ADN (de extracción). Las mezclas para el PCR se colocaron en un termociclador programable MJResearch con la siguiente secuencia: un primer paso de

desnaturalización de 4 minutos a 94°C, 34 ciclos de 1min a 94°C (desnaturalización) + 1min a 50°C (alineamiento del cebador) + 1min a 72°C (elongación de la cadena), un sexto paso de 4min a 72°C de elongación final y un último paso de conservación y enfriamiento de 10min a 4°C.



**Figura 9.** Amplificación de ADN: preparación del Master Mix para la amplificación del adn en un termociclador (derecha). Se observan también las pipetas y los tubos conteniendo los diferentes componentes del "Master Mix" (izquierda), Instituto de Ecología, UNAM.



**Figura 10.** Ejemplo de pruebas de PCR y corroboración en gel de agarosa

#### 5.4 Secuenciación:

Las muestras fueron enviadas por correo en placas de 96 muestras a la empresa High-Throughput Genomics de la Universidad de Washington en Seattle, Washington, para su secuenciación automática. En este proceso se utilizaron los mismos cebadores para la reacción de secuenciación cíclica (MVZ-05M y MVZ-O4M). Posteriormente fueron recibidos por internet los resultados de los cromatogramas y las secuencias potenciales para cada una de las muestras (Figura 11).

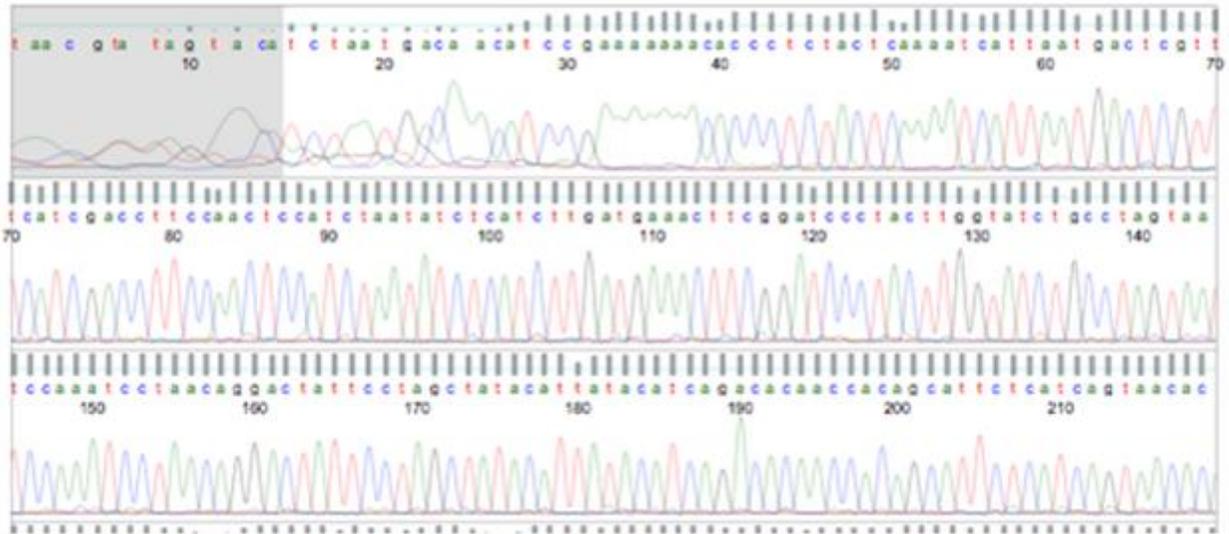


Figura 11. Ejemplo de un cromatograma que representa una secuencia de ADN

#### 5.5 Alineación y edición de secuencias:

Las secuencias de ADN fueron sometidas primero a un procedimiento de alineamiento múltiple con el método ClustalW del programa BioEdit (Hall, 1999), y se terminaron de editar manualmente, incluyendo el recorte del primer fragmento correspondiente al cebador, utilizando como referencia varias secuencias conocidas obtenidas de GeneBank.

#### 5.6 Diversidad genética:

Se analizaron los porcentajes de sitios polimórficos (sitios con más de un estado de carácter a la vez) y la diversidad haplotípica utilizando el programa DnaSP versión 4.50.3 (Librado & Rozas, 2009) y MEGA

#### 5.7 Modelo de sustitución nucleotídica:

Para la estimación del mejor modelo de sustitución nucleotídica (necesario para la posterior estimación de filogramas) se utilizó el programa ModelTest 0.1.1 (Posada, en prensa).

#### 5.8 Estimación de árboles de haplotipos (Filogramas):

Se construyó una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre haplotipos mediante criterios máxima verosimilitud (ML), utilizando el programa PhyML versión 3.0 (Guindon y

Gascuel, 2009) con un modelo general de sustitución nucleotídica GTR (resultado de ModelTest). Los resultados fueron representados en forma de árbol enraizado.

### **5.9 Estimación de red de haplotipos:**

Se construyó una red de haplotipos mediante el método de puntos medios y con el programa Network 4.6.1.0 (Bandelt, Forster y Röhl, 1999).

### **5.10 Análisis de clados anidados:**

La red de haplotipos fue contrastada con la distribución geográfica de sus haplotipos con el método de “análisis de clados anidados” utilizando el conjunto de programas de ANeCA, que incluye entre otros a TCS y Geodis.

El primer paso del análisis consiste en la definición de los diferentes niveles de anidamiento, siguiendo las reglas de anidamiento descritas por Templeton & Sing (1996).

