



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**VARIACIÓN GEOGRÁFICA DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA
MUSARAÑA ENDÉMICA *MEGASOREX GIGAS* (MAMMALIA:
SORICOMORPHA) DEL OESTE DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

PRESENTA

ALEJANDRA BREÑA OCHOA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. FERNANDO A. CERVANTES

2011



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno:

Breña
Ochoa
Alejandra
55 15 13 65
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
405053663

2. Datos del tutor:

Dr.
Fernando Alfredo
Cervantes
Reza

3. Datos del sinodal 1:

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos del sinodal 2:

Dr.
Andrés
García
Aguayo

5. Datos del sinodal 3:

Dr.
Alejandro
Zaldívar
Riverón

6. Datos del sinodal 4:

Dra.
Jeny Solange
Sotuyo
Vázquez

7. Datos del trabajo escrito:

Variación geográfica del ADN mitocondrial de la musaraña endémica *Megasorex gigas*
(Mammalia: Soricomorpha) del oeste de México
81 p.
2011

A mamá y papá,
Emma y Leonardo,
gracias por su amor,
su apoyo incondicional,
sus consejos y
sus buenos deseos
a lo largo de mi vida

A Rodrigo,
mi hermano,
compañero de aventuras,
gracias por tus consejos,
por expresar lo que piensas
en tu mente brillante
y lo que sientes
en tu corazón de oro,
por los momentos compartidos
ayer, hoy y mañana

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando A. Cervantes, por darme la oportunidad de trabajar con un mamífero poco conocido y endémico de México.

A la M. en C. Yolanda Hortelano Moncada y a la M. en C. Julieta Vargas Cuenca, por su apoyo tanto en el Laboratorio de Mastozoología como en la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM.

A todos los estudiantes en la CNMA. En particular, a la M. en C. Jérica Arcangeli Álvarez, por sus consejos sobre técnicas de laboratorio, al M. en C. Lázaro Guevara López, por su ayuda en los análisis filogenéticos, y a la bióloga Berenice Brito, por su participación en la salida de campo a Santa Rosa.

Al curador Dr. David J. Hafner y a la administradora Patricia Gegick de la Colección de Biociencia del Museo de Historia Natural y Ciencia de Nuevo México (NMMNH), por proporcionar los tejidos de *Notiosorex crawfordi* necesarios para este estudio.

Al M. en C. Jesús A. Fernández del Museo de Ciencias Naturales de la Universidad de Luisiana (LSU), por sus sugerencias para los análisis filogenéticos.

Al biólogo Fernando Ruiz y a su equipo de trabajo de la Universidad Autónoma de Guerrero, por donar al ejemplar FR1112 de *Megasorex gigas* de esta entidad federativa a la CNMA y por la oportunidad y el apoyo brindado en la salida de campo a Santa Rosa.

Al Dr. Juan Pablo Ramírez Silva y a sus estudiantes de la Universidad Autónoma de Nayarit, por la oportunidad y el apoyo brindado en la salida de campo a los alrededores de Tepic.

Al M. en C. Francisco Botello y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica del Instituto de Biología de la UNAM, por la oportunidad y el apoyo brindado en la salida de campo a Yetla.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM y al M. en C. Jorge A. Yáñez Ponce de León de la

Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por realizar la secuenciación de los dos genes mitocondriales analizados en este estudio.

Al jurado que revisó y evaluó esta tesis, integrado por el Dr. Víctor Manuel Valdés López, el Dr. Andrés García Aguayo, el Dr. Fernando A. Cervantes, el Dr. Alejandro Zaldívar Riverón y la Dra. Jeny Solange Sotuyo Vázquez, por sus comentarios y sugerencias que mejoraron este trabajo.

A todos ustedes, muchas gracias por su valiosa ayuda la cual fue clave para la culminación de esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
MÉTODOS	10
Revisión de Literatura y Colecciones Científicas	10
Colecta Científica	10
Muestras de Tejidos.....	12
Obtención de las Secuencias de Nucleótidos	12
Características de las Secuencias de Nucleótidos	14
Análisis Filogenético de las Secuencias de Nucleótidos.....	15
RESULTADOS	18
Literatura y Colecciones Científicas	18
Colecta Científica	22
Secuencias de Genes Mitocondriales	22
Frecuencias de Nucleótidos y Codones.....	23
Variaciones de Nucleótidos y Aminoácidos.....	28
Haplotipos Mitocondriales	32
Estructura Poblacional y Análisis Filogenético.....	33
Gen Citocromo <i>b</i>	34
Gen Citocromo <i>c</i> Oxidasa Subunidad I	41
Gen <i>Citb</i> y Gen COI Combinados	48
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	61
APÉNDICE I. <i>Megasorex gigas</i> en literatura y colecciones científicas.....	A
APÉNDICE II. Especies de musarañas en el grupo externo	F
APÉNDICE III. Volúmenes y concentraciones de reactivos para la PCR.....	H
APÉNDICE IV. Condiciones de reacción para la PCR.....	I

RESUMEN

Megasorex está integrado por una especie y es el único género de musaraña (Familia Soricidae) endémico de México. *Megasorex gigas* habita principalmente en el bosque tropical caducifolio hasta los 1,800 msnm en la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas. Las cadenas montañosas, como la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), determinan las condiciones de temperatura y precipitación en las que crece este bosque y lo aíslan geográficamente y ecológicamente de otros tipos de vegetación. La fragmentación del hábitat es un mecanismo clave que promueve la variación poblacional. En algunas especies de vertebrados que habitan en la región arriba mencionada, estudios con marcadores moleculares han encontrado linajes mitocondriales definidos geográficamente con amplia divergencia genética. Dos genes, el citocromo *b* (*Citb*; 1,140 pb) y parte del citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI; 720 pb), de *M. gigas* de poblaciones en dos Reservas de la Biosfera de Jalisco y Colima y en Guerrero se analizaron para conocer la variación y estructura genética de esta especie de musaraña. Estas poblaciones tienen amplia diversidad genética y están genéticamente estructuradas. Los análisis filogenéticos agrupan a *M. gigas* en un clado monofilético subdividido en tres filogrupos que corresponden a las poblaciones analizadas y representan linajes. La variación genética entre estos linajes (4.3–6.8% *Citb*; 3.1–5.6% COI) es similar a la de los correspondientes de otras especies de mamíferos pequeños que se encuentran definidos geográficamente por las características fisiográficas de la región. Por lo tanto, es probable que las características fisiográficas, como la FVTM o el río Balsas, promuevan la divergencia genética y determinen la distribución geográfica de los linajes mitocondriales de esta especie de musaraña.

Palabras clave: ADNmt, bosque tropical caducifolio, *Megasorex gigas*, México, variación geográfica

INTRODUCCIÓN

Las musarañas son pequeños mamíferos que en apariencia se asemejan a los ratones. Etimológicamente, su nombre deriva del latín *mus* que significa ‘ratón’ y *araneus*, ‘araña’ (Salazar, 1932). A diferencia de los ratones, las musarañas tienen hocicos largos y puntiagudos, sus ojos son pequeños, sus incisivos no crecen continuamente y sus patas delanteras tienen cinco dedos (Villa y Cervantes, 2003). Las musarañas pertenecen a la familia Soricidae dentro del orden Soricomorpha, por lo que no son roedores como los ratones (Hutterer, 2005). En México, a lo largo y ancho del país y en diversos hábitats se distribuyen varias especies de musarañas agrupadas en cuatro géneros: *Cryptotis*, *Megasorex*, *Notiosorex* y *Sorex*, los cuales están incluidos en las tribus Blarinini, Notiosoricini y Soricini, todas ellas pertenecientes a la subfamilia Soricinae (Carraway, 2007; Dubey *et al.*, 2007; Ohdachi *et al.*, 2006).

La tribu Notiosoricini es endémica a Norteamérica y está integrada por dos géneros, *Megasorex* y *Notiosorex* (Hutterer, 2005). *Megasorex gigas* fue clasificada originalmente dentro de *Notiosorex* con base en su fórmula dental (Merriam, 1897) constituida por tres dientes cónicos (unicúspides) superiores y un total de 28 dientes. No obstante, estudios morfológicos (Carraway, 2005, 2007; Ducommun *et al.*, 1994; Hibbard, 1950) y moleculares (George, 1986; Ohdachi *et al.*, 2006) subsecuentes a esta clasificación encontraron diferencias considerables entre esta especie de musaraña y las de *Notiosorex* para proponer un género propio. *Megasorex* (Hibbard, 1950) es, por lo tanto, un género monotípico y el único de la Familia Soricidae endémico de México (Mendoza y Ceballos, 2005). El nombre deriva del griego *me-gas* que significa ‘gran’ o ‘grande’ y del latín *soricinus*, ‘de una musaraña’ (Armstrong y Jones, 1972; Carraway, 2007).

Megasorex gigas es una musaraña de tamaño relativamente grande, con medidas de alrededor de 125 mm de longitud y de 10 g de peso (Fig. 1). Se distingue de las especies de *Notiosorex* por su mayor tamaño, su cráneo grande y robusto y porque la mayoría de los ejemplares carecen de pigmentación rojiza en los dientes (Carraway, 2007; Hibbard, 1950). Además, esta especie de musaraña tiene un tono de pelaje dorsal usualmente gris plomo, a veces con parches blancos, orejas visibles y cola corta menor a 1/3 de la longitud total

(Merriam, 1897). *Megasorex gigas* ha sido poco estudiada, se desconoce gran parte de su biología particular y es poco lo publicado acerca de ella (Armstrong y Jones, 1972). El gobierno mexicano por medio de la NOM-059-SEMARNAT-2001, la catalogó como una especie amenazada (Luiselli Fernández, 2002). En la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) está catalogada como una especie de poca preocupación (least concern) de la cual no se sabe su tendencia poblacional (IUCN, 2008).



Figura 1. Hembra adulta de *Megasorex gigas* (CNMA 43094), capturada en el bosque mesófilo del Rancho La Mora, Comala, Colima, a 1,322 msnm. Foto: Ana Rosa Montiel Arteaga.

Megasorex gigas se distribuye en el oeste y sur de México teniendo registros en las entidades federativas de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Fig. 2; Mendoza y Ceballos, 2005; Villa y Cervantes, 2003). Esta especie de musaraña habita principalmente en parte de la distribución del bosque tropical caducifolio que se encuentra de manera casi continua desde el sur de Sonora hasta la frontera con Guatemala en la costa del Pacífico, con áreas más extensas en el oeste de Jalisco y en las cuencas del Balsas y del Santiago (Fig. 3; Rzedowski, 1983; Trejo y Dirzo, 2000). La distribución de este tipo de vegetación en el área está determinada por características climáticas, como la temperatura y la precipitación, y éstas, a su vez, por la presencia de la Sierra Madre Occidental (SMO) y la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) ya que estas cadenas montañosas bloquean los

vientos provenientes del noreste creando un efecto de sombra orográfica (Fig. 4; Ceballos y García, 1995; Rzedowski, 1983).

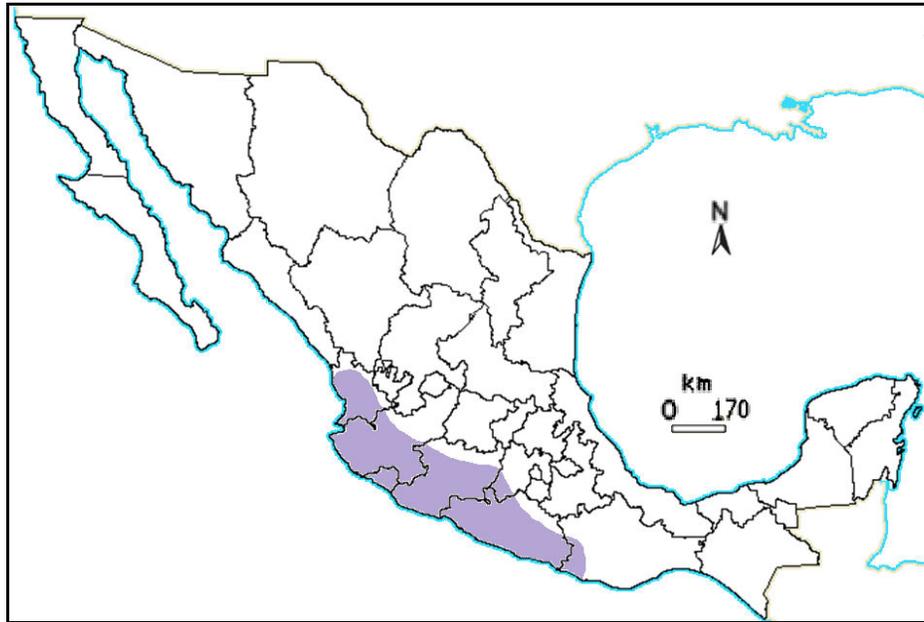


Figura 2. Distribución geográfica de *Megasorex gigas*, especie de musaraña endémica de México.

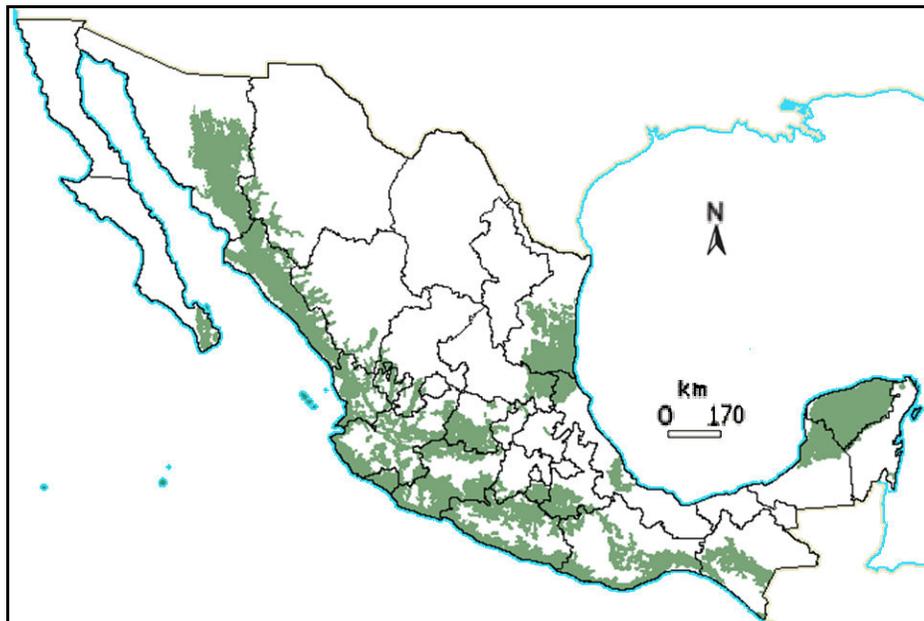


Figura 3. Distribución geográfica del bosque tropical caducifolio en México (INEGI, 2009).



Figura 4. Localización de la Sierra Madre Occidental, la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), la Sierra Madre del Sur y la cuenca del Balsas (Foto satelital de <http://maps.google.com.mx/>).

El bosque tropical caducifolio crece cerca de la costa en el sur de México y en la ladera de la SMO en el oeste del país, desde el nivel del mar a los 2,000 m de altitud, siendo abundante por debajo de los 1,500 m (Rzedowski, 1983). Los registros de *M. gigas* se localizan del nivel del mar a los 1,800 m (Armstrong y Jones, 1972; Carraway, 2007). Este bosque está en contacto con matorrales xerófilos al norte de su distribución y con bosques de pino-encino y bosques mesófilos de montaña a mayor altitud al este (Ceballos y García, 1995). *Megasorex gigas* también habita en estos tipos de vegetación (Cervantes *et al.*, 2008; Fisher y Bogan, 1977; Téllez-Girón *et al.*, 1997). El bosque tropical caducifolio se mezcla con el subcaducifolio en el suroeste de México formando mosaicos de distribución difíciles de delimitar, en cambio, está aislado geográfica y ecológicamente del bosque tropical perennifolio distribuido al sureste por cadenas montañosas como la Sierra Madre del Sur (SMS; Fig. 4; Ceballos y García, 1995; Rzedowski, 1983).

México abarca un área de transición biogeográfica debido a que dos biotas de origen evolutivo independiente, una de la región Neártica (Norteamérica) y la otra de la Neotropical (Sudamérica), se mezclan en distintas medidas, simétrica o asimétricamente, tanto latitudinal como altitudinalmente a lo largo del país (Morrone, 2006; Zunino y Zullini, 2003). La Zona de Transición Mexicana en sentido estricto incluye a cinco provincias biogeográficas que se definen por patrones de distribución similares de diversas especies asociadas a características fisiográficas y son la Sierra Madre Oriental, la SMO, la SMS, la FVTM y la Cuenca del Balsas (Fig. 5; Morrone, 2006; Zarza *et al.*, 2008). El bosque tropical caducifolio donde habita *M. gigas* se distribuye en las últimas tres provincias biogeográficas mencionadas y en la de la Costa del Pacífico (Fig. 5; Morrone, 2006).

