

Informe
Proyecto SIP 2012-1104
Celia López González
CIIDIR Unidad Durango

**"Mamíferos de Chihuahua y Durango II: Diversidad del Género *Peromyscus*
(Rodentia)"**

Resumen.—El presente proyecto es parte de un esfuerzo a largo plazo para documentar y analizar la diversidad de mamíferos de la Sierra Madre Occidental. En particular, en esta fase se aborda el estudio de las especies del género *Peromyscus* que habitan la SMO. El examen de ejemplares de *Peromyscus* colectados para el proyecto “Mamíferos de la Cuenca del Río Mezquital-San Pedro” (CONABIO GT015, SIP 2010, 2011) indicó la presencia de al menos una nueva especie más, probablemente afin al grupo *boylei* o *aztecus*. Los objetivos de este trabajo fueron 1) establecer el número de especies del complejo *P. boylei* en el centro de la SMO y 2) dar elementos nuevos para establecer las relaciones filogenéticas entre éstas. Dada la disponibilidad de material, los objetivos se extendieron a toda la SMO. Usando datos morfológicos, morfométricos y moleculares (CytB) se determinó que en la SMO se distribuye *P. boylei rowleyi*, *P. schmidlyi*, *P. simulus* y una especie no descrita que se distribuye en la franja de encinares de la vertiente occidental de la Sierra. Se presenta una hipótesis filogeográfica sobre el origen y distribución del grupo *Peromyscus boylei* que abarca la SMO y el resto de la distribución de las especies en México.

Palabras Clave.--- sistemática, filogeografía, *Peromyscus*, Rodentia, Sierra Madre Occidental.

Introducción

Comparados con otras entidades de la República Mexicana, Durango y Chihuahua son de los estados menos estudiados en lo que se refiere los mamíferos. Esto se debe en parte a su gran extensión territorial (1200 x 250 km de ancho en promedio), a su complejidad topográfica, y hasta hace poco tiempo, a su lejanía de los mayores centros de investigación en México. En particular para el género *Peromyscus* y la Sierra Madre Occidental (SMO) el inventario está lejos de terminarse y recientemente se ha descrito al menos una nueva especie (Bradley et al. 2004) para la región. El examen de ejemplares de *Peromyscus* colectados para el proyecto “Mamíferos de la Cuenca del Río Mezquital-San Pedro” (CONABIO GT015, SIP 2010, 2011) sugiere la presencia de al menos una nueva especie más, probablemente afin al grupo *boylei* o *aztecus*. Los roedores capturados para dicho proyecto se procesaron siguiendo las técnicas convencionales en mastozoología, por lo que se dispone de material craneal y pieles de comparación; adicionalmente se tomaron muestras de tejido, lo cual permite el análisis molecular. Estos mismos proyectos han permitido además la revisión de ejemplares de colecciones nacionales y extranjeras, lo que permite evaluar la variación geográfica. Así, se propone examinar estos elementos para 1) establecer el número de especies del complejo *P. boylei* en el centro de la SMO y 2) dar elementos nuevos para establecer las relaciones filogenéticas entre éstas.

Metodología

En principio se propuso examinar la variación solamente de la porción sur de la SMO, entre los 23° y 24.5° de latitud norte y 103.5° y 105.5° de longitud oeste, que es de donde se dispone de un número mayor de muestras y ejemplares. Sin embargo, durante el desarrollo del trabajo pudimos integrar más información y aumentar la escala del trabajo para abarcar toda la Sierra y reorientar el trabajo para obtener resultados más informativos. Así, se llevó a cabo 1) un estudio morfológico y morfométrico de la variación de las especies del grupo *boylei* en la SMO, 2) el análisis molecular de las muestras de tejido colectadas dentro de los límites originalmente propuestos y algunas otras fuera de estos (ver abajo) y 3) la recuperación de información generada por otros autores y depositada en Genbank.