El análisis se basa primero en el cálculo de una matriz de distancias geográficas entre todos los pares de localidades posibles y luego se calculan dos distancias geográficas para cada haplotipo (rama terminal del filograma) o clado del filograma, siguiendo una secuencia de anidamiento (por niveles) desde las ramas terminales hasta la raíz del árbol. Las dos distancias geográficas calculadas son la distancia de clado (que representa la distribución geográfica media de un haplotipo o clado determinado) y la distancia de anidamiento (que representa la diferencia de la distancia de clado entre dos niveles consecutivos de anidamiento en el filograma o red de haplotipos). El programa pone a prueba el siguiente contraste de hipótesis:

Ho: los haplotipos de un nivel determinado de anidamiento tienen una distribución geográfica al azar.

Ha: los haplotipos de un nivel determinado de anidamiento no tienen una distribución al azar (y su distribución podría explicarse por procesos evolutivos específicos como fragmentación, colonización a gran distancia, etc.)

La prueba se realiza mediante procesos de permutación hipotética y al azar de la distribución de los haplotipos en las localidades de muestreo (datos esperados) y su posterior comparación con la distribución de los mismos haplotipos del clado (datos observados), mediante una prueba de chi-cuadrado, en nuestro caso con un alpha de 0.05. La prueba se repite tantas veces como clados y niveles de anidamiento existan en la red de haplotipos (generalmente muchas veces). Los resultados son analizados en conjunto y no solo individualmente, siguiendo la clave modificada de Templeton para indicar procesos evolutivos específicos. El procedimiento es largo y tedioso para hacerse a mano, pero el programa ANeCA lo realiza todo automáticamente y presenta los resultados finales en conjunto.

Los resultados de los análisis filogenéticos, de clados anidados serán conjugados en un análisis general donde se buscarán patrones evolutivos generales y la congruencia de los resultados con las distintas categorías filogeográficas descritas en Avise (2000).

## 6. RESULTADOS

### a) Diversidad genética:

En 144 muestras (secuencias) alineadas de ratones de 22 localidades se analizaron 435 sitios, de los que 179 fueron sitios invariables (monomórficos) y 70 sitios fueron variables (polimórficos, 79 mutaciones distintas). Los sitios informativos parsimoniosos fueron 49. El número promedio de diferencias nucleotídicas fue  $k$ : 13.10033, y la diversidad nucleotídica,  $\Pi$ : 0.05261. Theta (por secuencia) de Eta: 14.25079. La prueba D de Tajima fue: -0.25424, no significativa,  $P > 0.10$

En total se encontraron 44 haplotipos distintos (130 secuencias de 22 localidades) y la diversidad haplotípica total fue de 0.96303. El Cuadro 1 especifica que la diversidad haplotípica de cada una de las localidades.

Población	# Secuencias	# haplotipos	Diversidad haplotípica
Agalta	7	4	0.80952
Celaque	10	3	0.60000
Tzontehuitz	9	5	0.80556
Tapalapa	5	2	0.40000
Triunfo	3	2	0.66667
Minas	3	3	1.00000
SanMateolxtatan	5	2	0.40000
MinasCabana	7	4	0.80952
Chiquimula	2	1	0.00000
Yalambojoch	5	2	0.60000
Ixcansan	5	1	0.00000
Bobí	5	4	0.90000
Maxbal	7	1	0.00000
Nebaj	3	1	0.00000
AstilleroSnMarcos	11	1	0.00000
Pochuta	4	3	0.83333
Jurun	3	1	0.00000
Imposible	3	2	0.66667
Cacahuatique	11	4	0.60000
Escobal	7	2	0.47619
LajChimel	9	5	0.80556
Suchitan	6	1	0.00000
<b>TOTAL</b>	<b>130</b>	<b>44</b>	<b>0.96303</b>

**Cuadro 1.** Diversidad haplotípica del grupo *Peromyscus mexicanus* en 22 localidades del norte de Centroamérica.

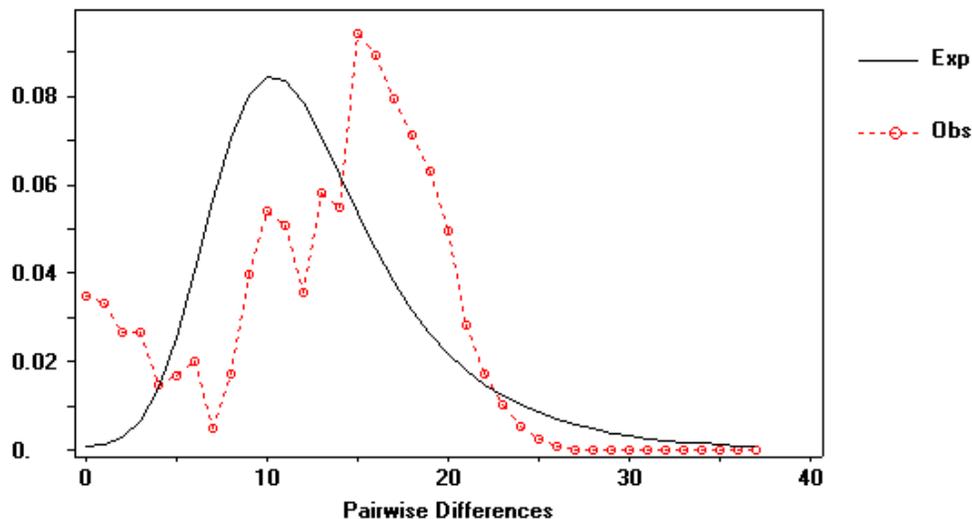
Un análisis molecular de varianza (AMOVA) basado en la diferenciación haplotípica  $F_{ST}$  de 25 poblaciones (localidades) fue significativo ( $p$  menor a 0.0000), es decir que rechazamos la hipótesis nula de no estructuración genética y asumimos que si existe estructuración genética dentro del grupo *Peromyscus mexicanus*, con alrededor de

93.60% de la diferenciación (FST) debida a variación intrapoblacional y aunque solo 6.40 % de la variación es entre poblaciones (ver Cuadro 2).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza componentes	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	24	15.358	0.03195 Va	6.40
Dentro de poblaciones	112	52.358	0.46748 Vb	93.60
Total	136	67.715	0.49943	
<b>Indice de Fijación FST: 0.06398</b>				
<b>P:0.00000 +/- 0.00000 (1023 permutaciones)</b>				

**Cuadro 2.** Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) por el método de distancias de diferencias pareadas y valores de FST.