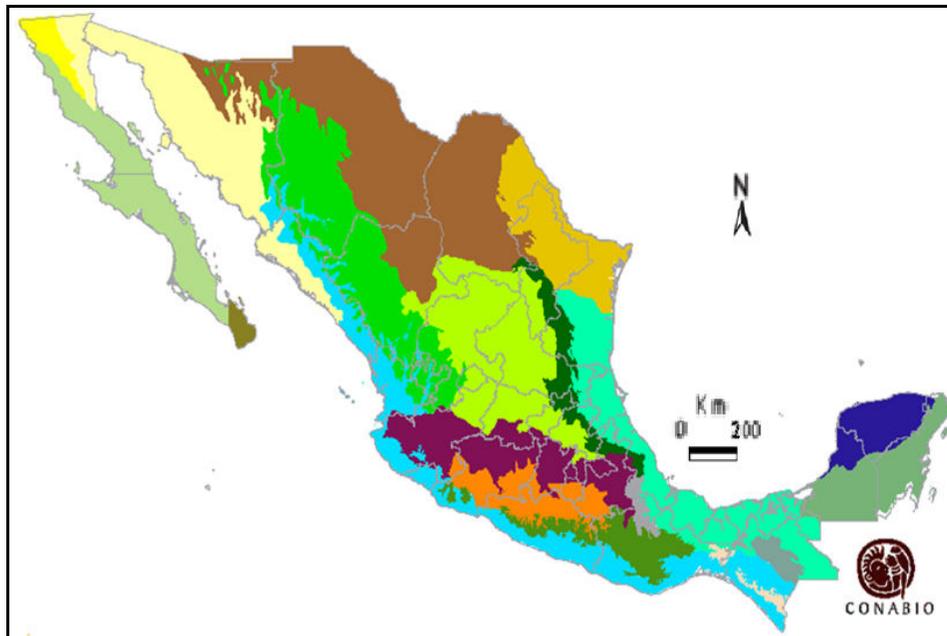


Figura 5. Provincias biogeográficas de México. Provincias en la Zona de Transición Mexicana: ■ Cuenca del Balsas, ■ Faja Volcánica Transmexicana, ■ Sierra Madre Occidental, ■ Sierra Madre Oriental, ■ Sierra Madre del Sur. Provincia de la Costa del Pacífico ■ (CONABIO, 1997).

Los gradientes altitudinales y la convergencia de las biotas de distintas regiones biogeográficas se asocian a una elevada heterogeneidad ambiental la cual suelen presentar las áreas de gran endemividad (Ceballos y Rodríguez, 1993). El bosque tropical caducifolio de la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas alberga a una gran cantidad de especies endémicas de distintos grupos taxonómicos (Trejo y Dirzo, 2000). Algunos de éstos son familias de plantas con flores, como los copales o cuajotes (*Burseraceae*), la mayoría de origen Neotropical; órdenes de insectos, como las abejas (*Hymenoptera*) y las mariposas (*Lepidoptera*) de la familia *Papilionidae*; las cuatro clases de vertebrados terrestres, como los mamíferos (*Mammalia*), la mayoría de éstos últimos de origen Neártico (Ramamoorthy *et al.*, 1993).

Las especies de mamíferos endémicas al bosque tropical caducifolio, como las musarañas, los ratones y las tuzas, tienen poca masa corporal, bajo nivel de dispersión, ciclos de vida cortos y sus áreas de distribución varían en extensión pero tienden a ser pequeñas (Ceballos, 1995). Por ejemplo, la rata arborícola de Magdalena (*Xenomys nelsoni*) y la tuza de Buller (*Pappogeomys bulleri*) habitan en un área reducida en el oeste de la FVTM (Ceballos y Rodríguez, 1993; Hafner *et al.*, 2009), mientras que el zorrillo pigmeo (*Spilogale pygmaea*) sólo se encuentra en la costa del Pacífico (Medellín *et al.*, 1998). En cambio, *Megasorex gigas* se distribuye tanto en la costa del Pacífico como en la cuenca del Balsas (Carraway, 2007).

El origen de estas especies pudo estar ligado a la fragmentación de su hábitat, pues es un mecanismo clave que promueve la especiación y la variación poblacional (García-Moreno *et al.*, 2004). Las características fisiográficas que cruzan la distribución del bosque tropical caducifolio en la costa del Pacífico, como el oeste de la FVTM y el río Balsas, podrían limitar la dispersión entre refugios de especies de mamíferos pequeños, como *M. gigas*. Uno de los indicios que sugerirían esto sería una considerable variación morfológica o genética entre individuos de distintas poblaciones de una especie asociada a las características fisiográficas del área de distribución. Tal es el caso de la tuza *P. bulleri*, cuya variación del ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) es considerable y se encuentra asociada a cambios de altitud y cuencas de ríos en el suroeste de la FVTM

(Hafner *et al.*, 2009). El ADNmt de los animales es útil para inferir las relaciones genealógicas y evolutivas dentro y entre poblaciones y, debido a sus tasas relativamente rápidas de sustitución, adecuado para el análisis a nivel de especie y género (Rubinoff y Holland, 2005).

Estudios del ADNmt de la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*), la culebra lira (*Trimorphodon biscutatus*) y la rana leopardo de Forrer (*Rana forreri*) reportaron variación genética considerable entre filogrupos, agrupaciones ancestro-descendiente, al norte y al sur de la FVTM (Devitt, 2006; Zaldívar-Riverón *et al.*, 2004; Zarza *et al.*, 2008). Estas especies de reptiles y anfibios habitan en el bosque tropical caducifolio de la costa del Pacífico como *M. gigas*, por lo que podría ser que en el área de esta característica fisiográfica existan filogrupos mitocondriales de esta especie de musaraña con variación genética similar. Para el caso del ratón pigmeo sureño (*Baiomys musculus*), la variación del gen citocromo *b* es considerable entre dos filogrupos distribuidos al oeste y este del área donde la extensión sur de la FVTM se une con el norte de la SMS (Amman y Bradley, 2004).

En mamíferos, la variación del gen citocromo *b* (*Citb*) o del gen citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI) es similar, por lo que ambos genes mitocondriales brindan información acerca de la diferenciación genética de las especies (Tobe *et al.*, 2009). Además, los filogrupos mitocondriales suelen estar asociados a las características fisiográficas del área de estudio (Avice y Walker, 1999). Por lo tanto, estos genes pueden ser una herramienta útil para conocer la variación genética y la existencia y distribución de filogrupos mitocondriales en *M. gigas*. Estos últimos, de ser semejantes a los de otras especies de vertebrados que habitan en la región, sugerirían que características fisiográficas en el oeste de México promueven la divergencia genética de esta especie de musaraña.

HIPÓTESIS

Si la variación en el ADNmt de *Megasorex gigas* es considerable y existen filogrupos definidos por características fisiográficas en el área de distribución, entonces es probable que estas últimas promuevan la divergencia genética de esta especie de musaraña.

OBJETIVOS

General

Describir la variación y estructura genética de *Megasorex gigas* e interpretarla en función de las características fisiográficas en su área de distribución.

Particulares

- Describir las secuencias del gen *Citb* (1,140 pb) y del gen *COI* (720 pb) de *M. gigas*.
- Analizar filogenéticamente estas secuencias de ADNmt de esta especie de musaraña.

MÉTODOS

Revisión de Literatura y Colecciones Científicas

La literatura científica acerca de *Megasorex gigas* es escasa y se limita principalmente a nuevos registros. Se revisó esta literatura y se llevó a cabo una búsqueda de ejemplares de museo y muestras de tejido congelado de esta especie de musaraña en los listados de colecciones científicas de México y Estados Unidos. Las colecciones científicas mexicanas que fueron consultadas de manera directa son la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias (MZFC) de la UNAM, la Colección de Mamíferos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y la Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I). Las colecciones científicas estadounidenses fueron consultadas a través de la revisión de la literatura científica publicada (Carraway, 2007; López-Wilchis, 2003) y la búsqueda en la base de datos MaNIS (<http://manisnet.org/>) de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos.

El fin de esta búsqueda fue agrupar la información de los registros de colecta de *M. gigas* (Apéndice I), a partir de los cuales se generaron los mapas de distribución y se identificaron posibles localidades de colecta.

Colecta Científica

Los ejemplares de *M. gigas* son escasos en colecciones científicas mexicanas. La CNMA del Instituto de Biología de la UNAM alberga 22 ejemplares de esta especie de musaraña, la mayoría de Colima, ya presentes antes de este estudio. Se llevaron a cabo tres salidas al campo con el fin de coleccionar *M. gigas* a las entidades federativas de Nayarit y Guerrero entre los meses de febrero y mayo del 2009 durante la temporada de secas. Las localidades donde se trabajó fueron Yetla, municipio de Coyuca de Benítez, Guerrero, del 15 al 20 de febrero; Santa Rosa, Coyuca de Benítez, Guerrero, del 27 al 31 de marzo; y Venustiano

Carranza, municipio de Tepic, Nayarit, del 20 al 25 de mayo. La licencia de colector científico de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) utilizada fue la de Fernando A. Cervantes con número de registro FAUT-0002. El esfuerzo de captura varió dependiendo del número de días de colecta, número de personas y las condiciones del lugar como la abundancia de sitios húmedos y la dureza del suelo. En general, en cada salida se colocaron un mínimo de 300 trampas de caída (pitfall) que consistieron en botes de plástico de 1L enterrados a ras del suelo (Fig. 6A) de manera más o menos lineal, en dos o tres sitios de colecta que se escogieron por tener suelo húmedo cubierto de hojarasca y troncos caídos y estar cerca de cuerpos de agua (Fig. 6B). Las trampas permanecieron en su sitio un mínimo de tres noches y se revisaban cada mañana temprano. En el manejo de las musarañas se siguieron los procedimientos establecidos por la Sociedad Americana de Mastozoología (Gannon *et al.*, 2007). Debido a que las musarañas capturadas mueren rápido por inanición, es conveniente prepararlas como ejemplares de museo (cráneo, esqueleto y piel), tomando inicialmente las medidas de longitud convencionales (total, cola, pata y oreja) en milímetros y de peso total en gramos, y preservar sus órganos internos (hígado, corazón y riñón) en alcohol al 90–100% tan pronto sean colectadas para evitar lo más posible la degradación del espécimen.

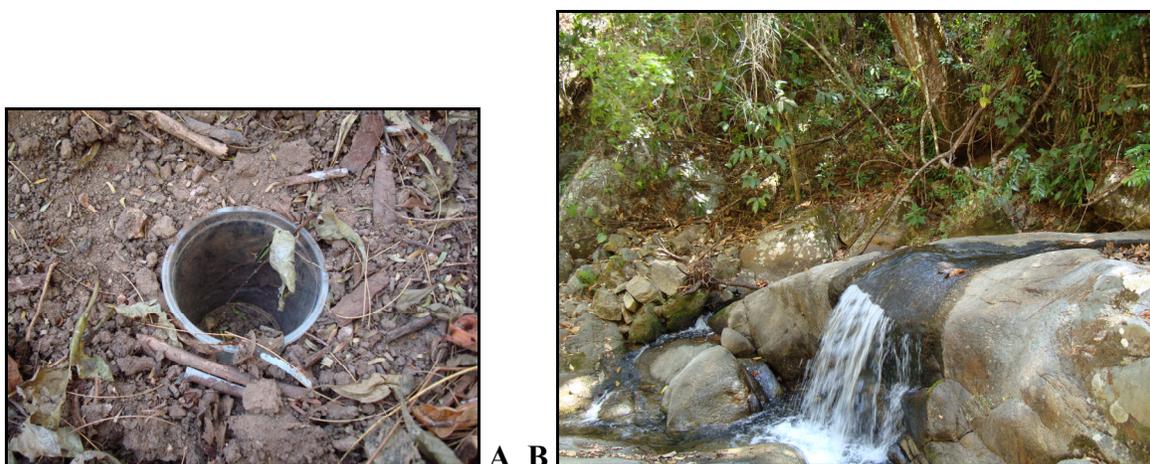


Figura 6. Trampa para musarañas y sitio de colecta. A) Bote de plástico transparente de 1L enterrado a ras del suelo para servir como trampa de caída. B) Arroyo en la Reserva Forestal de Santa Rosa, Coyuca de Benítez, Guerrero. Fotos: Alejandra Breña Ochoa.

Muestras de Tejidos

Las muestras de tejidos (hígado, corazón o riñón) de *M. gigas*, *Cryptotis alticola* y *Sorex saussurei* procesadas para este estudio fueron solicitadas a la CNMA del Instituto de Biología de la UNAM, en donde se almacenan estos tejidos a -75°C y se albergan los ejemplares de museo correspondientes (Apéndice I). Las muestras solicitadas pertenecen a 16 *M. gigas*, de las cuales 13 fueron colectadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Comala, Colima (CNMA 43089–48098, 43811–43813) y tres, en la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, La Huerta, Jalisco (CNMA 42923, 42924, 44414); a tres *S. saussurei* de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (CNMA 43107, 43108, 43113) y a tres *C. alticola* del Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan (CNMA 44765–44767). También se procesaron muestras de hígados de tres *Notiosorex crawfordi* (NMMNH 2388–2390) solicitadas al Museo de Historia Natural y Ciencia de Nuevo México (NMMNH; Apéndice II).

Obtención de las Secuencias de Nucleótidos

El procesamiento de todas las muestras de tejidos solicitadas se realizó en el Laboratorio de Mastozoología de la CNMA del Instituto de Biología de la UNAM. La extracción del ADN de estas muestras se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy Tissue de Qiagen. La cuantificación del ADN para determinar la cantidad extraída se hizo con un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Spectronic. La amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de fragmentos de ADNmt se realizó en un termociclador Termo Hybaid PCR Sprint. Los volúmenes de los reactivos para la PCR se estandarizaron para mantener las concentraciones constantes (Apéndice III), mientras que los oligonucleótidos o primers y las condiciones óptimas para la PCR variaron dependiendo del fragmento de ADNmt amplificado (Cuadro 1; Apéndice IV).

Cuadro 1. Pares de oligonucleótidos o primers utilizados en la amplificación del gen *Citb* y del gen COI de *Megasorex gigas* (1, 3; 4, 5), *Notiosorex crawfordi* (1, 3; 4, 5), *Cryptotis alticola* (1, 2; 6, 7) y *Sorex saussurei* (1, 2; 6, 7).

Gen	Primer	Secuencia de Nucleótidos	Tamaño	Referencia	
<i>Citb</i>	MVZ05 (1)	5'- CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G - 3'	1,140 pb*	Irwin <i>et al.</i> , 1991	
	MVZ14 (2)	5'- GGT CTT CAT CTY HGG YTT ACA AGA C - 3'		Smith y Patton, 1993	
	H15915 (3)	5'- AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGA C - 3'		Irwin <i>et al.</i> , 1991	
COI	LepF1-t1 (4)	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'	720 pb*	Hebert <i>et al.</i> , 2004	
	LepR1-t1 (5)	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACT AAA CTT CTG GAT GTC CAA AAA ATC A - 3'			
	RonM (6)	5'- GGM GCM CCM GAT ATR GCA TCC C - 3'		468 pb*	Pfunder <i>et al.</i> , 2004
	NancyM (7)	5'- CCT GGG AGR ATA AGA ATA TAW ACT TC - 3'			

*pb: pares de bases

Los fragmentos de ADNmt amplificados se purificaron utilizando el kit QIAquick de Qiagen. La electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de 2 µl de muestra, tanto del ADN genómico como de los fragmentos amplificados, se llevó a cabo con un corrimiento de 40 min a 100 volts. El corrimiento en el gel se visualizó con el programa Molecular Imaging Software en una cámara Kodak EDAS 290, permitiendo confirmar el tamaño de los fragmentos procesados y determinar su concentración y pureza. La secuenciación en ambas direcciones de los fragmentos purificados de ADNmt se realizó en uno de los secuenciadores automáticos (ABI Prism 310 ó 3100) encontrados en el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente al posgrado en Ciencias Biológicas del

Instituto de Biología o en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, ambos de la UNAM.

Los fragmentos de ADNmt procesados corresponden al gen citocromo *b* (*Citb*) y al gen citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI). El tamaño de ambos genes mitocondriales varía en un máximo de 20 pares de bases (pb) entre diferentes especies de mamíferos pero no dentro de la misma especie (Tobe *et al.*, 2009). En las especies de musarañas de la subfamilia Soricinae, el gen *Citb* tiene una longitud total de 1,140 pb, mientras que el gen COI, de 1,545 pb (Nikaido *et al.*, 2001; Ohdachi *et al.*, 2006). Las secuencias de nucleótidos amplificadas en este estudio corresponden a las 1,140 pb del gen *Citb* de cuatro especies de musarañas de esta subfamilia y a un fragmento del gen COI el cual para *M. gigas* y *N. crawfordi* es de 720 pb, localizado del sitio 10 al 730 en el extremo 5' del gen, mientras que para *C. alticola* y *S. saussurei* es de 468 pb, localizado del sitio 262 al 730 en el extremo 5' del gen.

Características de las Secuencias de Nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos F (forward) y R (reverse) obtenidas al secuenciar en ambas direcciones un fragmento de ADNmt amplificado se empalmaron, alinearon y editaron con el programa BioEdit v.7.0.7.0 (Hall, 1999). La Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Básicos Locales (BLAST) se usó para comparar las secuencias de nucleótidos editadas con aquellas registradas en las bases de datos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y de BOLD Systems (www.boldsystems.org/) y confirmar que pertenezcan al gen mitocondrial (gen *Citb* o gen COI) de la especie de musaraña correspondiente.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de cada gen mitocondrial se compararon entre sí en busca de regiones conservadas y secuencias idénticas, lo cual permitió determinar los haplotipos, con el programa BioEdit v.7.0.7.0 (Hall, 1999). Además, las características de estas secuencias, como las frecuencias de nucleótidos y codones, las variaciones de nucleótidos y aminoácidos y la cantidad de transiciones y transversiones con su relación, se obtuvieron con el programa MEGA v.4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Estos datos

permiten obtener estimaciones acertadas de distancias genéticas entre secuencias de nucleótidos homólogas (Pesole *et al.*, 1995).