Trabajo morfológico: Se examinaron y midieron 705 ejemplares de colección de toda la Sierra, con el fin de caracterizar las especies del grupo *boylei* y documentar su variación geográfica. *Peromyscus schmidlyi* fue descrito con base en caracteres moleculares, y por tanto no existía una caracterización morfológica. Dicha caracterización fue uno de los objetivos de nuestro trabajo. Nos enfocamos a *P. schmidlyi*, *P. boylei*, y *P. spicilegus*. Este último no es del grupo *boylei*, pero es morfológicamente muy similar, por lo que cualquier caracterización de los primeros necesariamente requiere la revisión del último. No se incluyó *P. simulus* por razones que se explican más adelante. Se tomaron 14 medidas craneales y cuando fue posible se registraron las cuatro medidas externas tradicionales. Asimismo, se compararon caracteres del pelaje, proporciones corporales y otros atributos externos para caracterizar las especies. Las medidas fueron sometidas a un análisis de funciones discriminantes para determinar los caracteres más informativos y luego a análisis de varianza para probar hipótesis sobre diferencias entre especies, sexos, edades relativas y área geográfica.

Trabajo de laboratorio: Se analizaron porciones de dos genes mitocondriales, el citocromo B (1051 pares de bases) y la región control (d-Loop, 750 pares). El citocromo B se secuenció en 48 muestras de *Peromyscus* de la SMO incluyendo *P. schmidlyi* (33), *P. boylei* (7), y *P. simulus* (3), además de una de *P. spicilegus* (2), *P. eremicus* (1) y *P. gratus* (2), que fueron usados como grupos externos (Tabla 1). Para la región control se secuenciaron 44 (se excluyeron 2 de *P. schmidlyi*, 1 de *P. gratus* y 1 de *P. eremicus*) Por otra parte, se recuperaron del Genbank secuencias de todo o partes del Gene del citocromo B mitocondrial para 53 individuos más (Tabla 1).

Se extrajo ADN de aproximadamente 10 mg de músculo o corazón preservado en etano, usando el kit Promega y los métodos descritos en Correa et al. (2010). Para la amplificación del fragmento de Cyt b se usaron los primers L-14115: 5'-GAT ATG AAA AAC CAT CGT TG-3' (Palumbi 1996), H-15288: 5'-ACA AGA CCA GAG TAA TGT TTA TAC TAT C-3' or MVZ16: 5'-AAA TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT RAT-3' (Smith and Patton 1999; Martin et al. 2000), o CBPrmF (5'-CCC ATC CAA CAT CTC ATC-3') como primers forward, y CBPrmR (5'-GTA GCT GAT GGA GGC TAG TT-3') como primer reverse. El par de primers para el fragmento del D-loop fue diseñado por Miguel Correa, colaborador del proyecto (forward PrmsRCF: 5'-TTA GGG CAT CAA GAA GGA AG-3' a y reverse PrmsR D-loop 1 5'-TTG CTT TTG GGG TTT GTC AA-3'). El material genético fue amplificado usando un termociclador Labnet 9600 thermal cycler usando 30 to 50 ng de DNA, 0.40 µM de cada primer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Promega), 1x PCR buffer y 1 U de Taq polimerasa (Promega) en un volumen de 50 µl. La reacción PCR se corrió por 45 ciclos: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 60

Análisis de la información genética: Las secuencias fueron editadas y alineadas usando Sequencher v.4.1 (GeneCodes Inc., Ann Arbor, Michigan, USA). Las secuencias resultantes fueron traducidas a proteína para confirmar su identificación (Wernersson y Pedersen 2003). La alineación múltiple se llevó a cabo con Clustal X (Thompson et al. 1997). Se calcularon distancias genéticas usando Kimura 2-Parameter model (Kimura 1980) en Paup* 4.0b10 (Swofford et al. 2001) con el fin de determinar niveles de divergencia entre poblaciones de *Peromyscus* (Bradley y Baker 2001). Para cada gene por separado se utilizó Arlequin versión 3.5.1.21 para estimar medidas de variación genética intraespecífica. Se utilizó Arlequin para calcular el “Harpending’s raggedness index” (Harpending 1994) y evaluar el ajuste de los datos a un modelo de expansión súbita. Para probar desviaciones de neutralidad se usaron Tajima’s D (Tajima 1989) y Fu’s F_S (Fu 1997) calculadas en Arlequin. La significancia estadística se evaluó con un bootstrap de 1000 simulaciones coalescentes neutrales. Se midió asimismo la correlación entre distancia genética y geográfica usando la prueba de Mantel parcial usando el software AIS ver. 1.0 (Miller 2005). Los patrones de flujo génico, migración a largo plazo, se evaluaron con la F de Wright (Wright 1978; Nei 1987).