La gran diferenciación entre poblaciones puede también ser observada en una grafica de diferencias pareadas (Figura 12), que mas que representar una gráfica unimodal, pareciera representar a un conjunto de gráficas o poblaciones independientes. La grafica tampoco se ajusta al modelo de a una población en expansión demográfica.



**Figura 12.** Diferencias pareadas de 144 secuencias (en rojo) contrastado con un modelo de expansión poblacional (en negro).

Las distancias genéticas (ajustadas con el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura de 2 parámetros) para 22 muestras (representando igual número de localidades) se representan en la matriz de distancias genéticas del Cuadro 3. En ese cuadro se han resaltado (en rojo) la gran cantidad de distancias con valores iguales o mayores al 5%,

una referencia muy general de diferenciación genética frecuente a nivel interespecífico en mamíferos.

Muestra	Población	Celaqu	Agalta	Tzontel	Tapalaj	Triunfo	Minas	Ixcansa	Astillero	Pochut	Imposib	Cacahu	Escoba	Nebaj	Suchita	Cartago	Veracruz	Chiapas
13258SPaq	Celaque																	
SP13322aq	Agalta	0.064																
E1819aaaq	Tzontehuitz	0.073	0.046															
E151aaaq	Tapalapa	0.059	0.050	0.020														
E1183aaaq	Triunfo	0.037	0.069	0.082	0.068													
LOU313aaq	Minas	0.073	0.068	0.087	0.073	0.059												
1517SGPaq	Ixcansan	0.073	0.059	0.046	0.033	0.082	0.077											
1734SGPaq	Astillero	0.037	0.069	0.082	0.068	0.000	0.059	0.082										
1754SGPaq	Pochuta	0.082	0.101	0.097	0.082	0.064	0.087	0.077	0.064									
1789SGPaq	Imposible	0.004	0.059	0.068	0.055	0.042	0.068	0.068	0.042	0.077								
1794SGPaq	Cacahuatiqu	0.008	0.064	0.073	0.050	0.046	0.073	0.063	0.046	0.073	0.004							
1645SGPaq	Escobal	0.012	0.050	0.059	0.046	0.042	0.059	0.059	0.042	0.077	0.008	0.012						
JANP4aaaq	Nebaj	0.037	0.060	0.082	0.068	0.025	0.050	0.073	0.025	0.064	0.033	0.037	0.033					
1909SGPaq	Suchitan	0.004	0.059	0.068	0.055	0.042	0.068	0.068	0.042	0.077	0.000	0.004	0.008	0.033				
Pnudipesq	Cartago	0.073	0.025	0.064	0.059	0.069	0.068	0.055	0.069	0.092	0.068	0.064	0.059	0.051	0.068			
1Pmexican	Veracruz	0.064	0.073	0.083	0.078	0.055	0.073	0.073	0.055	0.064	0.059	0.064	0.059	0.046	0.059	0.073		
2Pgymsnoti	Chiapas	0.082	0.101	0.087	0.082	0.064	0.087	0.077	0.064	0.008	0.077	0.073	0.077	0.064	0.077	0.092	0.055	

**Cuadro 3.** Matriz de distancias genéticas (según una fracción del ADN mitocondrial) para 22 localidades del norte de Centroamérica. Las distancias mayores del 5% son indicadas en color rojo.

### b) Filogenia molecular del grupo *Peromyscus mexicanus*

Se utilizó el modelo de Máxima Verosimilitud basado en un modelo específico de sustitución nucleotídica (GTR, obtenido del programa ModelTest). Se muestra a continuación el árbol obtenido con el máximo logaritmo de verosimilitud (-1160.4253). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística fueron obtenidos automáticamente como sigue: cuando el número de sitios comunes fue menor a 100 o menos de la cuarta parte del número total de sitios, entonces el método de máxima parsimonia fue utilizado; De otra forma se utilizó el método de “Neighbour Joining” con una matriz de distancias MCL. El árbol es representado a escala, con longitudes de las ramas en relación al número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 144 secuencias de nucleótidos de ADN. Todas las posiciones conteniendo lagunas o datos perdidos fueron eliminadas. El grupo de datos final contenía un total de 249 posiciones.



En el filograma anterior se pueden observar los siguientes puntos:

- a) Las seis especies de montaña *Peromyscus mexicanus*, *P. guatemalensis*, *P. grandis*, *P. zarhynchus*, *P. nudipes* y *P. gymnotis* forman un conjunto (clado) monofilético bien definido y se confirma la propuesta de que son las únicas especies conocidas que deben conformar el grupo *mexicanus*. Las especies *P. yucatanicus* y *P. stirtoni* claramente se excluyen del grupo.
- b) Las relaciones filogenéticas de las seis especies del grupo pueden representarse como sigue: (*P. zarhynchus*, ((*P. mexicanus*, *P. gymnotis*), (*P. guatemalensis* (*P. grandis*, *P. nudipes*)))).
- c) *P. grandis* y *P. nudipes* forman un clado bien definido, aparentemente con una amplia distribución geográfica, desde Sierra de las Minas en Guatemala hasta la Sierra de Talamanca en Costa Rica y Panamá.
- d) El linaje de *P. mexicanus* no se distingue en ninguna de las muestras analizadas para Centroamérica, con la excepción de la especie *P. gymnotis*, sobre la bocacosta del Pacífico de Chiapas y Guatemala. Evidentemente, muchos ejemplares identificados en museos como *P. mexicanus* con criterios morfométricos, representan errores de identificación. Claramente, los criterios morfométricos no son suficientes para la identificación de las especies del grupo y se recomienda la utilización de otros criterios, como los moleculares.
- e) Parece haber una fuerte correspondencia entre filogenia y geografía, aunque la conformación de los clados no parece coincidir con las barreras biogeográficas inicialmente propuestas (Istmo de Tehuantepec, Depresión de Nicaragua, Río Motagua, Río Ixcán, Río Lempa). Los datos parecen contradecir la idea de la fuerte importancia de estas supuestas barreras en la determinación de las distribuciones geográficas del grupo de estudio. Parece ser que la distribución de este grupo fue originada por una confabulación más compleja entre geografía y cambios climáticos