La variabilidad de las secuencias de nucleótidos de cada gen mitocondrial en las poblaciones analizadas de *M. gigas* se evaluó obteniendo la diversidad de nucleótidos (π), que es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos difieran entre dos individuos escogidos al azar (Nei, 1987); la diversidad de haplotipos (H), la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar tengan distintos haplotipos (Nei, 1987); y el número promedio con su desviación estándar de las diferencias de nucleótidos entre pares de secuencias. Estos estadísticos fueron calculados con el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

La existencia de estructura poblacional en *M. gigas* se evaluó mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA), la cual divide la varianza total en componentes aditivos representados por la variación asociada con diferencias en la diversidad de nucleótidos y haplotipos dentro y entre poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992). La medida de distancia genética fue las diferencias de nucleótidos entre pares de haplotipos. La relevancia estadística de los componentes de la varianza se evaluó con 1,000 permutaciones. Este estadístico también se calculó con el programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Análisis Filogenético de las Secuencias de Nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de *M. gigas* y de las otras especies de musarañas fueron analizadas filogenéticamente en conjunto. *Notiosorex crawfordi* fue incluida en el análisis debido a que es considerada el grupo hermano de *M. gigas*, mientras que *C. alticola* y *S. saussurei*, de las tribus Blarinini y Soricini, respectivamente, debido a que la relación de sus tribus con la Notiosoricini, integrada por *M. gigas* y *N. crawfordi*, no está resuelta (Ohdachi *et al.*, 2006). Además, estas tres especies son representantes de los otros géneros de musarañas presentes en México.

La congruencia filogenética de las secuencias del gen *Citb* y del gen COI de las cuatro especies de musarañas se evaluó llevando a cabo el análisis de homogeneidad de división (partition homogeneity test; Farris *et al.*, 1994) con el programa PAUP v.4.0b10a (Swofford, 2001). Debido a que este análisis no encontró heterogeneidad significativa entre las secuencias de los dos genes mitocondriales ($P = 0.154$), ambos se analizaron filogenéticamente en conjunto. Con cada una de las tres matrices de datos generadas (gen *Citb*, gen COI y los dos combinados) se llevó a cabo el análisis de distancia genética y el de vecino más cercano con el programa MEGA v.4.0 (Tamura *et al.*, 2007), el de parsimonia con el programa PAUP v.4.0b10a (Swofford, 2001) y el de probabilidad bayesiana con el programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

Las distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos se evaluaron utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura (K2p; Kimura, 1980), el cual presupone que la tasa de transiciones por sitio puede diferir de la tasa de transversiones (Pesole *et al.*, 1995). Este modelo se escogió ya que se ha utilizado en otros estudios de ADNmt de musarañas (Fumagalli *et al.*, 1999; Ohdachi *et al.*, 2006) y, por lo tanto, los resultados son comparables. A partir de las matrices de distancias obtenidas se generaron árboles de vecino más cercano para cada caso. El apoyo en los clados de estos árboles se obtuvo con 1,000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

Antes de correr el análisis de parsimonia se eliminaron los caracteres constantes de las secuencias de nucleótidos. Los caracteres variables fueron considerados durante el análisis como discretos con cuatro estados posibles: A, C, G y T (adenina, citosina, guanina y timina, respectivamente); de tipo no ordenado y con pesos iguales. El análisis heurístico llevado a cabo tuvo un árbol inicial obtenido mediante adición por pasos (stepwise addition) y 100 réplicas de adición de secuencias de manera aleatoria (random addition sequence). El algoritmo utilizado para la agrupación de ramas (branch-swapping) fue el TBR (tree-bisection-reconnection). A partir de los árboles más parsimoniosos obtenidos se generó un árbol de consenso estricto. El apoyo en los clados de este árbol se obtuvo con una búsqueda heurística de 1,000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

Antes de correr el análisis de probabilidad bayesiana se buscó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajusta a las tres matrices de datos con el programa jModelTest v.0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008). Este modelo para todos los casos, de acuerdo al criterio de información Akaike (AIC; Akaike, 1974), es el de tiempo general reversible más distribución gamma (GTR+G; Tavaré, 1986) el cual permite intervalos de sustitución instantáneos y variables entre cada uno de los seis pares de nucleótidos (Zwickl y Holder, 2004).

El análisis de probabilidad bayesiana se llevó a cabo con dos corridas simultáneas de cuatro cadenas Markov Monte Carlo para disminuir la posibilidad de alcanzar una aparente distribución estática de los datos. Se utilizaron los valores de calentamiento (heating) de las cadenas predeterminados por el programa. Los árboles iniciales se obtuvieron de manera aleatoria y la distribución de parámetros iniciales fue uniforme. Las cadenas se corrieron por 3,000,000 de generaciones y los árboles se muestrearon cada 100 generaciones. La distribución estática de los datos se determinó de manera visual tomando en cuenta que la desviación estándar promedio de las frecuencias divididas (split frequencies) fuese menor a 0.01. El 25% (7,500) de los valores de los parámetros y de los árboles muestreados fueron eliminados mediante quemado (burn-in). El resto de los árboles (22,500) se usaron para generar un árbol consenso de 50% de mayoría y determinar los valores de probabilidad posterior que indican el apoyo en los clados (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen *Citb* y del gen COI de *M. gigas* se evaluaron en cada caso mediante redes de haplotipos utilizando el algoritmo Median-Joining (MJ; Bandelt *et al.*, 1999) del programa Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com). Durante el análisis, los caracteres variables tuvieron pesos iguales y los parámetros, como Epsilon ($\epsilon = 0$) el cual estima el número máximo de diferencias entre haplotipos, se mantuvieron con los valores predeterminados por el programa.

RESULTADOS

Literatura y Colecciones Científicas

La literatura científica acerca de *Megasorex gigas* hace mención de un gran número de los ejemplares de museo encontrados durante la revisión de los listados de las colecciones científicas mexicanas y estadounidenses (Apéndice I). No se encontró el registro de ingreso a una colección científica de cinco ejemplares, tres de Jalisco y dos de Colima, según se reporta en la literatura (Téllez-Girón *et al.*, 1997). La mayoría de los ejemplares de esta especie de musaraña se encuentran en 11 colecciones estadounidenses de acuerdo a la base de datos MaNIS y a la literatura (Carraway, 2007; López-Wilchis, 2003). La manera más común en que están preparados es en cráneo y piel y son pocos los que cuentan con el esqueleto completo. El ejemplar LSUMZ 34380 depositado en el museo de Historia Natural del Condado de Los Ángeles (LSUMZ) es el único en una colección estadounidense que tiene tejidos congelados.

Las colecciones mexicanas revisadas directamente que cuentan con ejemplares de *M. gigas* preservados en piel, cráneo y esqueleto son la CNMA del Instituto de Biología de la UNAM y la Colección de Mamíferos de la UAM-I (Apéndice I). Al momento de las visitas a la Colección de Mamíferos del MZFC de la UNAM y a la Colección de Mamíferos de la ENCB del IPN no se encontraron ejemplares de museo de esta especie de musaraña.

Los mapas generados señalan las localidades de colecta por entidades federativas de *M. gigas* recopiladas en este trabajo (Figs. 7–11). Cada entidad federativa a lo largo de su distribución (Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) cuenta con pocas localidades de colecta dispersas (Nayarit, Jalisco y Michoacán) o agrupadas (Colima y Guerrero) en una zona particular. La mayoría de los ejemplares de museo registrados en colecciones científicas de México y Estados Unidos, incluyendo aquel descrito inicialmente u holotipo (Merriam, 1897), se han capturado en áreas ribereñas con suelo húmedo, troncos, rocas y cantos rodados dentro del bosque tropical caducifolio de la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas (Carraway, 2007).



Figura 7. Localidades donde se ha colectado a *Megasorex gigas* en Nayarit. Los números están citados en el Apéndice I.

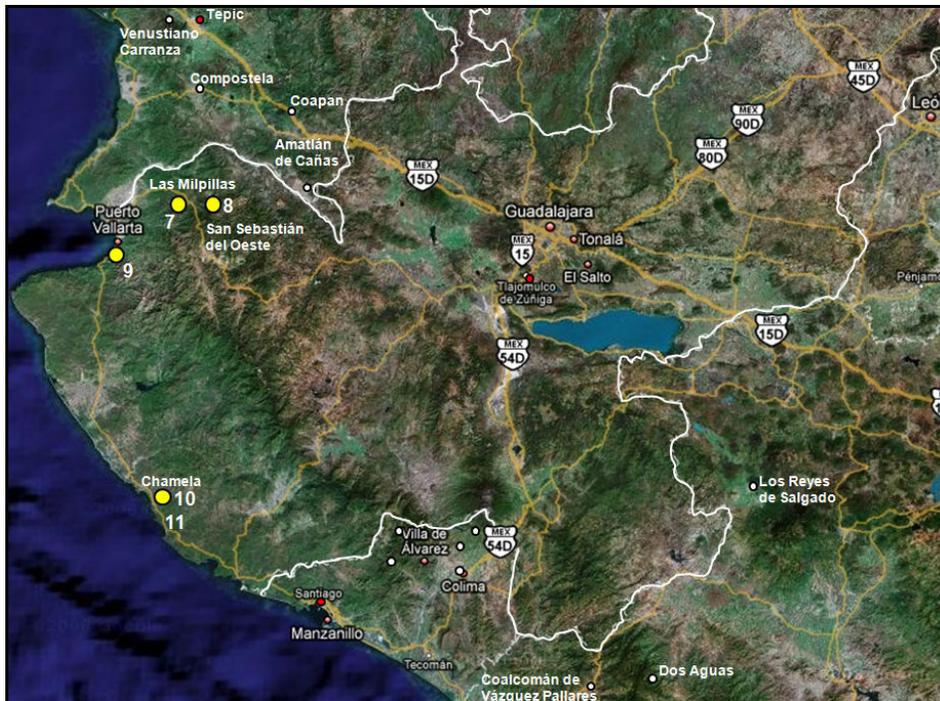


Figura 8. Localidades donde se ha colectado a *Megasorex gigas* en Jalisco. Los números están citados en el Apéndice I.

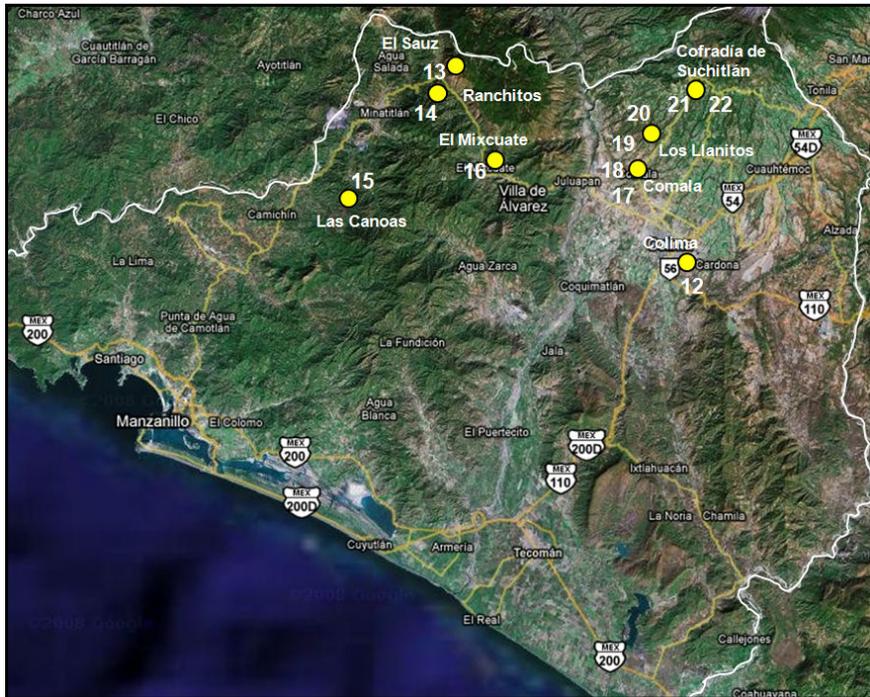


Figura 9. Localidades donde se ha colectado a *Megasorex gigas* en Colima. Los números están citados en el Apéndice I.



Figura 10. Localidades donde se ha colectado a *Megasorex gigas* en Michoacán. Los números están citados en el Apéndice I.



Figura 11. Localidades donde se ha colectado a *Megasorex gigas* en Guerrero y Oaxaca. Los números están citados en el Apéndice I.

El bosque tropical caducifolio está gravemente amenazado por la destrucción y perturbación ocasionada por actividades humanas como la agricultura, el pastoreo de ganado bovino y la explotación maderera (Trejo y Dirzo, 2000). El 68% de este tipo de vegetación permanece inalterado en Oaxaca (Sánchez-Cordero *et al.*, 2005), sin embargo, en esta entidad federativa sólo se tiene un registro de *M. gigas* (Fig. 11; Apéndice I; Goodwin, 1969).

Áreas en otras entidades federativas donde aún es posible encontrar inalterado al bosque tropical caducifolio y se cuentan con algunos registros de esta especie de musaraña incluyen: el noreste y suroeste de Nayarit (Fig. 7; Fisher y Bogan, 1977); extremos opuestos de la costa de Jalisco (Fig. 8; Téllez-Girón *et al.*, 1997); el norte de Colima (Fig. 9; Cervantes *et al.*, 2008; Montiel, 2006); el suroeste de Michoacán, donde el río Balsas desemboca al mar (Fig. 10; Carraway, 2007; Hibbard, 1950); y en el oeste y este de Michoacán, dentro de la cuenca del Balsas (Fig. 10; García, 2006). Por otro lado, existen extensas áreas entre localidades de colecta donde aún hay bosque tropical caducifolio y no se ha registrado la presencia de *M. gigas*, tal es el caso del norte de Nayarit, gran parte del

oeste de Jalisco, la mayor parte de la cuenca del Balsas en Michoacán y la Costa Grande de Guerrero. Esto indica lo poco que se ha estudiado a esta especie de musaraña en México y la escasa información que se tiene acerca del estado actual de sus poblaciones.

Colecta Científica

En las salidas de campo a las localidades de Yetla, municipio de Coyuca de Benítez, Guerrero y de Venustiano Carranza, municipio de Tepic, Nayarit, llevadas a cabo del 15 al 20 de febrero y del 20 al 25 de mayo del 2009, respectivamente, no se colectó ninguna *M. gigas* ni ejemplar de musaraña de otro género. En la salida a Santa Rosa, Coyuca de Benítez, Guerrero, llevada a cabo del 27 al 31 de marzo del 2009, no se colectaron *M. gigas* pero sí 10 ejemplares de *Cryptotis* y una de *Sorex*. A éstos 11 especímenes se les tomó las medidas de longitud convencionales (total, cola, pata y oreja) en milímetros y de peso total en gramos y fueron preparados como ejemplares de museo (cráneo, piel y esqueleto) para su ingreso a la CNMA; además, los órganos internos (hígado, corazón y riñón) fueron preservados en alcohol al 90–100% en campo y a -75°C en esta colección científica.

Secuencias de Genes Mitocondriales

Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron de 16 *M. gigas* de la CNMA: 13 de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (CNMA 43089–48098, 43811–43813) y tres de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala (CNMA 42923, 42924, 44414). Además, se obtuvo las secuencias de nucleótidos de una *M. gigas* de Chilpancingo de los Bravo, Guerrero (CNMA FR1112) la cual está preservada en alcohol al 100% y se ingresó a la CNMA como parte del presente estudio, representando el único ejemplar de esta entidad federativa con tejidos congelados actualmente en esta colección científica (Apéndice I). También se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de tres *S. saussurei* (CNMA 43107, 43108, 43113) y tres *C. alticola* (CNMA 44765–44767) de la CNMA y de tres *N. crawfordi* (NMMNH 2388–2390) del NMMNH (Apéndice II).

El análisis de BLAST indicó que las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinean con facilidad con las de genes mitocondriales de otras especies de musarañas debido a su similitud, por lo tanto, corresponden al gen *Citb* o al gen COI. Estas secuencias se ingresaron a las bases de datos de GenBank y BOLD Systems. Antes de este trabajo, en GenBank se tenía registrada una sola secuencia del gen *Citb* (1,140 pb) de una *M. gigas* de Comala, Colima (AB175150; Ohdachi *et al.*, 2006), en cambio, ni en GenBank ni en BOLD Systems se tenía registrada alguna secuencia del gen COI de esta especie de musaraña.

Las secuencias de 1,140 pb del gen *Citb* de todos los ejemplares de musarañas analizados y las de 720 pb del gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi* son de buena calidad y se obtuvieron utilizando los oligonucleótidos o primers, las condiciones de reacción y los volúmenes de reactivos para la PCR descritos en métodos (Cuadro 1; Apéndices III y IV). Debido a que no fue posible amplificar el fragmento de 720 pb del gen COI de *C. alticola* y *S. saussurei*, se optó por amplificar uno más corto de 468 pb localizado en la misma región del gen que el primero. Para esto se utilizaron los primers descritos en métodos para estas especies de musarañas (Cuadro 1) y las condiciones originales de la PCR se modificaron para cada una (Apéndice IV; Pfunder *et al.*, 2004). La temperatura de alineación se subió a 60°C para amplificar las muestras de *S. saussurei* y a 55°C para las de *C. alticola*. Además, a la mezcla para la PCR de las muestras de esta última especie se añadió 0.625 µl de albúmina sérica bovina pura (BSA) para incrementar la especificidad de la reacción.