Análisis filogenético: Se construyeron redes (Median-Joining network) para visualizar patrones filogeográficos y relaciones ancestro-descendiente usando NETWORK v. 4.1.0.3 (Bandelt et al. 1999). La confiabilidad de las inferencias filogenéticas se probaron usando la prueba de saturación (Hulsey et al. 2004). Distancias pareadas fueron calculadas en PAUP * 4.10b (Swofford et al. 2001) con base en el modelo de mejor ajuste. Los parámetros del modelo se estimaron usando Modeltest (Posada and Crandall 1998). Para cada conjunto de datos se usó Arlequin versión 3.5.1.21 para calcular el “raggedness index” (Harpending 1994) que permite evaluar el ajuste de los datos a un modelo de expansión súbita. Para probar desviaciones con respecto a neutralidad, se usaron las estadísticas Tajima’s D (Tajima 1989) y Fu’s F_S (Fu 1997). Se estableció la significancia estadística usando bootstrap, con 1000 simulaciones coalescentes neutrales.

Trabajo de Campo

Mucho del material necesario para el desarrollo de este proyecto se recolectó en otros previos, por lo que este periodo se realizaron colectas aisladas y complementarias para obtener muestras de referencia y material para nuestro análisis molecular. Se llevaron a cabo los siguientes muestreos:

Mineral de Avino, Durango 2-4 marzo de 2012 (24°32.04’N, 104°16.821’W, 2320 m). Esta es un área minera muy perturbada que sin embargo representa la transición de la región de pastizales al matorral xerófilo en Durango. Se colectaron roedores durante 2 noches. Participaron Laura Ticó Valadez (CIIDIR Durango), Miguel Correa-Hernández

(CIIDIR Durango), Xóchitl Cisneros González (alumna de prácticas profesionales), Diego F. García Mendoza (CIIDIR Durango) y la que suscribe. Se colectaron 89 *Peromyscus* y 3 *Chaetodipus*, para un total de **92** ejemplares. Se tomaron muestras de tejido de todos los ejemplares.

San Blas, Nayarit 31 de julio al 4 de agosto de 2012 (21°32.430'N, 105°17.17'W, 10 m). Se colectaron ejemplares en las inmediaciones de San Blas y en el pueblo de San Francisco (20°53.80'N, 105°24.59'W, 10 m) en el Municipio de Valle de Banderas, Nayarit. El objetivo del trabajo fue colectar ejemplares de *Peromyscus spicilegus* y *P. simulus*, cuya localidad tipo es San Blas. Colaboraron Laura Tico Valadez (CIIDIR Durango), Aarón Hernán Cortés Ríos (Universidad de Guadalajara), Alí Ituriel Villanueva Hernández (CIIDIR Durango), Nancy Lemus Medina (CIIDIR Durango), Diego F. García Mendoza (CIIDIR Durango) y la que suscribe. Se colectaron **117** ejemplares de 3 órdenes y 5 familias (Anexo 1). Con casi 400 trampas no colectamos un solo *P. simulus*. El área está muy perturbada y aunque las trampas se colocaron en todos los posibles hábitats para la especie, ésta no se encontró. Esto sugiere que la perturbación probablemente ha disminuido o eliminado sus poblaciones. En conversación personal con el Dr. David Schmidly, experto en este grupo, él sugiere que la perturbación ha eliminado a *P. simulus* y probablemente a *P. spicilegus*, y estos han sido sustituidos por roedores del género *Liomys*. Nuestras colectas apoyan estas conclusiones. Se tomaron muestras de tejido de todos los ejemplares y de sangre para estudios virológicos en la mayoría de los ejemplares de roedores.

Zacatlán, Puebla, 26 al 29 de octubre de 2012 (19°56.89'N, 97°59.53'W, 2351 m). En esta área se trabajó para colectar ejemplares de comparación de *Peromyscus beatae* y *P. levipes*. Se colectó un total de **48** ejemplares de roedores. El material se encuentra en procesamiento, pero al parecer tuvimos éxito en colectar al menos *P. beatae*. Colaboraron en la colecta: Diego F. García Mendoza, Rubí Castro Vázquez, Nancy Denise Lemus Medina, Miguel M. Correa Ramírez, Alí Ituriel Villanueva Hernández y la que suscribe. Se tomaron muestras de tejido de todos los ejemplares, y de sangre para estudios virológicos en la mayoría todos los ejemplares.