El algoritmo de anidamiento identificó siete niveles de anidamiento y algunas pruebas no fueron concluyentes. La hipótesis nula de distribución haplotípica al azar no pudo ser rechazada para la gran mayoría de clados, incluyendo todo el primero y segundo niveles de anidamiento. A partir del tercer nivel de anidamiento se presentan algunos clados en donde la hipótesis nula si es rechazada y la clave de inferencia filogeográfica indica lo siguiente:

- a) Se formaron 759 clados (incluyendo el nivel 0 con 200 ramas terminales).
- b) Los tres primeros niveles de anidamiento (nivel 0, 1 y 2) dieron pruebas de chi-cuadrado no significativas para las distancias geográficas esperadas (distribución al azar) y observadas, por lo que no se puede eliminar la hipótesis nula de no asociaciones geográficas. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que se espera que los haplotipos periféricos formen parte de un pool de diversidad genética compartida por una misma población.
- c) En el tercer nivel de anidamiento el clado 3-6 sigue la cadena de inferencia 1-2-3-4, indicando **flujo genético restringido con aislamiento por distancia**. El clado 3-6 incluye a las muestras
- d) En el cuarto nivel de anidamiento el clado 4-3 indica flujo genético restringido con aislamiento por distancia. El clado 4-6 indica **fragmentación alopátrida**.
- e) El nivel 5 contiene 22 clados con una combinación de resultados muy diferentes.
- f) Para el clado 5.1 la clave de inferencia indica **expansión de rango continua**.
- g) El clado 5-2 indica **flujo/dispersión genética restringida con indicios de dispersión a gran distancia en áreas intermedias no ocupadas actualmente por la especie; o flujo genético pasado seguido por la extinción de poblaciones intermedias**.
- h) El clado 5-14 indica **fragmentación alopátrida**.
- i) En los niveles 6 y 7 de anidamiento los resultados son no concluyentes, excepto para el clado 6-1 que indica **flujo genético restringido con aislamiento por distancia**.

## 7. DISCUSIÓN

El análisis de las secuencias de ADN mitocondrial (400pb del gen citocromo b) nos da indicios de una gran diversidad y estructuración genética aparentemente asociada a la geografía, indicando la presencia probable de varios linajes alopátridos e independientes. El análisis molecular de varianza (AMOVA) muestra diferencias significativas en la diversidad haplotípica entre las 22 localidades analizadas, muchas de las cuales tienen distancias genéticas cercanas o mayores al 5%, indicando fuertemente la existencia de especies crípticas que no se reconocen por los métodos taxonómicos tradicionales.

La diversidad genética, medida en número y frecuencia haplotípica, es alta para el conjunto de datos, y muy variable dentro de cada población particular. La prueba de AMOVA (análisis molecular de varianza) muestra diferencias significativas en la diversidad haplotípica, con un

La filogenia de haplotipos obtenida a través del método de máxima verosimilitud (probabilístico) identifica varios grupos (aproximadamente ocho, dependiendo de donde se haga el corte) asociados a regiones geográficas específicas. Es decir, las 22 localidades analizadas parecieran estar agrupadas en 8 linajes diferenciados en el árbol de haplotipos. Algunos estos clados corresponden a nombres específicos ya reconocidos, otros clados parecen representar linajes independientes hasta ahora no reconocidos en ninguna categoría taxonómica.

En general los clados hermanos se les encuentra en su mayoría geográficamente cercanos, aunque abundan las excepciones. Este es el primer indicio de que cada uno de los potencialmente ocho linajes independientes poseen historias evolutivas distintas.

En general parece haber una fuerte correspondencia entre diversidad genética y la geografía local, pero el análisis de clados anidados no es concluyente para la mayoría de linajes, dando resultados no significativos para la mayoría de clados terminales, no rechazando la hipótesis nula de distribución al azar de los haplotipos de cada clado en particular, algo esperado si suponemos que los haplotipos cercanamente emparentados pertenecen a una misma población o especie y que se encuentran en general co-distribuidos en la misma zona de distribución de ese clado.

En algunos puntos del filograma la prueba es significativa, por lo que se rechaza la hipótesis nula de distribución al azar de los haplotipos y, siguiendo la clave filogeográfica, nos plantea como hipótesis alternas varias hipótesis histórico-evolutivas. En algunos casos el análisis da indicios de patrones de fragmentación alopátrida (*P. guatemalensis* al oriente de Guatemala, El Salvador y occidente de Honduras), flujo genético restringido con aislamiento por distancia y expansión de rango (*P. nudipes* en Honduras y Costa Rica), lo que indica toda una variedad de historias evolutivas en la región. La hipótesis más generalizada en este caso es, como esperábamos, la fragmentación alopátrida. Otros patrones reconocidos en el análisis son flujo genético restringido con aislamiento por distancia, expansión a gran distancia y expansión de rango continua (expansión poblacional).