Frecuencias de Nucleótidos y Codones

Los cuatro nucleótidos, tanto pirimidinas (timina y citocina) como purinas (adenina y guanina), están repartidos en distinta proporción a lo largo de los dos genes mitocondriales analizados de las cuatro especies de musarañas, siendo la T la más común y la G la menos. En el gen *Citb* de las cuatro especies y en el gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi*, el nucleótido más abundante (%) es T (30.6 *Citb*; 32.2 COI), seguida de A (28.8 *Citb*; 27.1 COI), después C (27.1 *Citb*; 23.9 COI) y por último G (13.5 *Citb*; 16.9 COI). En cambio,

en el gen COI de *C. alticola* y *S. saussurei*, el nucleótido más abundante nuevamente es T (29.7%), pero le sigue C (27.7%), después A (25.1%) y por último G (17.6%).

Los cuatro nucleótidos también están repartidos en distinta proporción en cada una de las tres posiciones de los codones de los genes mitocondriales analizados de las cuatro especies de musarañas. En el gen *Citb* y en el gen COI, la G es escasa en la tercera posición, la T es abundante en la segunda y los nucleótidos se reparten de manera homogénea en la primera (Cuadros 2 y 3). Sin embargo, en la tercera posición del gen COI de *N. crawfordi*, la cantidad de T es mayor (44.5%) y la de C menor (14.2%) a lo encontrado en la misma posición de este gen de las otras especies de musarañas analizadas (Cuadro 3).

La frecuencia de nucleótidos tiene mayor variación en la tercera posición del codón de los genes mitocondriales analizados de las cuatro especies de musarañas. En esta posición se obtuvo los valores más altos de desviación estándar (2.2 *Citb*; 4.7 COI), seguida de la primera (1.0 *Citb*; 1.3 COI) y por último la segunda (0.3 *Citb*; 0.7 COI; Cuadros 2 y 3). Este orden de variabilidad se debe a que muchas sustituciones de nucleótidos en la tercera posición del codón son sinónimas o silenciosas ya que no modifican al aminoácido codificado.

Los codones sinónimos, mismo aminoácido codificado, se reparten con distinta frecuencia en los genes mitocondriales analizados de las cuatro especies de musarañas. En el gen *Citb* y en el gen COI, no hay una tendencia general evidente a la preferencia de ciertos codones sinónimos sobre otros con excepción de que los menos comunes son aquellos que tienen G en la tercera posición (Cuadro 4). En esta posición el porcentaje del contenido G+C (35.6 *Citb*; 29.8 COI) es menor al del A+T (64.3 *Citb*; 70.2 COI). Además, en el gen COI, la frecuencia promedio de los codones TGT y TGC que codifican cisteína es cero y, en el gen *Citb*, el codón de inicio es ATG y el de término, AGA.

Cuadro 2. Frecuencia de nucleótidos (%) en las tres posiciones de los codones del gen Citb de *Sorex saussurei*, *Cryptotis alticola*, *Notiosorex crawfordi* y *Megasorex gigas*.

Musarañas	Primera			Segunda			Tercera					
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
<i>S. saussurei</i>	25	26.1	25.8	23.2	41.3	24.5	20.2	14	21.1	34.4	40.2	4.4
<i>C. alticola</i>	25.5	25.5	26.9	22	41.8	23.9	19.7	14.5	21.6	35.5	40.7	2.2
<i>N. crawfordi</i>	27.2	24.2	27.9	20.7	41.7	24.2	19.9	14.1	28.1	30.3	40.1	1.6
<i>M. gigas</i>	24.8	25.3	26.7	23.1	41.8	23.9	20.3	13.9	25.3	31	39.2	4.4
Promedio	25.2	25.3	26.8	22.7	41.8	24.1	20.1	14	24.7	31.8	39.6	3.8
DE*	1.2	0.8	0.9	1.3	0.3	0.3	0.3	0.3	3.4	2.8	0.8	1.6

*DE: Desviación Estándar

Cuadro 3. Frecuencia de nucleótidos (%) en las tres posiciones de los codones del gen COI de *Sorex saussurei*, *Cryptotis alticola*, *Notiosorex crawfordi* y *Megasorex gigas*.

Musarañas	Primera			Segunda			Tercera					
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
<i>S. saussurei</i>	20	24.1	24.5	31.4	41.8	28	15.6	14.7	25.4	31.1	36.7	6.8
<i>C. alticola</i>	20.1	23.9	24.4	31.6	41.8	28	15.6	14.7	28	31.6	36.1	4.3
<i>N. crawfordi</i>	20.7	23	25	31.3	40	27.5	17.8	14.7	44.5	14.2	37.4	4.1
<i>M. gigas</i>	22	21.4	26.7	30	40	27.5	17.7	14.7	33	23.9	37.1	6
Promedio	21.4	22.2	26	30.5	40.4	27.6	17.2	14.7	33.2	24.2	37	5.6
DE*	1.2	1.6	1.4	1	1.2	0.3	1.4	0	8.5	8.2	0.6	1.4

*DE: Desviación Estándar

Cuadro 4. Frecuencia promedio y uso relativo de codones sinónimos (en paréntesis) del gen *Citb* y del gen *COI* de: 1) *Sorex saussurei*, 2) *Cryptotis alticola*, 3) *Notiosorex crawfordi* y 4) *Megascorix gigas*. En los codones, la U (uracilo) equivale a la T (timina).

X ⁺	Codón	Gen <i>Citb</i>				Gen <i>COI</i>			
		1	2	3	4	1	2	3	4
F	UUU	9 (0.6)	15 (1.1)	12.7 (0.9)	8.9 (0.6)	5 (0.8)	4 (0.5)	12.3 (1.5)	8.9 (1.1)
	UUC	20 (1.4)	13 (0.9)	14.3 (1.1)	18.9 (1.4)	7 (1.2)	12 (1.5)	3.7 (0.5)	7.1 (0.9)
	UUA	13 (1.2)	16 (1.5)	18.3 (1.8)	16.4 (1.6)	6 (1.3)	7.3 (1.4)	8.7 (1.5)	11.5 (2)
	UUG	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	2.1 (0.4)
L	CUU	9 (0.9)	7 (0.7)	9 (0.9)	10.5 (1)	3 (0.7)	6 (1.1)	9 (1.6)	8.1 (1.4)
	CUC	10 (1)	17 (1.6)	15.3 (1.5)	12.6 (1.2)	5 (1.1)	6 (1.1)	6 (1.1)	4.9 (0.9)
	CUA	28 (2.7)	21.7 (2)	19 (1.8)	20.3 (2)	9 (2)	10.7 (2)	9.3 (1.6)	6.6 (1.2)
	CUG	3 (0.3)	2.3 (0.2)	0 (0)	2.8 (0.3)	4 (0.9)	2 (0.4)	0 (0)	0.8 (0.1)
I	AUU	15 (0.9)	17 (1)	24.7 (1.2)	18.3 (1)	5 (0.8)	12 (1.5)	16.3 (1.9)	11.2 (1.2)
	AUC	18 (1.1)	18 (1)	16.3 (0.8)	19.7 (1)	7 (1.2)	4 (0.5)	0.7 (0.1)	7.7 (0.8)
M	AUA	9 (1.5)	11 (1.6)	10.3 (1.7)	9.2 (1.6)	6 (1.5)	12 (1.7)	10.3 (0.7)	9.9 (1.5)
	AUG	3 (0.5)	3 (0.4)	1.7 (0.3)	2 (0.4)	2 (0.5)	2 (0.3)	1.7 (0.3)	3.1 (0.5)
V	GUU	3 (0.6)	7 (1.6)	8.3 (2.1)	5.8 (1.2)	5 (1.5)	5 (1.2)	10.7 (2.5)	5.8 (1.6)
	GUC	6 (1.2)	6 (1.3)	5.3 (1.3)	3.2 (0.7)	3 (0.9)	8 (2)	0.3 (0.1)	4.1 (1.2)
	GUA	10 (2)	5 (1.1)	2.3 (0.6)	8.8 (1.8)	4 (1.2)	3 (0.8)	6 (1.4)	4 (1.1)
	GUG	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	1.2 (0.2)	1 (0.3)	0 (0)	0 (0)	0.2 (0.1)
S	UCU	4 (0.9)	4 (0.9)	8 (1.6)	3.5 (1)	4 (2)	2 (0.9)	4 (1.7)	3 (1.4)
	UCC	6 (1.4)	5 (1.2)	6.7 (1.3)	3.8 (1)	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (0.9)	1 (0.5)
	UCA	11.7 (2.7)	13 (3)	12 (2.4)	10.8 (2.9)	6 (3)	7 (3.2)	6 (2.6)	7 (3.2)
	UCG	1.3 (0.3)	0 (0)	0 (0)	1 (0.3)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)
P	CCU	4 (0.7)	3 (0.5)	5.3 (1)	4.9 (0.9)	4 (1.1)	1 (0.2)	4.3 (1.1)	4 (1)
	CCC	6 (1)	4 (0.7)	6.3 (1.2)	7 (1.3)	4 (1.1)	5 (1.2)	4 (1)	2.3 (0.6)
	CCA	10 (1.7)	15 (2.7)	10 (1.8)	10.1 (1.8)	6 (1.7)	8.3 (2.1)	7 (1.8)	9.7 (2.4)
	CCG	3 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0.1 (0.1)	0 (0)	1.7 (0.4)	0.7 (0.2)	0 (0)
T	ACU	2 (0.4)	3 (0.5)	2 (0.4)	5.5 (1)	1 (0.3)	7 (2.2)	6 (1.5)	8.1 (1.9)
	ACC	5 (0.9)	6.3 (1.1)	3.3 (0.6)	3.3 (0.6)	4 (1.3)	3 (0.9)	2 (0.5)	2.9 (0.7)
	ACA	15 (2.7)	14 (2.4)	17.7 (3.1)	14 (2.4)	7 (2.3)	3 (0.9)	8 (2)	5.9 (1.4)
	ACG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.1 (0.1)
A	GCU	6 (1)	5 (0.8)	8 (1.6)	7.8 (1.2)	4(1)	5 (0.9)	10.3 (1.9)	9.2 (1.7)
	GCC	9 (1.4)	9.7 (1.6)	2.7 (0.5)	8 (1.2)	5(1.2)	12 (2.1)	4 (0.7)	4.8 (0.9)
	GCA	9 (1.4)	9 (1.5)	10 (1.9)	11.2 (1.7)	7(1.8)	6 (1)	7 (1.3)	6.9 (1.2)
	GCG	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.7 (0.1)	1.1 (0.2)
Y	UAU	9 (1.3)	9 (1.3)	7.7 (1.1)	5 (0.7)	1 (0.7)	3 (1.2)	6 (2)	2 (0.7)
	UAC	5 (0.7)	5 (0.7)	6.3 (0.9)	9.9 (1.3)	2 (1.3)	2 (0.8)	0 (0)	4 (1.3)
*	UAA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	UAG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

X ⁺	Codón	Gen Citb				Gen COI			
		1	2	3	4	1	2	3	4
H	CAU	3 (0.5)	2 (0.3)	2.7 (0.4)	8.3 (1.4)	1 (0.5)	2 (0.8)	4 (1.3)	3.8 (1.3)
	CAC	9 (1.5)	10 (1.7)	9.3 (1.6)	3.8 (0.6)	3 (1.5)	3 (1.2)	2 (0.7)	2.2 (0.7)
Q	CAA	6 (2)	7 (2)	6.3 (1.8)	5.9 (1.5)	2 (1.3)	5 (2)	4 (1.3)	3.9 (1.3)
	CAG	0 (0)	0 (0)	0.7 (0.2)	1.9 (0.5)	1 (0.7)	0 (0)	2 (0.7)	2.1 (0.7)
N	AAU	9 (1.1)	3 (0.4)	6.7 (0.8)	4.2 (0.5)	2 (0.6)	2 (0.4)	7.3 (1.5)	6.2 (1.2)
	AAC	7.7 (0.9)	13 (1.6)	9 (1.2)	11.8 (1.5)	5 (1.4)	7 (1.6)	2.7 (0.5)	4.2 (0.8)
K	AAA	8.7 (1.7)	8 (1.8)	10 (2)	7.5 (1.6)	1 (2)	1 (2)	2 (1.3)	2 (1.6)
	AAG	1.3 (0.3)	1 (0.2)	0 (0)	1.8 (0.4)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)	0.5 (0.4)
D	GAU	3 (0.5)	2 (0.3)	5 (0.8)	8.5 (1.4)	3 (1.2)	3 (0.9)	7.3 (1.7)	4 (0.9)
	GAC	9 (1.5)	10 (1.7)	7 (1.2)	3.3 (0.6)	2 (0.8)	4 (1.1)	1.3 (0.3)	4.5 (1.1)
E	GAA	5 (1.7)	3 (1.2)	4 (1.6)	3.8 (1.5)	3 (2)	2 (1.3)	3 (2)	1.9 (1.3)
	GAG	1 (0.3)	2 (0.8)	1 (0.4)	1.2 (0.5)	0 (0)	1 (0.7)	0 (0)	1.1 (0.7)
C	UGU	1 (0.5)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	UGC	3 (1.5)	5 (2)	2 (1)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
W	UGA	12 (2)	12 (2)	12 (2)	11 (1.8)	3 (1.2)	5 (1.7)	6 (2)	5.9 (2)
	UGG	0 (0)	0 (0)	0.3 (0.1)	1 (0.2)	2 (0.8)	1 (0.3)	0 (0)	0.1 (0.1)
R	CGU	0 (0)	1 (0.5)	0.3 (0.2)	1 (0.5)	2 (2.7)	1 (1.3)	1 (1.3)	0 (0)
	CGC	3 (1.5)	1 (0.5)	0.7 (0.3)	0 (0)	1 (1.3)	0 (0)	1 (1.3)	1 (1.3)
	CGA	5 (2.5)	6 (3)	7 (3.5)	6 (3)	0 (0)	2 (2.7)	1 (1.3)	2 (2.7)
	CGG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S	AGU	0 (0)	1 (0.2)	0.7 (0.1)	0.8 (0.2)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1.8 (0.8)
	AGC	3 (0.7)	3 (0.7)	2.7 (0.5)	2.2 (0.6)	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (0.9)	0.2 (0.1)
*	AGA	1.3 (4)	1 (4)	1 (4)	1 (3.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	AGG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
G	GGU	3 (0.5)	3 (0.5)	3.7 (0.6)	2.9 (0.5)	3 (0.8)	9 (1.6)	8 (1.3)	3.4 (0.6)
	GGC	11 (1.8)	9 (1.4)	7.7 (1.2)	6.2 (1)	5 (1.3)	3 (0.5)	2.3 (0.4)	6 (1)
	GGA	9 (1.4)	13 (2.1)	12.3 (2)	13 (2.1)	5 (1.3)	9 (1.6)	11.3 (1.9)	11.5 (1.9)
	GGG	2 (0.3)	0 (0)	1.3 (0.2)	2.9 (0.5)	2 (0.5)	1 (0.2)	2.7 (0.4)	3.5 (0.6)

X⁺: Aminoácidos

A: Alanina

R: Arginina

N: Asparagina

D: Ácido Aspártico

C: Cisteína

F: Fenilalanina

E: Ácido Glutámico

Q: Glutamina

G: Glicina

H: Histidina

*: Codón de término

I: Isoleucina

L: Leucina

K: Lisina

M: Metionina

P: Prolina

S: Serina

Y: Tirosina

T: Treonina

W: Triptófano

V: Valina

Variaciones de Nucleótidos y Aminoácidos

Los sitios de variación de nucleótidos están repartidos homogéneamente a lo largo de los genes mitocondriales analizados de las cuatro especies de musarañas. Sin embargo, en el gen *Citb*, hay una región conservada de 16 nucleótidos del sitio 329 al 344, mientras que en el gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi* hay otra región conservada de 33 nucleótidos del sitio 15 al 47. Además, las tres secuencias del gen COI de *S. saussurei* son idénticas entre sí.

Las secuencias de 1,140 pb del gen *Citb* de los ejemplares de musarañas analizados tienen 400 sitios variables, por otro lado, las de 720 pb del gen COI de las 17 *M. gigas* y tres *N. crawfordi* tienen 145, y las de 468 pb de este gen de las tres *C. alticola* y tres *S. saussurei*, 110. Entre las *M. gigas*, en el gen *Citb* hay 109 sitios variables, mientras que en el gen COI, 54 (Cuadro 5). En ambos casos, el mayor porcentaje está en la tercera posición del codón (79.8 *Citb*; 88.9 COI). Entre las 13 *M. gigas* de la población en Sierra de Manantlán, el gen COI está más conservado que el gen *Citb* ya que en el primero hay únicamente dos sitios variables, mientras que en el segundo, 17.

Cuadro 5. Número (porcentaje) de sitios variables en las tres posiciones de los 380 codones de las 1,140 pb del gen *Citb* de las cuatro especies de musarañas, de los 240 codones de las 720 pb del gen COI de las tres *Notiosorex crawfordi* y 17 *Megasorex gigas* y de los 156 codones de las 468 pb del gen COI de las tres *Cryptotis alticola*.