Todo el material fue procesado y depositado en la Colección de Mamíferos del CIIDIR Unidad Durango.

Resultados

Objetivo 1) ¿Cuántas especies del grupo *Peromyscus boylii* existen en la SMO? Con base en los resultados moleculares, se detectó que existen al menos 4, *P. boylii rowleyi*, *P. schmidlyi*, *P. simulus* y un taxón no descrito que probablemente habita la franja de encinares de la vertiente occidental de la Sierra Madre Occidental, los ejemplares de este taxón fueron originalmente identificados como *P. simulus* pero molecularmente no corresponden a otros ejemplares identificados como tales (Figura 1). La descripción de este nuevo taxón depende de la previa verificación de la identidad del ejemplar tipo (de San Blas, Nayarit), con el fin de evitar sinonimias en la nomenclatura, y es materia de nuestro siguiente proyecto, por lo que se omitió del análisis morfológico, el cual se enfocó a la caracterización y descripción de la variación geográfica de las otras especies.

Los resultados de este análisis constituyen el manuscrito titulado “**Morphologic characterization of *Peromyscus schmidlyi* (Rodentia: Muridae), an endemic of the Sierra Madre Occidental, Mexico**” por Celia López-González, Diego F. García-Mendoza,

y Miguel M. Correa-Ramírez, cuyo resumen se incluye al final de este documento y que fue enviado para publicación al Journal of Mammalogy (13-MAMM-A-004).

Objetivo 2) ¿Cuáles son las relaciones entre estas especies y sus parientes más cercanos? Los resultados generales de este análisis se muestran en la Figura 1. Se presenta el árbol de relaciones filogenéticas con base en inferencia Bayesiana, con 20×10^6 generaciones. Con este árbol es posible elaborar una hipótesis filogeográfica que da cuenta de la diversificación de este grupo no solo en la SMO, sino en todo México. Con estos resultados se escribió el primer borrador del manuscrito **“Phylogeography of the *Peromyscus boylii* species Group in Mexico”** por M. M. Correa-Ramírez, C. López-González y D. F. García Mendoza, el cual se espera terminar a mediados de marzo de 2013 y enviar a publicación a la revista Molecular Phylogenetics and Evolution.

Los resultados preliminares de este análisis se presentaron en el XI congreso Nacional de Mastozoología llevado a cabo en Xalapa, Veracruz, en octubre de 2012.

Como principales conclusiones, este análisis sugiere que la distribución del grupo *boylii* en México es resultado de una invasión relativamente reciente (Plioceno) proveniente del norte (posiblemente de los que hoy es Arizona o Utah), que resultó en la ocupación de lo que hoy es la Mesa del Norte, Mesa Central y Planicie Costera del Pacífico. El paulatino calentamiento hacia el final del Pleistoceno, permitió a las poblaciones de *Peromyscus boylii* dispersarse hacia tierras más altas, diversificándose en el Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre Oriental y Occidental. Por otro lado, el mismo calentamiento aparentemente resultó en la desaparición de las poblaciones de la planicie costera, quedando sólo algunas poblaciones relictas en las Islas del Golfo de California, Islas Mariás y los encinares de la vertiente occidental de la Sierra Madre Occidental.

Otros resultados:

El análisis morfológico de muestras de *P. pectoralis* de la región de estudio sugiere asimismo la presencia de más de un taxa de lo que actualmente se conoce y denomina *P. pectoralis*. Esto fue notado de manera independiente con otras muestras y ejemplares por el grupo de trabajo del Dr. Robert Bradley de Texas Tech University. Durante nuestra visita a dicha institución se acordó aunar esfuerzos y trabajar el problema conjuntamente. Hasta el momento se procesaron 27 individuos (extracción de ADN y PCR) de *P. pectoralis* que fueron enviados a TTU para su secuenciación. Los resultados serán analizados y publicados en conjunto.