Aunque el patrón general y dominante es la alopatría, existen montañas que son compartidas por más de una especie del grupo, como los Cuchumatanes, y que aparentemente están estratificadas y segregadas altitudinalmente. Esta distribución cercanamente parapátrida se da con linajes distintos que aparentemente se mantienen segregados, lo que consideramos es evidencia de unidades evolutivas independientes y distintivas, apoyando la validez de las especies actualmente reconocidas.

El aislamiento por distancia explica solo parcialmente la variación genética de estos ratones, ya que, como se observa en la red de haplotipos, no hay un ordenamiento geográfico total de la posición de los haplotipos y sus distribuciones. En Chiapas, por ejemplo, podemos encontrar representantes haplotípicos de ramas totalmente opuestas (*P. zarhynchus* y *P. mexicanus*). Nuevamente, los datos parecen indicarnos que el grupo *P. mexicanus* es en realidad un conjunto o mosaico de linajes con historias evolutivas variadas.

En relación a las mayores barreras biogeográficas reconocidas para Centroamérica, como el Istmo de Tehuantepec, el Valle del Motagua, y la Depresión de Nicaragua, parece ser que la distribución de los clados no coincide con la presencia de esas barreras, ya que se encuentran los mismos linajes a ambos lados de cada barrera, como en el caso del Istmo de Tehuantepec, con *P. mexicanus* a ambos lados, la Depresión de Nicaragua con el linaje de *P. nudipes* en Honduras y en Costa Rica, o en el caso del Río Lempa con aparente poca diversidad genética del linaje de *P. guatemalensis* a ambos lado de la supuesta barrera. Una excepción importante parece se el Valle del Motagua, que tiene a su alrededor, bien segregados, a varios linajes muy bien diferenciados de *P. guatemalensis* y *P. mexicanus*. La importancia del complejo de fallas Polochic-Motagua como barrera biogeográfica para el grupo *P. mexicanus* merece estudios mas particulares.

Las implicaciones de estos resultados para la conservación del patrimonio natural centroamericano son varias. En primer lugar, se hace evidente que hay una fuerte tendencia al patrón de alopatría en la historia evolutiva y distribución de todo el grupo, lo que hace que prácticamente no existan dos localidades iguales. El sistema de áreas protegidas centroamericano ya incluye la protección de todos los linajes, aunque puede que hayan fuertes diferencias en la cantidad de esfuerzos que se ha invertido en cada uno de ellos, y puede ser que incluso el sistema de áreas protegidas se quede corto al no incluir la protección de todos los linajes. Creemos que esto se hará más evidente conforme se incrementen los esfuerzos de colecta en áreas no protegidas. Está fuera de los alcances de este estudio el hacer un análisis de complementariedad para la conservación de la diversidad genética del grupo *P. mexicanus*, pero recomendamos hacerlo junto con la información de otros taxa. Por el momento podemos identificar varias regiones de especial interés como la Sierra de los Cuchumatanes, que probablemente posea la mayor diversidad de linajes del grupo *P. mexicanus* en toda la zona de estudio, así como la zona que bordea al Valle del Motagua, desde Cerro San Gil y Cusuco en la cuenca baja, hasta Sierra de las Minas y Chiquimula en la cuenca alta. Todos ellos poseen linajes particulares de *Peromyscus* que merecen ser protegidos.

El estudio no tuvo mucha profundidad en los linajes del centro de México, pero parece evidente que esta región aún guarda muchas sorpresas en cuanto a la diversidad genética de este grupo de ratones.

Por el contrario, hay dos zonas con relativa poca variación genética. Primero, la zona del Triunfo en Chiapas, hasta San Marcos en Guatemala, y segundo, la zona del oriente de Guatemala hasta El Salvador y sur de Honduras. Ambas zonas contienen versiones o linajes distintivos de *P. guatemalensis*, pero que a lo interno de ellas son muy homogéneas entre distintas localidades. Probablemente el estudio no tuvo la resolución necesaria o indicada para observar la variación genética existente, debido a las limitaciones de utilizar solo un marcador molecular o a la carencia de muestras de tejido, sin embargo creemos que los datos ya existentes nos están dando una idea de poblaciones con una historia evolutiva mas reciente.

## 8. CONCLUSIONES

El grupo *Peromyscus mexicanus* está compuesto de seis especies conocidas de un linaje monofilético que habita los bosques húmedos de montaña del Núcleo de Centroamérica (Chiapas hasta Nicaragua). Tradicionalmente se incluyen en el grupo a especies de tierras bajas, como *P. yucatanicus* y *P. stirtoni*, pero la filogenia molecular del grupo basada en un fragmento de 400pb del gen citocromo b (mitocondrial) demuestra que estas últimas pertenecen a otros linajes de *Peromyscus*. El linaje que habita las montañas tiene en general un patrón de distribución y especiación alopátrida, aunque los análisis muestran una gran diversidad de historias evolutivas, incluyendo flujo genético restringido con aislamiento por distancia, fragmentación alopátrida reciente (este de Guatemala-Honduras-El Salvador), dispersión genética restringida con indicios de dispersión a gran distancia (Honduras-Costa Rica), y expansión de rango continua (Guatemala-Chiapas). En general, la diversidad genética del grupo es alta y existen diferencias significativas en las distancias haplotípicas entre 25 localidades analizadas. Los datos genéticos indican una alta estructuración genética asociada a la geografía local, confirmando la naturalidad de las especies actualmente reconocidas e indicando la posible presencia de especies aún no descritas. Las barreras biogeográficas propuestas como el Río Lempa, Río Ixcán, Istmo de Tehuantepec y Depresión de Nicaragua no coinciden con los límites de los clados de la filogenia general del grupo, siendo una importante excepción la importancia aparente del Valle del Motagua (principalmente en la cuenca alta) como barrera biogeográfica entre linajes (clados distintos) del grupo *P. mexicanus*. Se hace necesario continuar con estudios más específicos de los linajes particulares y hacer una revisión taxonómica de todo el grupo que incluya aspectos morfológicos.