Musarañas	Gen <i>Citb</i>				Gen COI			
	1ª P	2ª P	3ª P	Total	1ª P	2ª P	3ª P	Total
<i>S. saussurei</i>	-	1 (33.3)	2 (66.7)	3	-	-	-	0
<i>C. alticola</i>	1 (50)	-	1 (50)	2	1 (50)	-	1 (50)	2
<i>N. crawfordi</i>	5 (12.8)	2 (5.1)	32 (82)	39	1 (6.3)	1 (6.3)	14 (87.5)	16
<i>M. gigas</i> :	14 (12.8)	8 (7.3)	87 (79.8)	109	5 (9.2)	1 (1.8)	48 (88.9)	54
Ch-C ¹	1 (25)	1 (25)	2 (50)	4	1 (25)	-	3 (75)	4
SM ²	5 (29.4)	3 (17.6)	9 (52.9)	17	-	1 (50)	1 (50)	2

P: Posición en el codón; ¹Ch-C: Chamela-Cuixmala; ²SM: Sierra de Manantlán

Las transiciones (Ti), sustitución de una purina o pirimidina por otra, son más comunes que las transversiones (Tv), una purina por una pirimidina o viceversa, en los genes mitocondriales analizados de todos los ejemplares de musarañas. Además, la relación entre ambas varía en cada una de las tres posiciones de los codones. Las 400 sustituciones en el gen *Citb*, en promedio, son 83 Ti y 52 Tv con una relación total de 1.6 y en cada posición de 3.0 en la primera, 2.9 en la segunda y 1.3 en la tercera. En cambio, las 218 sustituciones en el gen COI, en promedio, son 42 Ti y 31 Tv con una relación total de 1.4 y en cada posición de 5.9 en la primera y 1.2 en la tercera.

En las 17 *M. gigas*, de las 109 sustituciones en el gen *Citb*, 89 (67 Ti; 22 Tv) distinguen a las poblaciones analizadas, mientras que de las 54 en el gen COI, 48 (46 Ti; 2 Tv) tienen el mismo efecto (Cuadros 6 y 7). Debido a esto, ambos genes mitocondriales varían en unas cuantas sustituciones entre ejemplares dentro de cada población. Por consiguiente, la diversidad de nucleótidos (π) es baja entre las tres *M. gigas* de la población en Chamela-Cuixmala (0.004 ± 0.003 *Citb* y COI) y entre las 13 de la población en Sierra de Manantlán (0.003 ± 0.002 *Citb*; 0.002 ± 0.001 COI).

Las variaciones de aminoácidos en los genes mitocondriales analizados de todos los ejemplares de musarañas se deben a una sustitución de nucleótido en el codón diferente. En los 380 codones del gen *Citb* de las 17 *M. gigas*, las sustituciones que generan cambio de aminoácido son 19, repartidas ocho en la primera posición (4 Ti; 4 Tv), ocho en la segunda (2 Ti; 6 Tv) y tres Tv en la tercera. Además, de estos 19 cambios, 10 distinguen a las poblaciones analizadas de esta especie de musaraña (Cuadro 8). Por otro lado, en los 240 codones del gen COI de *M. gigas*, las sustituciones que generan cambio de aminoácido son tres, repartidas cada una en una posición (2 Ti; 1 Tv), y sólo un cambio distingue a las poblaciones analizadas. Éste se da en el codón 185 donde en la población en Chilpancingo de los Bravo (ChB) es GTT que codifica valina, mientras que en las poblaciones en Chamela-Cuixmala (Ch-C) y Sierra de Manantlán (SM) es ATT que codifica isoleucina.

Cuadro 7. Variaciones de nucleótidos en las 720 pb del gen COI entre las tres poblaciones analizadas de *Megasorex gigas*.

P*	Posición en el Gen COI																							
	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
5	6	7	8	8	9	3	3	3	2	4	4	7	8	9	9	0	0	2	2	4	5	6	6	
7	6	8	1	8	3	2	5	8	5	0	9	3	8	1	7	3	9	4	8	8	7	0	6	
ChB	C	G	T	T	C	C	A	A	A	C	T	A	C	C	G	C	A	A	T	C	G	G	G	A
ChC	T	A	G	C	T	C	G	A	G	T	C	G	T	T	A	T	G	C	C	C	A	A	A	A
SM	C	A	T	C	T	T	G	G	G	T	T	G	C	T	A	T	A	C	C	T	A	A	A	G

P*	Posición en el Gen COI																							
	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6
9	2	4	4	4	6	7	8	8	2	3	5	5	6	6	8	8	9	9	1	3	6	6	6	7
0	6	1	4	5	1	3	6	5	4	2	3	4	7	0	8	1	4	5	3	0	3	9	5	
ChB	C	C	T	T	T	T	C	T	G	G	C	G	T	G	T	T	T	T	G	T	T	A	T	C
ChC	T	T	C	C	T	C	C	C	A	A	T	A	C	A	C	T	T	C	A	T	C	A	T	C
SM	C	T	T	T	C	C	T	C	A	A	T	A	C	A	T	C	A	C	A	C	C	G	C	T

*P: Población

ChB: Chilpancingo de los Bravo

ChC: Chamela-Cuixmala

SM: Sierra de Manantlán

Cuadro 8. Variaciones de aminoácidos en los 380 codones del gen *Citb* y los 240 del gen COI entre las tres poblaciones analizadas de *Megasorex gigas*.

Gen	No. Codón	Población		
		Ch-C	SM	ChB
<i>Citb</i>	3	Tirosina	Tirosina	<u>Asparagina</u>
	16	Asparagina	Asparagina	<u>Treonina</u>
	212	Glutamina	Glutamina	<u>Leucina</u>
	232	Valina	Valina	<u>Isoleucina</u>
	236	Isoleucina	Isoleucina	<u>Valina</u>
	302	<u>Metionina</u>	Isoleucina	Isoleucina
	312	<u>Histidina</u>	Glutamina	Glutamina
	365	Isoleucina	Isoleucina	<u>Asparagina</u>
	366	Metionina	Metionina	<u>Lisina</u>
	374	<u>Lisina</u>	Asparagina	Asparagina
COI	185	Isoleucina	Isoleucina	<u>Valina</u>

Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán; ChB: Chilpancingo de los Bravo

En los 380 codones del gen *Citb* de las tres *N. crawfordi* hay cuatro sustituciones de nucleótidos que generan cambios de aminoácidos localizados en la primera (1 Ti; 1 Tv) y en la segunda posición (1 Ti; 1 Tv), mientras que en los correspondientes de las tres *C. alticola* y tres *S. saussurei* hay una sustitución en cada una que genera este cambio localizada en la primera posición (1 Ti) y en la tercera (1 Tv), respectivamente. En el gen COI, sólo en los 240 codones de las *N. crawfordi* hay una Ti en la segunda posición que genera cambio de aminoácido.

Haplotipos Mitocondriales

Las 17 secuencias del gen *Citb* de *M. gigas* representan 14 haplotipos ya que difieren entre sí en uno o más nucleótidos. De éstos, 12 están integrados por una sola secuencia y los otros dos, por secuencias de la población en SM; uno por: CNMA 43093 y 43098; y el otro por: CNMA 43096, 43097 y 43811. Por otro lado, las 17 secuencias del gen COI de esta especie de musaraña representan siete haplotipos. De éstos, cuatro están integrados por una

sola secuencia y los otros tres, por las 13 secuencias de la población en SM; un primero por: CNMA 43094 y 43096; un segundo por: CNMA 43092, 43093, 43095, 43098 y 43811; y un tercero por: CNMA 43089, 43090, 43091, 43097, 43812 y 43813.

La diversidad de haplotipos (H) en cada población analizada de *M. gigas* es alta. La mayor diversidad en ambos genes mitocondriales se encuentra entre los haplotipos de la población en Ch-C (1.0 ± 0.3 *Citb* y COI) debido a que todas las secuencias son diferentes. En cambio, la diversidad de haplotipos entre los de la población en SM (0.95 ± 0.05 *Citb*; 0.67 ± 0.08 COI) es menor en el gen COI que en el gen *Citb* ya que hay tres haplotipos del primero y 10 del segundo.

Las nueve secuencias del gen *Citb* de las otras tres especies de musarañas representan cada una haplotipos distintos con excepción de dos de *S. saussurei* (CNMA 43107, 43108). En cambio, las secuencias del gen COI de dos *C. alticola* (CNMA 44766, 44767) y las tres de *S. saussurei* (CNMA 43113, 43107, 43108) representan un haplotipo, mientras que las tres secuencias de *N. crawfordi* representan haplotipos distintos.

La mayoría de los ejemplares de musarañas que tienen secuencias idénticas entre sí del gen *Citb* no tienen secuencias idénticas entre sí del gen COI. Las únicas excepciones son dos *M. gigas* (CNMA 43093, 43098) y dos *S. saussurei* (CNMA 43107, 43108). A pesar de esto, es factible eliminar la posibilidad de que la similitud se deba a errores de laboratorio, como la contaminación del ADN, ya que éstos causarían que una mayor cantidad de secuencias fueran idénticas en ambos genes mitocondriales entre los mismos ejemplares (Hafner *et al.*, 2009).

Estructura Poblacional y Análisis Filogenético

Las poblaciones analizadas de *M. gigas* están genéticamente diferenciadas ya que no comparten ningún haplotipo mitocondrial encontrado. La AMOVA reveló un alto nivel de estructura genética ($\Phi_{ST} = 0.94$ *Citb*; $\Phi_{ST} = 0.956$ COI) indicando que la mayoría de la variación genética se encuentra repartida entre las poblaciones de esta especie de musaraña (94.05% , $P < 10^{-5}$ *Citb*; 95.64% , $P < 10^{-5}$ COI).

La topología de las redes de haplotipos de *M. gigas* es distinta para el gen *Citb* que para el gen COI. Sin embargo, en ambos casos se distinguen las tres poblaciones analizadas ya que los haplotipos tienen menos sustituciones o mutaciones entre sí al interior de que entre las poblaciones de esta especie de musaraña.

La mayor distancia genética obtenida entre las *M. gigas* es de 6.8% para el gen *Citb*, de 5.6% para el gen COI y de 6.4% para los genes mitocondriales combinados. Entre las tres poblaciones analizadas de esta especie de musaraña, las distancias genéticas obtenidas son más altas para el gen *Citb* (4.3–6.8%) que para el gen COI (3.1–5.6%) lo cual se debe a un mayor número de sustituciones de nucleótidos en el primero que en el segundo.

La topología de todos los árboles generados por parsimonia, probabilidad bayesiana y vecino más cercano es similar. Las 17 *M. gigas* se agrupan en un clado monofilético subdividido en tres filogrupos que corresponden a las tres poblaciones analizadas (Ch-C, SM y ChB). Las tres *N. crawfordi* se agrupan en un clado monofilético hermano al de las *M. gigas*. Las tres *C. alticola* y las tres *S. saussurei* también se agrupan en clados monofiléticos respectivos que forman parte del grupo externo. Además, el apoyo en los principales clados por bootstrap y por probabilidad posterior en todos los árboles filogenéticos generados es alto. La monofilia de *M. gigas* tiene un apoyo de bootstrap de 100 y 99 en todos los árboles de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 1.0 en todos los árboles de probabilidad bayesiana.

En todos los análisis heurísticos de parsimonia, las diferencias entre los árboles de misma longitud obtenidos estuvieron principalmente al interior del filogrupo SM de *M. gigas*. Debido a esto, se muestran en cada caso únicamente los árboles generados por consenso estricto.

Gen Citocromo *b*

Los 740 caracteres constantes de las 26 secuencias del gen *Citb* (1,140 pb) de las cuatro especies de musarañas fueron eliminados antes de llevar a cabo el análisis de parsimonia. De los 400 caracteres variables, 378 son informativos. De éstos, 76 (20.1%) se encuentran

en la primera posición, 15 (4.0%) en la segunda y 287 (75.9%) en la tercera. El análisis heurístico generó 222 árboles diferentes, todos con una longitud de 622 pasos a partir de los cuales se obtuvo el árbol consenso (Fig. 12). Este árbol tiene una longitud de 622 pasos, índice de consistencia (Ci) de 0.787, índice de homoplasia (Hi) de 0.213, índice de retención (Ri) de 0.928 e índice reescalado (Rc) de 0.737.

Los 22,500 árboles muestreados en cada una de las dos corridas del análisis de probabilidad bayesiana tienen un logaritmo natural de verosimilitud ($\ln L$) promedio de -4275.804 y de -4275.852 , respectivamente. A partir de éstos con cada corrida se generó el mismo árbol consenso (Fig. 13).

La distancia genética entre *M. gigas* y las otras especies de musarañas, en promedio de menor a mayor, es 19.8% (intervalo de 18.9–20.5%) con *N. crawfordi*, 22.8% (22.3–23.4%) con *C. alticola* y 26.3% (25.5–26.9%) con *S. saussurei* (Cuadro 9). Estos valores son mayores a los obtenidos dentro de *M. gigas* y se reflejan en la amplia longitud de las ramas entre los clados de estas especies de musarañas en el árbol de vecino más cercano (Fig. 14).

La topología del árbol de parsimonia (Fig. 12), de probabilidad bayesiana (Fig. 13) y de vecino más cercano (Fig. 14) es muy similar. En todos estos árboles, el grupo monofilético de *S. saussurei* se encuentra en la base, seguido del de *C. alticola*, después el de *N. crawfordi* y por último el de *M. gigas*.

El clado monofilético de *M. gigas* está subdividido en tres filogrupos que incluyen los mismos haplotipos en los tres árboles filogenéticos (Figs. 12–14). El filogrupo Ch-C está integrado por tres secuencias que representan haplotipos distintos ya que, en promedio, tienen 4.0 ± 2.7 sustituciones (1 Ti; 3 Tv) y 0.4% de distancia genética. El filogrupo SM está integrado por 13 secuencias que representan 10 haplotipos. En promedio, estos haplotipos tienen 3.5 ± 1.9 sustituciones (2 Ti; 1 Tv) y 0.3% de distancia genética (0.1–0.7%). Los dos filogrupos se sustentan cada uno con un apoyo de bootstrap de 100 y 99 en el árbol de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 1.0 en el bayesiano.

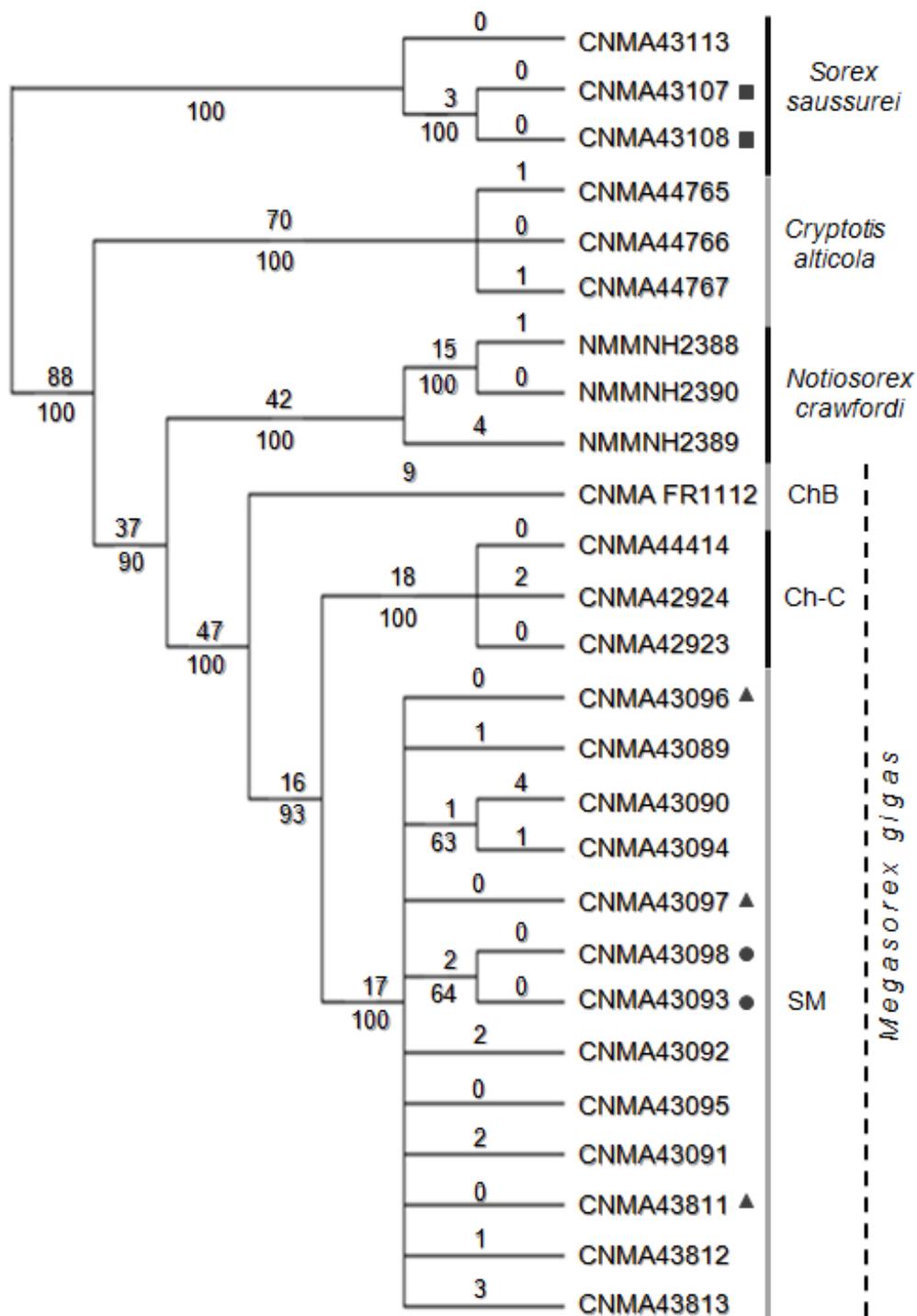


Figura 12. Árbol consenso (estricto) de parsimonia del gen *Citb* (1,140 pb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican pasos (arriba) y bootstrap de 1,000 réplicas (abajo). Los símbolos ■, ▲, ● señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