Por último, el examen morfológico de muestras de *P. melanophrys* de la región sur de La Sierra Madre Occidental depositados en nuestra colección y en la de la ENCB, sugieren la existencia de más de un taxa dentro de ésta especie, es nuestro objetivo abordar también este problema, siendo necesaria la revisión de ejemplares tipo (depositados en el USNM, Smithsonian Institution), desarrollar la caracterización morfológica y morfométrica de las posibles especies, así como obtener material para la extracción de ADN y caracterización genética de éstas. Este trabajo se llevará a cabo durante 2013 en colaboración con el M. en C. Juan Carlos López-Vidal, curador de la colección de mamíferos de la ENCB.

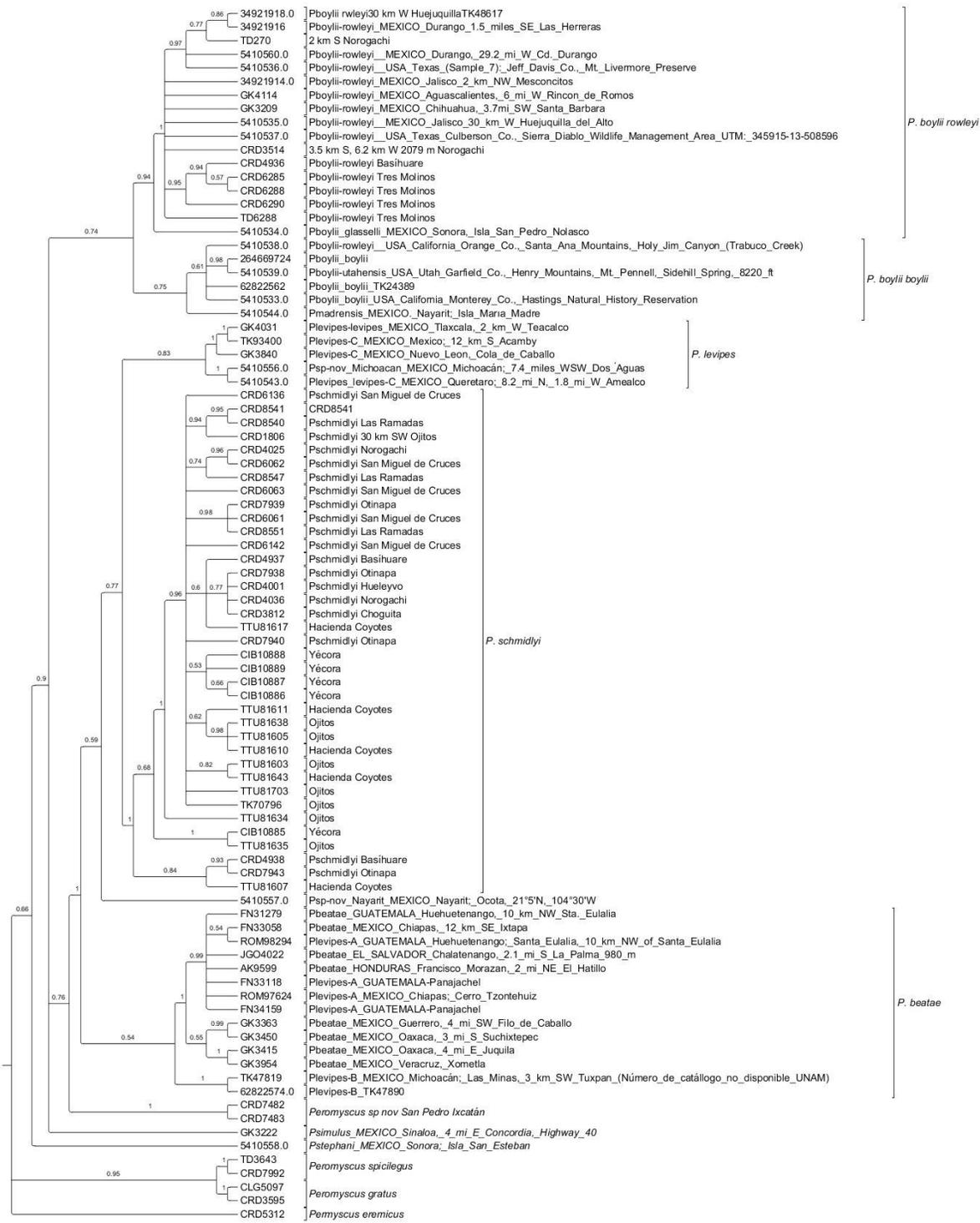


Figura 1: Arbol Bayesiano que muestra las relaciones de las especies del Grupo *Peromyscus boylii* con base en el Citocromo B, y a partir del cual se construye la hipótesis filogeografica presentada