El grupo incluye una combinación variada de historias evolutivas incluyendo flujo genético restringido con aislamiento por distancia, fragmentación alopátrida reciente (este de Guatemala-Honduras-El Salvador), dispersión genética restringida con indicios de dispersión a gran distancia (Honduras-Costa Rica), y expansión de rango continua (Guatemala-Chiapas).

Prácticamente todas las localidades analizadas poseen haplotipos únicos, aunque es en el corredor Cuchumatanes-Chamá-Minas-San Gil donde confluyen la mayoría de los linajes de este grupo de ratones y que forman el centro de la red de haplotipos de toda la región (Veracruz a Costa Rica) por lo que es una zona de particular interés para la conservación. Sin embargo, los análisis están basados en muestreos más intensos realizados en esta zona y la carencia de datos de otras regiones que en el futuro pueden mostrar ser aún más diversas, como el este de Honduras.

## 9. RECOMENDACIONES

Debido a la gran diversidad genética observada se recomienda hacer una revisión taxonómica del grupo *Peromyscus mexicanus*, que incluya tanto aspectos genéticos como morfológicos. En el plano genético es necesario incluir datos de uno o dos marcadores moleculares adicionales, principalmente nucleares, para confirmar la filogenia molecular de los linajes. También es necesario ampliar la cobertura geográfica, ya que se desconocen las características de los linajes de montaña al norte del Istmo de Tehuantepec (montañas de Oaxaca, Veracruz, Puebla, Hidalgo, Guerrero, etc., todos en México) y al sur de la Depresión de Nicaragua (Sierra de Talamanca en Costa Rica y Panamá). El análisis de clados anidados no tuvo la resolución esperada, incluso en Guatemala de donde provenían las mayoría de muestras, lo que indica que aún hace falta intensificar los esfuerzos de muestreo para fortalecer los análisis de relación genética y geografía.

En el plano administrativo se recomienda a la DIGI mejorar las facilidades relacionadas con la cooperación científica con entidades del extranjero.

## 10. REFERENCIAS

- 1) Avise, J. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, USA. 447pp.
- 2) Bandelt H-J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- 3) Bradley, R., N. Durish, D. Rogers, J. Miller, M. Engstrom y C. Kilpatrick. 2007. Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome-b sequences. *Journal of Mammalogy* 88(5):1146-1159.
- 4) Flores, O. e I. Goyenechea. 2001. A comparison of hypotheses of historical biogeography for Mexico and Central America, or in search of the lost pattern. Pp. 171-181, en: J. Johnson, R. Webb y O. Flores Villela (eds.), *Mesoamerican herpetology: systematics, zoogeography, and conservation*. The University of Texas at El Paso, El Paso, Texas.
- 5) Guindon, S. y O. Gascuel. 2009. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5):696-704.
- 6) Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- 7) Huckaby, D. 1980. Species limits in the *Peromyscus mexicanus* Group (Mammalia: Rodentia: Muroidea). *Contributions in Science of the Natural History, Museum of Los Angeles County* 326.
- 8) Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- 9) Lorenzo, C. y M. García. 2007. Sistemática y conservación de mamíferos de Chiapas. Pp. 47-57. En: G. Sánchez-Rojas y A. Rojas-Martínez (eds.). *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- 10) Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- 11) Posada, D. In press. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*.
- 12) Smith, S., R. Bradley, e I. Geenbaum. 1986. Karyotypic conservatism in the *Peromyscus mexicanus* species group. *Journal of Mammalogy* 67(3):584-586.
- 13) Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (En Prensa).
- 14) Templeton A.R. y C.F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134:659-669.
- 15) Schneider, S., D. Roessli & Laurent Excoffier. 2000. Arlequin ver 2000: a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland*. 111pp.
- 16) Panchal, M. 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, 23:509-510.

**ANEXOS**  
**Resultados del AMOVA**

AMOVA Label	Population name
1:	Agalta
2:	Celaque
3:	Tzontehuitz
4:	Tapalapa
5:	Triunfo
6:	BUCQ
7:	Guate
8:	Minas
9:	Chiquimula
10:	Yalambojoch
11:	Ixcansan
12:	Bobi
13:	Maxbal
14:	Nebaj
15:	Astillero
16:	Pochuta
17:	Jurun
18:	Imposible
19:	Cacahuatique
20:	Escobal
21:	Chimel
22:	Los Andes
23:	Suchitan
24:	Cartago
25:	Veracruz1

=====

== GENETIC STRUCTURE ANALYSIS

=====

Number of usable loci for distance computation : 435  
 Allowed level of missing data : 0.05

List of usable loci :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15														
16														
30														
31														
45														
46														
60														
61														
75														
76														
90														
91														
105														

106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
120													
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
135													
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
150													
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
165													
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179
180													
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
195													
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209
210													
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
225													
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239
240													
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254
255													
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269
270													
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
285													
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299
300													
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314
315													
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
330													
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344
345													
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359
360													
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374
375													
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389
390													
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404
405													
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419
420													
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434
435													

List of loci with too much missing data :

-----

NONE

---

---

AMOVA ANALYSIS

---

---

-----  
Genetic structure to test :  
-----

No. of Groups = 1

```
[[Structure]]  
  
    StructureName = "New Edited Structure"  
    NbGroups = 1  
#Group1  
    Group={  
    "Agalta"  
    "Celaque"  
    "Tzontehuitz"  
    "Tapalapa"  
    "Triunfo"  
    "BUCQ"  
    "Guate"  
    "Minas"  
    "Chiquimula"  
    "Yalambojoch"  
    "Ixcansan"  
    "Bobi"  
    "Maxbal"  
    "Nebaj"  
    "Astillero"  
    "Pochuta"  
    "Jurun"  
    "Imposible"  
    "Cacahuatique"  
    "Escobal"  
    "Chimel"  
    "Los Andes"  
    "Suchitan"  
    "Cartago"  
    "Veracruz1"  
    }
```