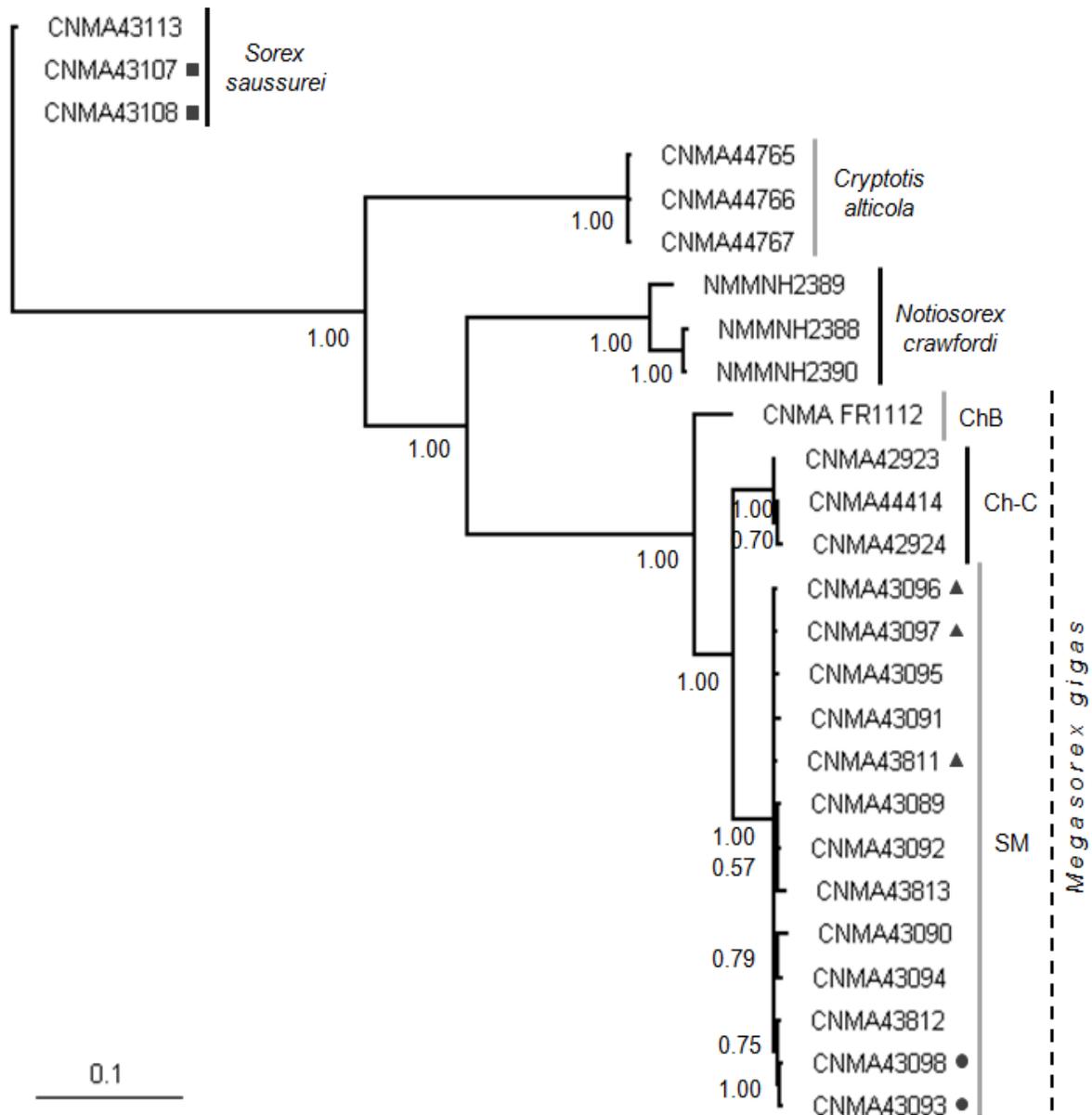


Figura 13. Árbol consenso (50% de mayoría) de probabilidad bayesiana (modelo GTR+G) del gen *Citb* (1,140 pb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican probabilidad posterior. La escala indica sustituciones/sitio. Los símbolos ■, ▲, ● señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

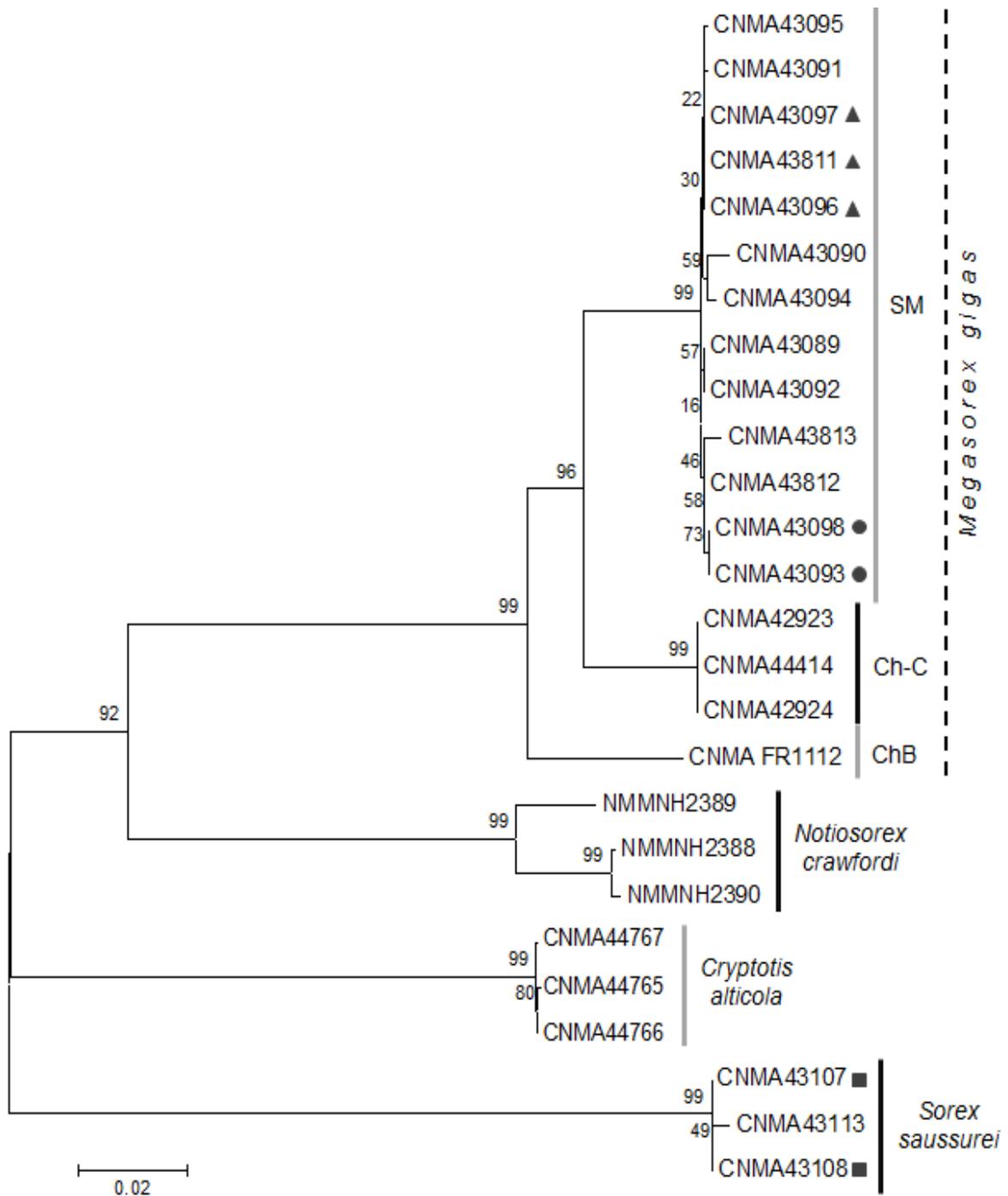


Figura 14. Árbol de vecino más cercano (modelo K2p) del gen *Citb* (1,140 pb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican bootstrap de 1,000 réplicas. La escala indica distancia genética. Los símbolos ■, ▲, ● señalan ejemplares con secuencia idéntica. SM: Sierra de Manantlán, Ch-C: Chamela-Cuixmala, ChB: Chilpancingo de los Bravo.

Cuadro 9. Distancias genéticas K2p en porcentaje (abajo de la diagonal) del gen *Citb* (1,140 pb) de *Sorex saussurei*, *Cryptotis alticola*, *Notiosorex crawfordi* y *Megasorex gigas*. Transiciones/transversiones (arriba de la diagonal) en este gen de *M. gigas*.*

	<i>S. saussurei</i>			<i>C. alticola</i>			<i>N. crawfordi</i>			<i>Megasorex gigas</i>																	
	CNMA 43113	CNMA 43107	CNMA 43108	CNMA 44765	CNMA 44766	CNMA 44767	NMMNH 2388	NMMNH 2389	NMMNH 2390	FR 1112	CNMA 44414	CNMA 42924	CNMA 42923	CNMA 43096	CNMA 43089	CNMA 43090	CNMA 43097	CNMA 43098	CNMA 43092	CNMA 43093	CNMA 43094	CNMA 43095	CNMA 43091	CNMA 43811	CNMA 43812	CNMA 43813	
<i>S. saussurei</i> (CNMA43113)	-																										
<i>S. saussurei</i> (CNMA43107)	0.3	-																									
<i>S. saussurei</i> (CNMA43108)	0.3	0	-																								
<i>C. alticola</i> (CNMA44765)	23.4	23.1	23.1	-																							
<i>C. alticola</i> (CNMA44766)	23.3	22.9	22.9	0.1	-																						
<i>C. alticola</i> (CNMA44767)	23.4	23.1	23.1	0.2	0.1	-																					
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2388)	22.7	22.4	22.4	22.3	22.5	22.6	-																				
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2389)	24.1	23.8	23.8	21.7	21.8	21.9	3.5	-																			
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2390)	22.9	22.7	22.7	22.3	22.5	22.6	0.3	3.4	-																		
<i>Megasorex gigas</i>	CNMAFR1112	25.9	25.5	25.5	22.4	22.3	22.3	20	18.9	20.1	-	49/16	50/19	49/16	49/19	49/18	51/23	49/19	51/19	50/18	51/19	52/19	50/19	51/19	49/19	50/19	50/19
	CNMA44414	26.3	25.9	25.9	23	22.9	22.9	19.9	19.3	20	6	-	1/3	1/3	38/12	38/13	38/16	38/12	40/12	38/13	40/12	41/12	39/12	39/12	38/12	39/12	41/14
	CNMA42924	26.3	25.9	25.9	23	22.9	22.9	19.9	19.3	20	6	0.4	-	1/3	40/14	40/15	40/18	40/14	42/14	39/15	42/14	43/14	41/14	40/14	40/14	41/14	43/16
	CNMA42923	26.3	25.9	25.9	23	22.9	22.9	19.9	19.3	20	6	0.4	0.4	-	38/13	38/14	38/17	38/13	40/13	39/14	40/13	41/13	39/13	40/13	38/13	39/13	41/15
	CNMA43096	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.9	19.5	20	6.2	4.3	4.3	4.3	-	0/1	4/2	0	2/0	1/1	2/0	3/0	1/0	2/0	0	1/0	3/2
	CNMA43089	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.9	19.5	20	6.1	4.4	4.4	4.4	0.1	-	2/5	0/1	2/1	1/0	2/1	3/1	1/1	2/1	0/1	1/1	3/1
	CNMA43090	26.8	26.4	26.4	23.4	23.2	23.2	20.4	20	20.5	6.8	4.7	4.7	4.7	0.5	0.6	-	2/4	4/4	3/5	4/4	3/4	3/4	4/4	2/4	3/4	5/6
	CNMA43097	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.9	19.5	20	6.2	4.3	4.3	4.3	0	0.1	0.5	-	2/0	1/1	2/0	3/0	1/0	2/0	0	1/0	3/2
	CNMA43098	26.8	26.4	26.4	22.9	22.8	22.8	19.9	19.5	20	6.4	4.5	4.5	4.5	0.2	0.3	0.7	0.2	-	3/1	0	5/0	3/0	4/0	2/0	1/0	3/2
	CNMA43092	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.9	19.5	20	6.1	4.4	4.4	4.4	0.1	0.1	0.6	0.1	0.3	-	3/1	4/1	2/1	1/1	1/1	2/1	4/1
	CNMA43093	26.8	26.4	26.4	22.9	22.8	22.8	19.9	19.5	20	6.4	4.5	4.5	4.5	0.2	0.3	0.7	0.2	0	0.3	-	5/0	3/0	4/0	2/0	1/0	3/2
	CNMA43094	26.9	26.5	26.5	23	22.9	22.9	20.1	19.8	20.2	6.5	4.6	4.6	4.6	0.3	0.4	0.6	0.3	0.4	0.4	0.4	-	4/0	5/0	3/0	4/0	6/2
	CNMA43095	26.8	26.4	26.4	22.9	22.8	22.8	20	19.7	20.1	6.3	4.4	4.4	4.4	0.1	0.2	0.6	0.1	0.3	0.2	0.3	0.4	-	3/0	1/0	2/0	4/2
	CNMA43091	26.8	26.4	26.4	22.8	22.6	22.6	20	19.7	20.1	6.3	4.4	4.4	4.4	0.1	0.2	0.6	0.1	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	-	2/0	3/0	5/2
	CNMA43811	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.9	19.5	20	6.2	4.3	4.3	4.3	0	0.1	0.5	0	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	-	1/0	3/2
	CNMA43812	26.6	26.2	26.2	22.8	22.6	22.6	19.8	19.4	19.9	6.3	4.4	4.4	4.4	0.1	0.2	0.6	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.1	-	2/2
	CNMA43813	26.7	26.4	26.4	23.1	23	23	19.9	19.5	20	6.3	4.8	4.8	4.8	0.4	0.4	1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.7	0.5	0.5	0.4	0.4	-

*: El mayor número de transiciones/transversiones entre especies de musarañas dificulta su colocación en este cuadro y no se mencionan en el texto.

Los filogrupos Ch-C y SM son grupos hermanos en los tres árboles con un apoyo de bootstrap de 96 y 93 en el de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 1.0 en el bayesiano. Los haplotipos entre estos filogrupos, en promedio, tienen 53 ± 2.1 sustituciones (39 Ti; 14 Tv) y 4.5% de distancia genética (4.3–4.8%). El clado formado por estos dos filogrupos es el grupo hermano del ChB el cual está integrado por una secuencia que representa un haplotipo distinto. En promedio, los haplotipos entre los filogrupos Ch-C y ChB tienen 66.3 ± 2.5 sustituciones (49 Ti; 17 Tv) y 6.0% de distancia genética, mientras que los haplotipos entre los filogrupos SM y ChB tienen 69.3 ± 4.7 sustituciones (50 Ti; 19 Tv) y 6.3% de distancia genética (6.1–6.8%).

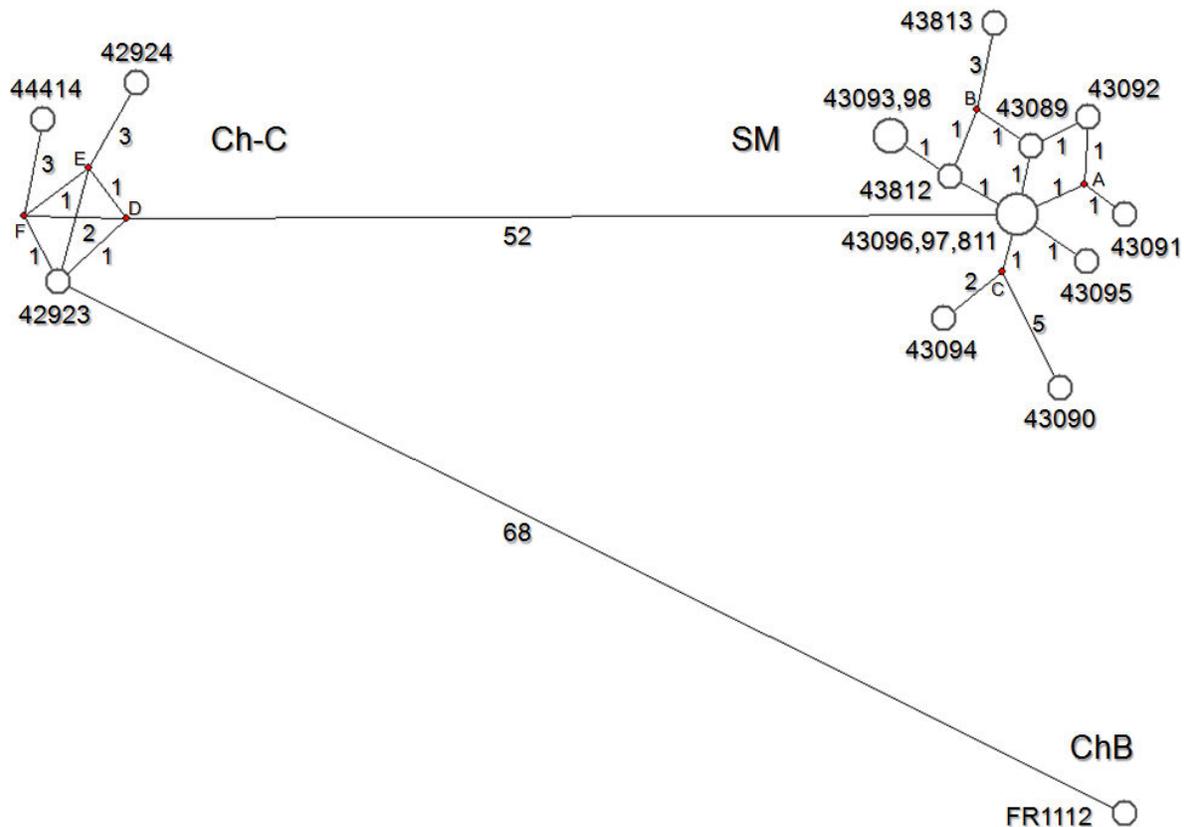


Figura 15. Red (algoritmo MJ) de 14 haplotipos del gen *Citb* (1,140 pb) de *Megalopteryx gigas*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los números en las ramas indican mutaciones. Las letras señalan vectores intermedios. SM: Sierra de Manantlán, Ch-C: Chamela-Cuixmala, ChB: Chilpancingo de los Bravo.