Bibliografía

- BANDELT H.J, FORSTER P, RÖHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.
- BRADLEY, R.D., AND R. J. BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82: 960–973.
- BRADLEY, R.D., D. S. CARROLL, M. L. HAYNE, R. MUÑIZ-MARTÍNEZ, M. J. HAMILTON, AND C. W. KILPATRICK. 2004. A new species of *Peromyscus* from western Mexico. *Journal of Mammalogy* 85:1184–1193.
- CORREA-RAMIREZ, M. M., M. L. JIMENEZ, AND F. J. GARCIA-DE LEON. 2010. Testing species boundaries in *Pardosa sierra* (Araneae: Lycosidae) using female morphology and COI mtDNA. *The Journal of Arachnology* 38: 538–554.
- FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- HULSEY, C. D., F. J. GARCÍA DE LEÓN, Y. S. JOHNSON, D. A. HENDRICKSON, AND T. J. NEAR. 2004. Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 754–764.
- MARTIN, Y., G. GERLACH, C. SCHLOTTERER, AND A. MEYER. 2000. Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete Cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 37–47.
- MILLER, M. P. 2005. Alleles in space (AIS) A computer program for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722–723.
- PALUMBI, S. R. 1996. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, DM., Moritz, G., Mable, BK. Eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates 205–247.
- SMITH, M. F., AND J. L. PATTON. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from Cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution* 6: 89–128.
- SWOFFORD, D. L. et al. 2001. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population-size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597–601.
- WERNERSSON, R., AND A. G. PEDERSEN. 2003. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences *Nucleic Acids Research* 31: 3537–3539.
- WRIGHT, S. 1978. Variability Within and Among Natural Populations. *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4. Univ. of Chicago Press, Chicago.

Anexo 1: Primera página y Resumen de trabajo enviado a publicación (Journal of Mammalogy)

Send proofs to:
Celia López-González
CIIDIR Unidad Durango
Instituto Politécnico Nacional
Calle Sigma 119
Fraccionamiento 20 de Noviembre II
Durango, Durango 34220
México
Ph: 52 618 814 2091
Fax: 52 618 814 4540
celialg@prodigy.net.mx

Running head: Morphology, distribution of *P. schmidlyi*

Morphologic characterization of *Peromyscus schmidlyi* (Rodentia: Muridae), an endemic of the Sierra Madre Occidental, Mexico

Celia López-González*, Diego F. García-Mendoza, and Miguel M. Correa-Ramírez

Centro de Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, Sigma 119 Fraccionamiento 20 de Noviembre II Durango, Durango 34220, México

Based on examination of 705 museum specimens, including the holotype and individuals identified using molecular attributes, we characterized Schmidly's deermouse *P. schmidlyi* using a set of morphometric and morphological characteristics. Discriminant function analysis was performed on 14 cranial attributes to find those most useful to separate species. Factorial ANOVA and MANOVA were used to test for significant differences due to species, sex, age, and geographic location. We compared and contrasted *P. schmidlyi*

with *P. boylii rowleyi* and *P. spicilegus*, morphologically similar and partially sympatric species, and reevaluated the distribution of the 3 species in the Sierra Madre Occidental. *P. schmidlyi* is a medium-sized *Peromyscus* distinguishable by a set of characters, including overall size intermediate between *P. spicilegus* and *P. boylii rowleyii*, relatively wider braincase and zygoma, hour-glass shaped interorbital constriction, large auditory bullae, and strongly bicolored, tufted tail. Morphometric characterization is possible only when age and geographic location are taken into consideration. Several specimens previously identified as *P. boylii rowleyi* were re-identified as *P. schmidlyi*. Records available showed that *P. schmidlyi* is distributed in forested highlands of the SMO, from northern Chihuahua to northern Jalisco, between 1550 (on the western versant) and 3000 m of elevation. It is sympatric with *P. boylii rowleyi* between 2100 and 2400 m along the eastern versant of the SMO, and with *P. spicilegus* along a narrower band (1550- 2000 m on the steeper western slope). Distribution of these species closely reflects the most recent ecological regionalization of the SMO.