-----

Computing conventional F-Statistics from haplotype frequencies

-----  
 AMOVA design and results :  
 -----

*Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.*  
*Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.*  
*Weir, B. S., 1996.*

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	24	15.358	0.03195 Va	6.40
Within populations	112	52.358	0.46748 Vb	93.60
Total	136	67.715	0.49943	
Fixation Index	FST :	0.06398		

-----  
 Significance tests (1023 permutations)  
 -----

Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000  
 P(rand. value = obs. value) = 0.00000  
 P-value = 0.00000+-0.00000

=====  
 == Comparisons of pairs of population samples  
 =====  
 =====

List of labels for population samples used below:  
 -----

Label	Population name
1:	Agalta
2:	Celaque
3:	Tzontehuitz
4:	Tapalapa
5:	Triunfo
6:	BUCQ
7:	Guate
8:	Minas
9:	Chiquimula
10:	Yalambojoch
11:	Ixcansan
12:	Bobi
13:	Maxbal

- 14: Nebaj
- 15: Astillero
- 16: Pochuta
- 17: Jurun
- 18: Imposible
- 19: Cacahuatique
- 20: Escobal
- 21: Chimel
- 22: Los Andes
- 23: Suchitan
- 24: Cartago
- 25: Veracruz1

-----  
 Population pairwise FSTs  
 -----

Computing conventional F-Statistics from haplotype frequencies

	1	2	3	4	5	6	7
8							
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
	1	2	3	4	5	6	7
	0.00000	0.02893	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.00000	0.02792	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.03072	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.03482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.03482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.05455	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	0.00000	0.02893	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	9	10	11	12	13	14	15
0.00000	0.00000	0.03985	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.04654	0.06883	0.00000	0.04466	0.05000	0.05830	0.05830	0.10000
0.00000	0.00000	0.03072	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.08232	0.00000	0.05000	0.00000	0.08805	0.10056	0.10056	0.15556
0.00000	0.11523	0.13178	0.08805	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.02893	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.04654	0.00000	0.08232	0.00000	0.00000	0.00000
0.09871	0.00000	0.03482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.05830	0.00000	0.10056	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.09871	0.11899	0.09467	0.10550	0.12000	0.12000	0.18182
0.00000	0.13669	0.14807	0.10550	0.16910	0.09871	0.12000	0.00000
0.00000	0.00000	0.03227	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.05308	0.00000	0.09285	0.00000	0.00000	0.11111
0.12500	0.14754	0.00000	0.11888	0.13669	0.16667	0.16667	0.33333
0.12500	0.20755	0.19448	0.13669	0.21454	0.12500	0.16667	0.22981
0.14754	0.00000	0.03482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.05830	0.00000	0.10056	0.00000	0.00000	0.12000
0.00000	0.16667	0.00000					

	19	0.06799	0.09091	0.06537	0.07251	0.08247	0.08247	0.12727
0.06799	0.09427	0.11572	0.07251	0.14119	0.06799	0.08247	0.15493	
0.07632	0.19512	0.08247	0.00000					
	20	0.00000	0.02893	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.04654	0.00000	0.08232	0.00000	0.00000	0.09871	
0.00000	0.12500	0.00000	0.06799	0.00000				
	21	0.00000	0.02792	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.04466	0.00000	0.07898	0.00000	0.00000	0.09467	
0.00000	0.11888	0.00000	0.06537	0.00000	0.00000			
	22	0.00000	0.03985	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000	0.00000	0.06883	0.00000	0.11523	0.00000	0.00000	0.13669	
0.00000	-0.20000	0.00000	0.09427	0.00000	0.00000	0.00000		
	23	0.09677	0.11921	0.09244	0.10448	0.12195	0.12195	0.20000
0.09677	-0.15385	0.15242	0.10448	0.17536	0.09677	0.12195	0.18961	
0.11111	0.25000	0.12195	0.15924	0.09677	0.09244	0.14286	0.00000	
	24	0.00000	0.05455	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	1.00000
0.00000	0.00000	0.10000	0.00000	0.15556	0.00000	0.00000	0.18182	
0.00000	0.33333	0.00000	0.12727	0.00000	0.00000	0.00000	0.20000	
0.00000								
	25	0.00000	0.05455	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	1.00000
0.00000	0.00000	0.10000	0.00000	0.15556	0.00000	0.00000	0.18182	
0.00000	0.33333	0.00000	0.12727	0.00000	0.00000	0.00000	0.20000	
1.00000	0.00000							

-----  
FST P values  
-----

Number of permutations : 110

	1	2	3	4	
5	6	7	8	9	
10	11	12	13	14	
15	16	17	18	19	
20	21	22	23	24	
25					
	1	*			
	2	0.17117+-0.0417	*		
	3	0.99099+-0.0030	0.20721+-0.0305	*	
	4	0.99099+-0.0030	0.26126+-0.0344	0.99099+-0.0030	*
	5	0.99099+-0.0030	0.62162+-0.0459	0.99099+-0.0030	0.99099+-
0.0030	*				
	6	0.99099+-0.0030	0.59459+-0.0364	0.99099+-0.0030	0.99099+-
0.0030	0.99099+-0.0030	*			
	7	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-
0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	*		
	8	0.99099+-0.0030	0.19820+-0.0379	0.99099+-0.0030	0.99099+-
0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	*	
	9	0.99099+-0.0030	0.75676+-0.0474	0.99099+-0.0030	0.99099+-
0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	0.99099+-0.0030	
*					
	10	0.14414+-0.0201	0.09009+-0.0192	0.09009+-0.0383	0.45045+-
0.0303	0.45045+-0.0525	0.41441+-0.0546	0.75676+-0.0454	0.08108+-0.0212	
0.48649+-0.0639	*				