La red de los 14 haplotipos de *M. gigas* los reúne en tres grupos que corresponden a los filogrupos encontrados (Fig. 15). Las mutaciones que separan a la agrupación Ch-C de la SM son 52 y entre la primera y la ChB, 68. El total de mutaciones estimadas en el árbol más corto es de 147. Los vectores intermedios, tres en la agrupación Ch-C e igual número en la SM, indican posibles haplotipos faltantes.

Gen Citocromo *c* Oxidasa Subunidad I

Los 502 caracteres constantes de las 26 secuencias, 20 de 720 pb y seis de 468 pb, del gen COI de las cuatro especies de musarañas fueron eliminados antes de llevar a cabo el análisis de parsimonia. De los 218 caracteres variables, 211 son informativos. De éstos, 29 (13.7%) se encuentran en la primera posición, uno (0.5%) en la segunda y 181 (85.8%) en la tercera. El análisis heurístico generó nueve árboles diferentes, todos con una longitud de 340 pasos a partir de los cuales se obtuvo el árbol consenso (Fig. 16). Este árbol tiene una longitud de 340 pasos, Ci de 0.835, Hi de 0.165, Ri de 0.941 y Rc de 0.789.

Los 22,500 árboles muestreados en cada una de las dos corridas del análisis de probabilidad bayesiana tienen un $\ln L$ promedio de -2470.961 y de -2470.564 , respectivamente. A partir de éstos con cada corrida se generó el mismo árbol consenso (Fig. 17).

La distancia genética entre *M. gigas* y las otras especies de musarañas, en promedio de menor a mayor, es 16.3% (intervalo de 15.8–17%) con *N. crawfordi*, 20.4% (20.1–20.8%) con *C. alticola* y 21.5% (20.5–22.3%) con *S. saussurei* (Cuadro 10). Estos valores son mayores a los obtenidos dentro de *M. gigas* y se reflejan en la amplia longitud de las ramas entre los clados de estas especies de musarañas en el árbol de vecino más cercano (Fig. 18).

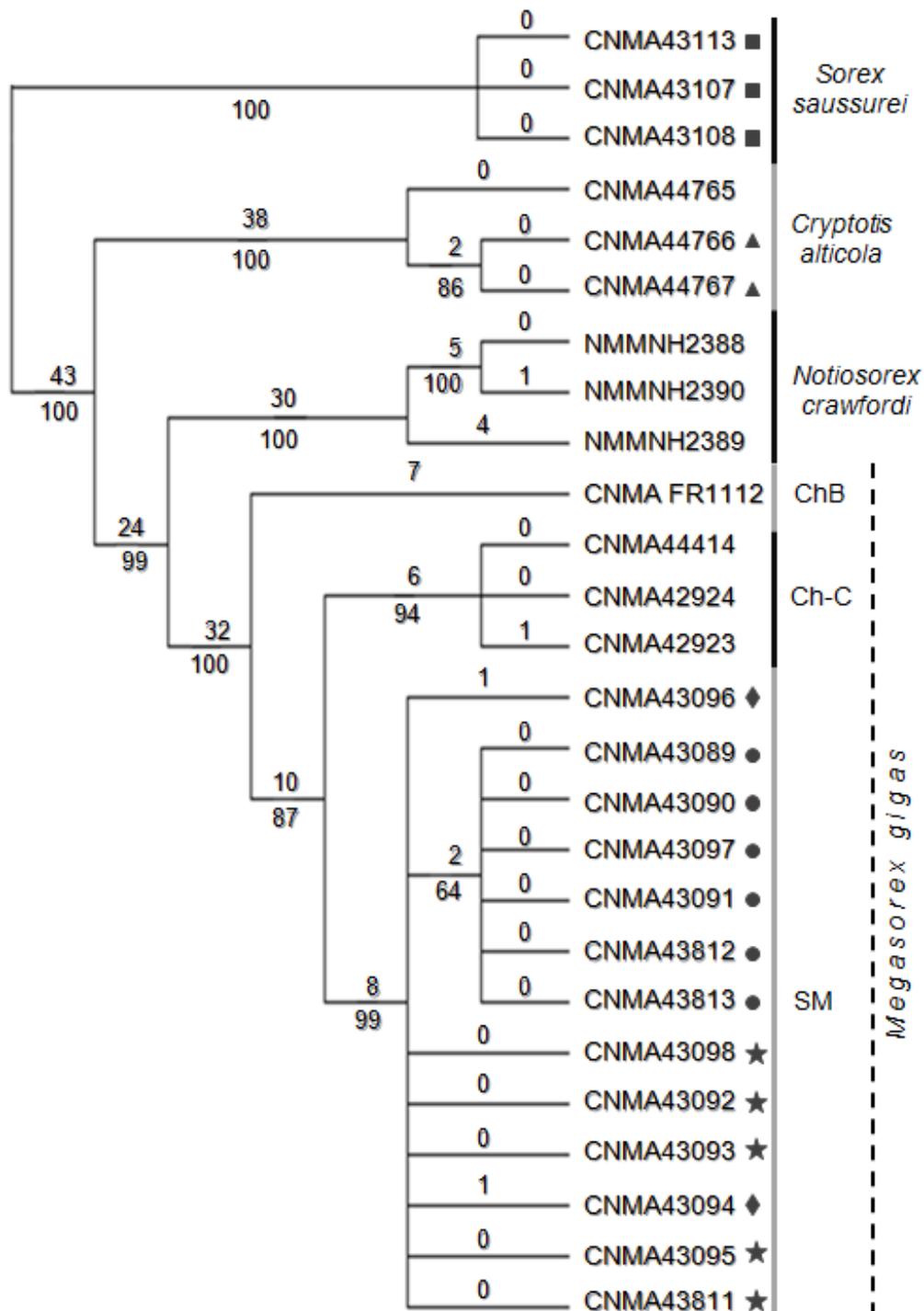


Figura 16. Árbol consenso (estricto) de parsimonia del gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi* (720 pb) y de *C. alticola* y *S. saussurei* (468 pb). Los números indican pasos (arriba) y bootstrap de 1,000 réplicas (abajo). Los símbolos ■, ▲, ◆, ●, ★ señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

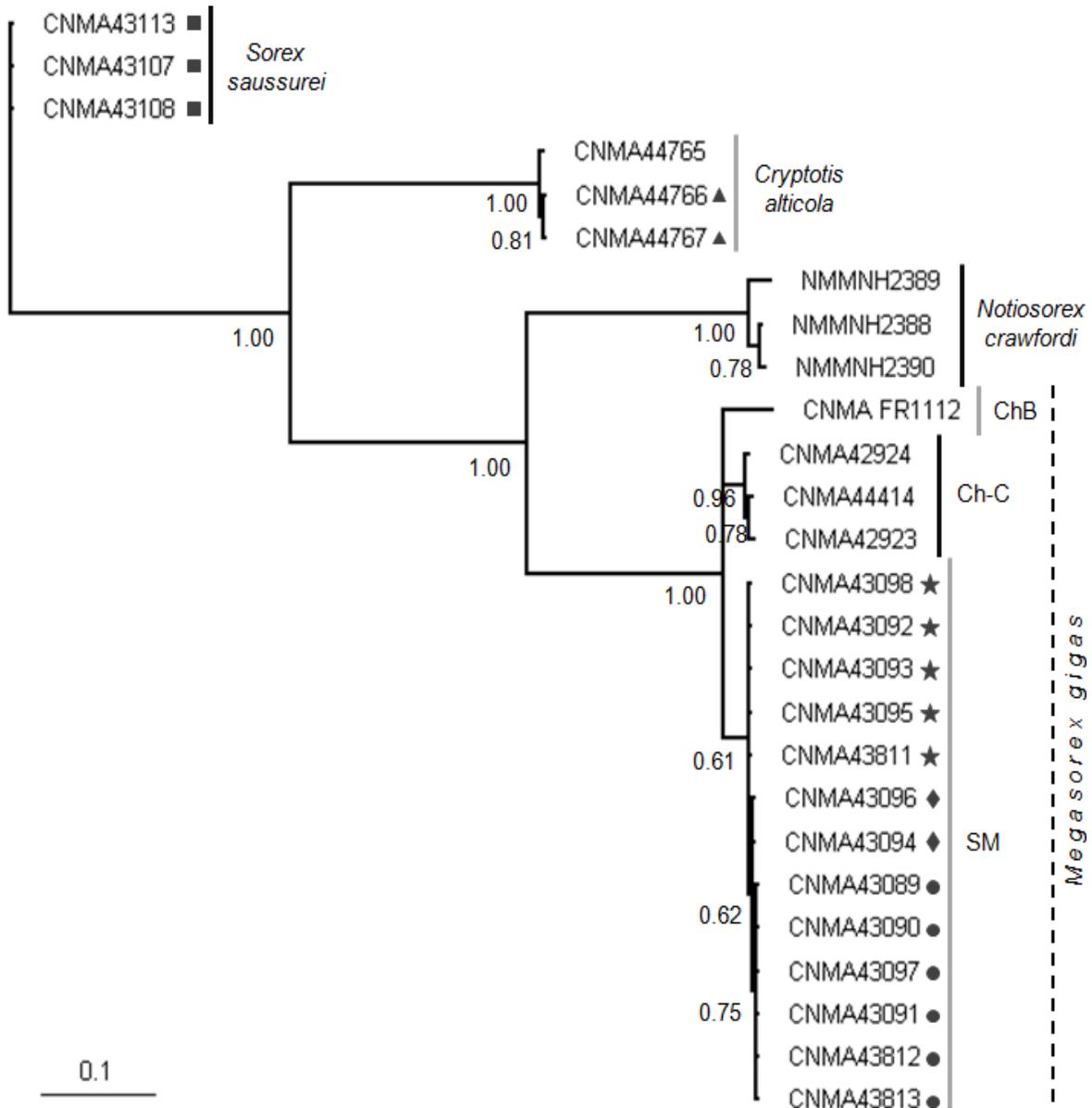


Figura 17. Árbol consenso (50% de mayoría) de probabilidad bayesiana (modelo GTR+G) del gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi* (720 pb) y de *C. alticola* y *S. saussurei* (468 pb). Los números indican probabilidad posterior. La escala indica sustituciones/sitio. Los símbolos ■, ▲, ●, ◆, ● señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

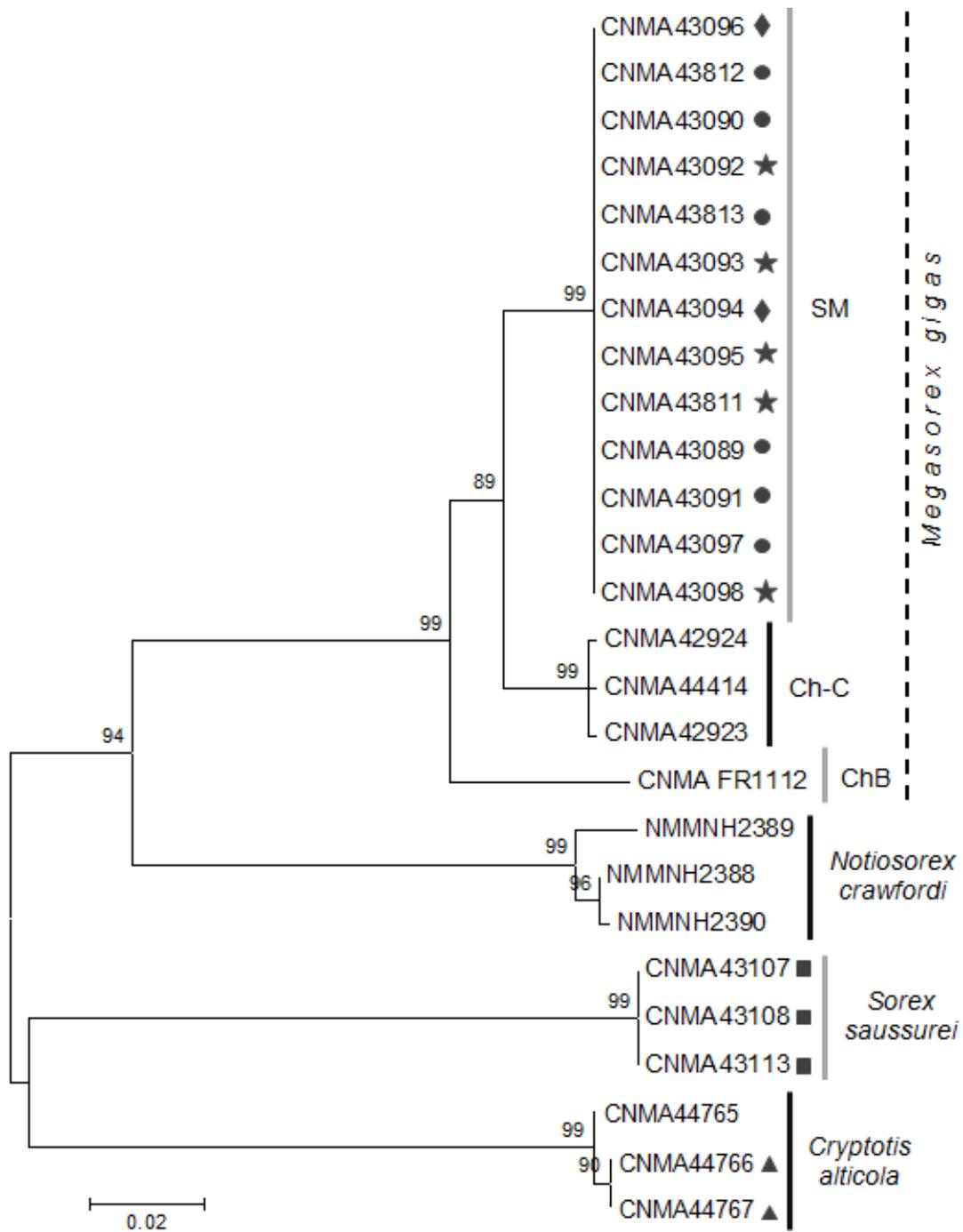


Figura 18. Árbol de vecino más cercano (modelo K2p) del gen COI de *M. gigas* y *N. crawfordi* (720 pb) y de *C. alticola* y *S. saussurei* (468 pb). Los números indican bootstrap de 1,000 réplicas. La escala indica distancia genética. Los símbolos ■, ▲, ●, ◆, ★ señalan ejemplares con secuencia idéntica. SM: Sierra de Manantlán, Ch-C: Chamela-Cuixmala, ChB: Chilpancingo de los Bravo.

Cuadro 10. Distancias genéticas K2p en porcentaje (abajo de la diagonal) del gen COI de *Megasorex gigas* y *Notiosorex crawfordi* (720 pb) y de *Cryptotis alticola* y *Sorex saussurei* (468 pb). Transiciones/transversiones (arriba de la diagonal) en este gen de *M. gigas*.*

	<i>S. saussurei</i>			<i>C. alticola</i>			<i>N. crawfordi</i>			<i>Megasorex gigas</i>																		
	CNMA 43113	CNMA 43107	CNMA 43108	CNMA 44765	CNMA 44766	CNMA 44767	NMMNH 2388	NMMNH 2389	NMMNH 2390	FR 1112	CNMA 44414	CNMA 42924	CNMA 42923	CNMA 43096	CNMA 43089	CNMA 43090	CNMA 43097	CNMA 43098	CNMA 43092	CNMA 43093	CNMA 43094	CNMA 43095	CNMA 43091	CNMA 43811	CNMA 43812	CNMA 43813		
<i>S. saussurei</i> (CNMA43113)	-																											
<i>S. saussurei</i> (CNMA43107)	0	-																										
<i>S. saussurei</i> (CNMA43108)	0	0	-																									
<i>C. alticola</i> (CNMA44765)	20.2	20.2	20.2	-																								
<i>C. alticola</i> (CNMA44766)	20.4	20.4	20.4	0.3	-																							
<i>C. alticola</i> (CNMA44767)	20.4	20.4	20.4	0.3	0	-																						
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2388)	21.4	21.4	21.4	20	20.5	20.5	-																					
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2389)	21.4	21.4	21.4	20.5	20.9	20.9	1.5	-																				
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2390)	21.7	21.7	21.7	20.3	20.7	20.7	0.2	1.6	-																			
<i>Megasorex gigas</i> CNMAFR1112	22.1	22.1	22.1	20.4	20.6	20.6	16.6	17	16.8	-	35/3	36/2	36/2	37/3	38/3	38/3	38/3	37/2	37/2	37/2	37/3	37/2	38/3	37/2	38/3	37/2	38/3	
<i>Megasorex gigas</i> CNMA44414	22.3	22.3	22.3	20.6	20.8	20.8	15.8	16.2	16	5.4	-	1/1	3/0	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3	20/3
<i>Megasorex gigas</i> CNMA42924	22.3	22.3	22.3	20.1	20.3	20.3	15.8	16.2	16	5.4	0.3	-	2/1	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2	21/2
<i>Megasorex gigas</i> CNMA42923	22.3	22.3	22.3	20.6	20.8	20.8	15.8	16.2	16	5.4	0.3	0.3	-	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3	21/3
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43096	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	-	1/0	1/0	1/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0/1	1/0	0/1	1/0	1/0	1/0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43089	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	-	0	0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/0	1/1	0	1/1	0	1/1	0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43090	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0	-	0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/0	1/1	0	1/1	0	1/1	0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43097	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0	0	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/0	1/1	0	1/1	0	1/1	0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43098	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0.2	0.2	0.2	-	0	0	0/1	0	1/1	0	1/1	0	1/1	1/1
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43092	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0	-	0	0/1	0	1/1	0	1/1	0	1/1	1/1
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43093	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0	0	-	0/1	0	1/1	0	1/1	0	1/1	1/1
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43094	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	0/1	1/0	0/1	1/0	1/0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43095	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0.1	-	1/1	0	1/1	0	1/1	1/1
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43091	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	-	1/1	0	0	0	0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43811	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0.1	0	0.2	-	1/1	0	1/1	1/1
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43812	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0	0.2	-	0	0.2	0
<i>Megasorex gigas</i> CNMA43813	20.5	20.5	20.5	20.1	20.4	20.4	16	16.8	16.2	5.6	3.1	3.1	3.1	0.1	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0	0.2	0	0.2	0	-

*: El mayor número de transiciones/transversiones entre especies de musarañas dificulta su colocación en este cuadro y no se mencionan en el texto.