11 0.99099+-0.0030 0.36937+-0.0613 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.45045+-0.0470 \*  
 12 0.06306+-0.0194 0.00901+-0.0091 0.06306+-0.0194 0.09910+-  
 0.0163 0.07207+-0.0264 0.16216+-0.0264 0.39640+-0.0511 0.07207+-0.0227  
 0.35135+-0.0515 0.00000+-0.0000 0.09910+-0.0344 \*  
 13 0.99099+-0.0030 0.20721+-0.0408 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.11712+-0.0360 0.99099+-0.0030 0.06306+-0.0194 \*  
 14 0.99099+-0.0030 0.61261+-0.0402 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.99099+-0.0030 0.39640+-0.0594 0.99099+-0.0030 0.18919+-0.0417 0.99099+-  
 0.0030 \*  
 15 0.05405+-0.0242 0.00000+-0.0000 0.00901+-0.0091 0.08108+-  
 0.0252 0.09910+-0.0212 0.12613+-0.0242 0.25225+-0.0297 0.02703+-0.0139  
 0.10811+-0.0326 0.00901+-0.0091 0.08108+-0.0316 0.00000+-0.0000 0.04505+-  
 0.0279 0.13514+-0.0434 \*  
 16 0.99099+-0.0030 0.27928+-0.0316 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.40541+-0.0412 0.99099+-0.0030 0.09910+-0.0212 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.09910+-0.0212 \*  
 17 0.05405+-0.0148 0.04505+-0.0152 0.02703+-0.0139 0.09009+-  
 0.0271 0.37838+-0.0379 0.36036+-0.0407 0.51351+-0.0360 0.09009+-0.0407  
 0.38739+-0.0636 0.15315+-0.0305 0.11712+-0.0237 0.04505+-0.0152 0.05405+-  
 0.0242 0.32432+-0.0243 0.06306+-0.0194 0.09009+-0.0192 \*  
 18 0.99099+-0.0030 0.63964+-0.0439 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.99099+-0.0030 0.40541+-0.0434 0.99099+-0.0030 0.09910+-0.0370 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.13514+-0.0279 0.99099+-0.0030 0.35135+-0.0394  
 \*  
 19 0.04505+-0.0203 0.00000+-0.0000 0.04505+-0.0152 0.12613+-  
 0.0337 0.18018+-0.0303 0.21622+-0.0433 0.56757+-0.0508 0.03604+-0.0201  
 0.42342+-0.0543 0.02703+-0.0139 0.16216+-0.0379 0.00901+-0.0091 0.07207+-  
 0.0227 0.23423+-0.0243 0.00000+-0.0000 0.09910+-0.0344 0.06306+-0.0273  
 0.17117+-0.0316 \*  
 20 0.99099+-0.0030 0.29730+-0.0273 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.18018+-0.0507 0.99099+-0.0030 0.06306+-0.0273 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.03604+-0.0242 0.99099+-0.0030 0.05405+-0.0148  
 0.99099+-0.0030 0.06306+-0.0273 \*  
 21 0.99099+-0.0030 0.23423+-0.0338 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.10811+-0.0264 0.99099+-0.0030 0.00901+-0.0091 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.00000+-0.0000 0.99099+-0.0030 0.07207+-0.0264  
 0.99099+-0.0030 0.08108+-0.0163 0.99099+-0.0030 \*  
 22 0.99099+-0.0030 0.66667+-0.0511 0.99099+-0.0030 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.40541+-0.0493 0.99099+-0.0030 0.22523+-0.0493 0.99099+-  
 0.0030 0.99099+-0.0030 0.28829+-0.0402 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030  
 0.99099+-0.0030 0.24324+-0.0273 0.99099+-0.0030 0.99099+-0.0030 \*  
 23 0.07207+-0.0326 0.04505+-0.0279 0.05405+-0.0201 0.20721+-  
 0.0651 0.27027+-0.0303 0.23423+-0.0388 0.61261+-0.0485 0.05405+-0.0242  
 0.99099+-0.0030 0.03604+-0.0148 0.11712+-0.0273 0.00000+-0.0000 0.08108+-  
 0.0286 0.25225+-0.0424 0.00000+-0.0000 0.21622+-0.0411 0.07207+-0.0227  
 0.23423+-0.0473 0.00901+-0.0091 0.09910+-0.0286 0.04505+-0.0203 0.52252+-  
 0.0379 \*

```

      24  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030
0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030
0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030
      25  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030
0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030
0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-
0.0030  0.99099+-0.0030  0.99099+-0.0030

```

```

-----
Matrix of significant Fst P values
Significance Level=0.0500
-----

```

Number of permutations : 110

	1	2	3	4	5	6	7	
8	9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24	25
-	1	-	-	-	-	-	-	-
-	-	+	-	-	-	-	-	-
-	2	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+	-	-	+	-
+	-	+	-	-	-	+	-	-
-	3	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	+	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-
-	4	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	5	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	6	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	7	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	8	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-	-
-	+	-	-	-	-	-	-	-
-	9	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	10	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	-	-	+	-	-

-	11	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	12	-	+	-	-	-	-	-
+	-	+	-	+	-	+	+	-
+	-	+	-	+	-	+	-	-
-	13	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	14	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	15	-	+	+	-	-	-	-
+	-	+	-	+	+	-	-	-
-	-	+	+	+	-	+	-	-
-	16	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	17	-	+	+	-	-	-	-
-	-	-	-	+	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	18	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	19	+	+	+	-	-	-	-
+	-	+	-	+	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	+	-	-
-	20	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	21	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	+	-	-
-	22	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	23	-	+	-	-	-	-	-
-	-	+	-	+	-	-	+	-
-	-	+	-	+	-	-	-	-
-	24	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	25	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-