La topología del árbol de parsimonia (Fig. 16), de probabilidad bayesiana (Fig. 17) y de vecino más cercano (Fig. 18) es similar. En los dos primeros árboles, el grupo monofilético de *S. saussurei* se encuentra en la base, seguido del de *C. alticola*, después el de *N. crawfordi* y por último el de *M. gigas*. El de vecino más cercano es el único árbol generado en el que los grupos monofiléticos de *S. saussurei* y *C. alticola* son hermanos agrupados en un clado el cual a su vez es el hermano del que incluye a los grupos de *N. crawfordi* y *M. gigas*.

El clado monofilético de *M. gigas* está subdividido en tres filogrupos que incluyen los mismos haplotipos en los tres árboles filogenéticos (Figs. 16–18). El de probabilidad bayesiana es el único árbol generado en donde estos tres filogrupos se encuentran en una politomía debido a que no hay suficientes diferencias entre los haplotipos que los forman para crear dicotomías.

El filogrupo Ch-C está integrado por tres secuencias que representan haplotipos distintos ya que, en promedio, tienen 2.7 ± 1.9 sustituciones (2 Ti; 1 Tv) y 0.3% de distancia genética. Este filogrupo se sustenta con un apoyo de bootstrap de 94 y 99 en el árbol de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 0.96 en el bayesiano. El filogrupo SM está integrado por 13 secuencias que representan tres haplotipos. En promedio, estos haplotipos tienen 1.0 ± 0.7 sustituciones (1 Ti; 1 Tv) y 0.1% de distancia genética. Este filogrupo se sustenta con un apoyo de bootstrap de 99 en el árbol de parsimonia y de vecino más cercano y de probabilidad posterior de 0.61 en el bayesiano.

Los filogrupos Ch-C y SM son grupos hermanos en el árbol de parsimonia y de vecino más cercano con un apoyo de bootstrap de 87 y 89, respectivamente. Los haplotipos entre estos filogrupos, en promedio, tienen 23.5 ± 0.5 sustituciones (20 Ti; 3 Tv) y 3.1% de distancia genética. El clado formado por estos dos filogrupos en estos dos árboles es el grupo hermano del ChB el cual está integrado por una secuencia que representa un haplotipo distinto. En promedio, los haplotipos entre los filogrupos Ch-C y ChB tienen 38 ± 0.1 sustituciones (35 Ti; 3 Tv) y 5.4% de distancia genética, mientras que los haplotipos

entre los filogrupos SM y ChB tienen 40 ± 1.0 sustituciones (37 Ti; 3 Tv) y 5.6% de distancia genética.

La red de los siete haplotipos de *M. gigas* los reúne en tres grupos que corresponden a los filogrupos encontrados (Fig. 19). Las tres agrupaciones se unen por uno de los cuatro vectores intermedios de la red, dos dentro de la agrupación Ch-C, que representan posibles haplotipos faltantes. Las mutaciones que separan a la agrupación ChB de las demás son 39 en cada caso, mientras que las que separan a la agrupación Ch-C de la SM son 24. El total de mutaciones estimadas en el árbol más corto es de 58.

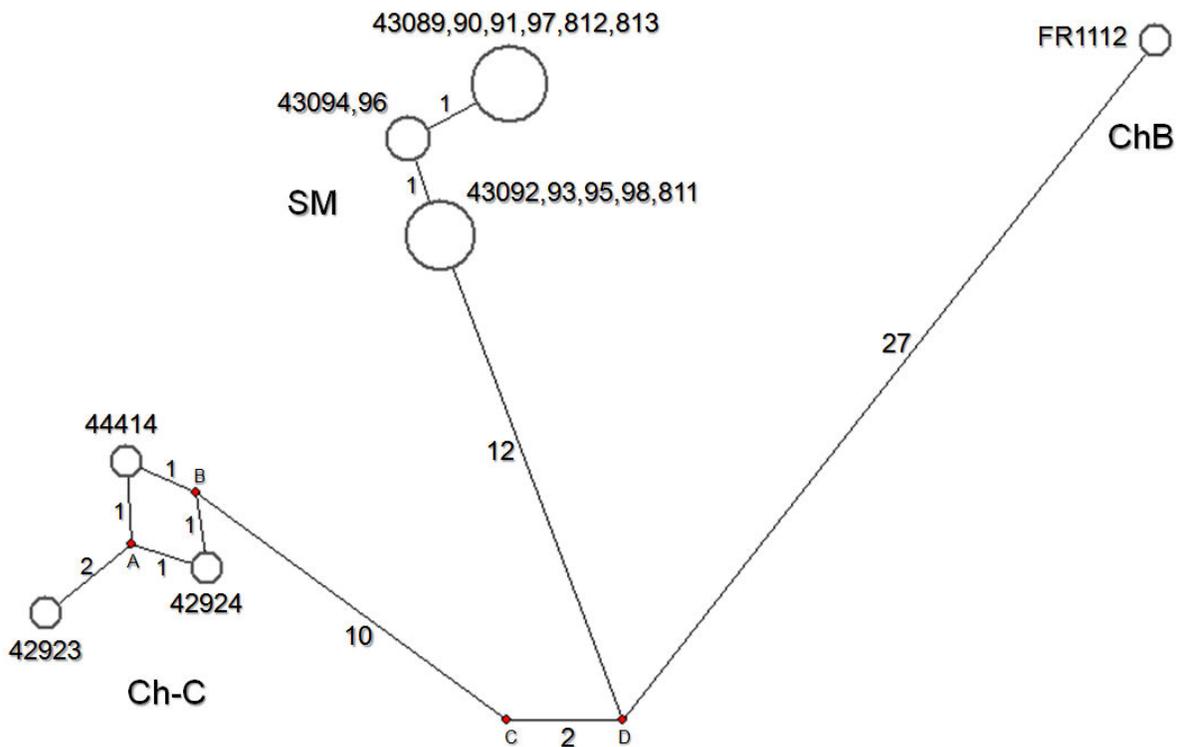


Figura 19. Red (algoritmo MJ) de siete haplotipos del gen COI (720 pb) de *Megasorex gigas*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los números en las ramas indican mutaciones. Las letras señalan vectores intermedios. ChB: Chilpancingo de los Bravo, SM: Sierra de Manantlán, Ch-C: Chamela-Cuixmala.

Gen *Citb* y Gen COI Combinados

El extremo 3' de las secuencias del gen COI se unió al extremo 5' del gen *Citb* del ejemplar de musaraña correspondiente para llevar a cabo el análisis combinado. Las secuencias combinadas del gen *Citb* y del gen COI suman un total de 1,860 pb para *M. gigas* y *N. crawfordi* y de 1,608 pb para *C. alticola* y *S. saussurei*; esto debido a la menor longitud de las secuencias del gen COI de estas dos especies de musarañas.

Los 1,242 caracteres constantes de las 26 secuencias de los genes mitocondriales combinados de las cuatro especies de musarañas fueron eliminados antes de llevar a cabo el análisis de parsimonia. De los 618 caracteres variables repartidos a lo largo de las secuencias, 589 son informativos. De éstos, 105 (17.8%) se encuentran en la primera posición, 16 (2.7%) en la segunda y 468 (79.5%) en la tercera. El análisis heurístico generó 240 árboles diferentes, todos con una longitud de 965 pasos a partir de los cuales se obtuvo un árbol consenso (Fig. 20). Este árbol tiene una longitud de 965 pasos, Ci de 0.801, Hi de 0.199, Ri de 0.931 y Rc de 0.752.

En el análisis de probabilidad bayesiana se dividió la base de datos en regiones (partitions) correspondientes a cada gen mitocondrial y cada región tuvo parámetros iniciales independientes. Los 22,500 árboles muestreados en cada una de las dos corridas del análisis tienen un $\ln L$ promedio de -6745.536 y de -6745.592 , respectivamente. A partir de éstos con cada corrida se generó el mismo árbol consenso (Fig. 21).

La distancia genética entre *M. gigas* y las otras especies de musarañas, en promedio de menor a mayor, es 18.6% (intervalo de 18.2–18.9%) con *N. crawfordi*, 21.9% (21.7–22.2%) con *C. alticola* y 24.3% (24.1–24.8%) con *S. saussurei* (Cuadro 11). Estos valores son mayores a los obtenidos dentro de *M. gigas* y se reflejan en la amplia longitud de las ramas entre los clados de estas especies de musarañas en el árbol de vecino más cercano (Fig. 22).

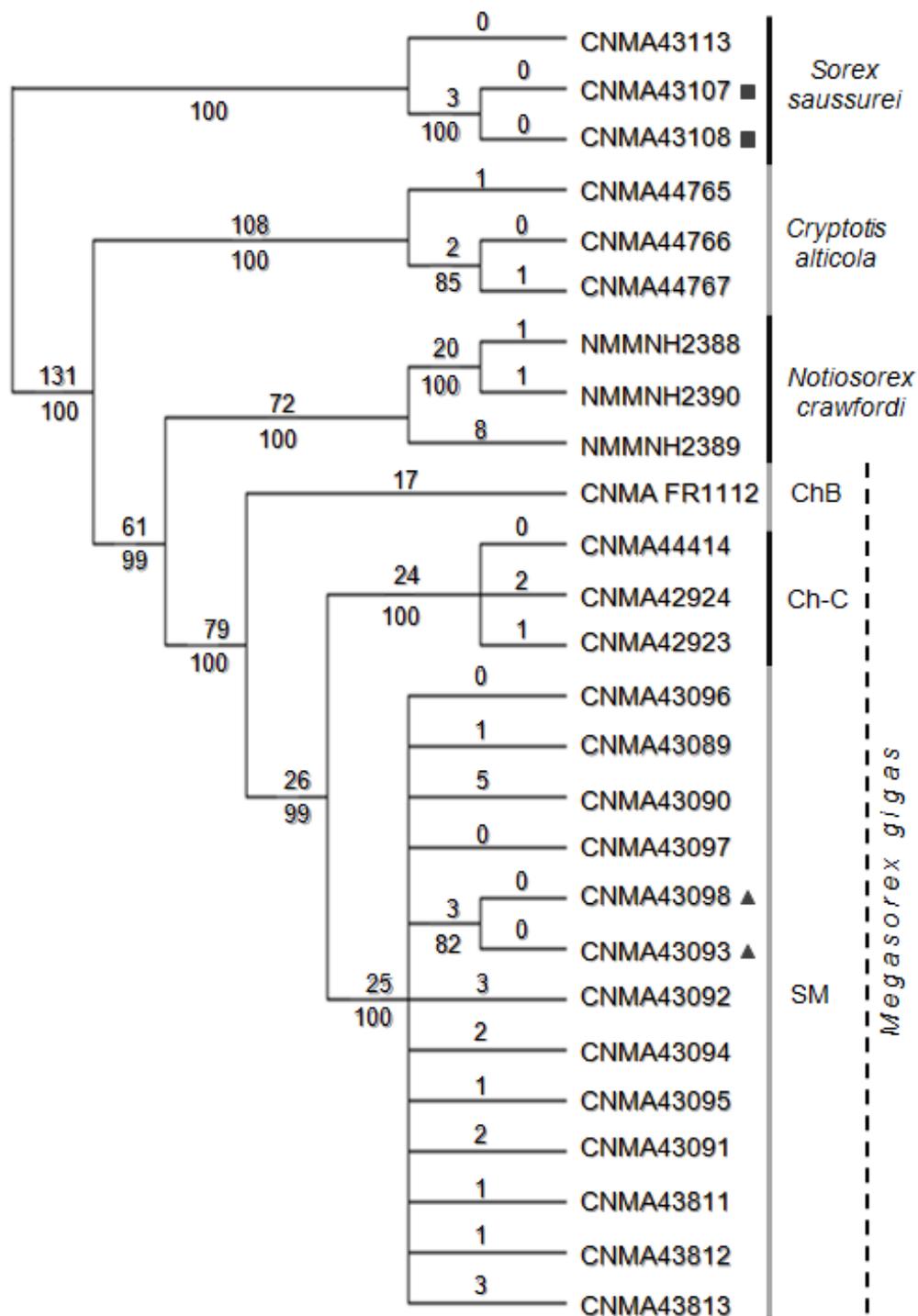


Figura 20. Árbol consenso (estricto) de parsimonia de dos genes mitocondriales (COI+Citb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican pasos (arriba) y bootstrap de 1,000 réplicas (abajo). Los símbolos ■, ▲ señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

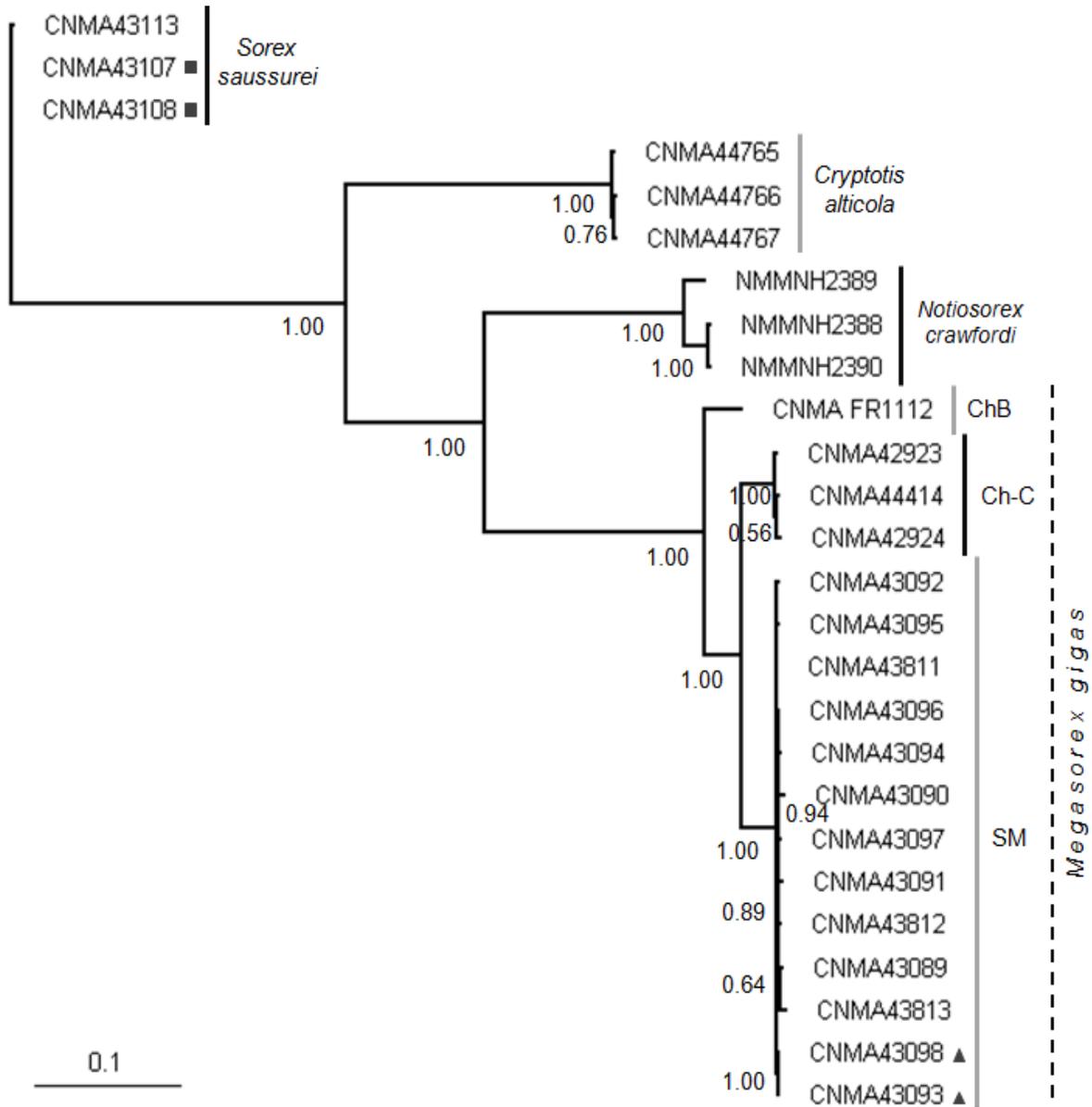


Figura 21. Árbol consenso (50% de mayoría) de probabilidad bayesiana (modelo GTR+G) de dos genes mitocondriales (COI+Citb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican probabilidad posterior. La escala indica sustituciones/sitio. Los símbolos ■, ▲ señalan ejemplares con secuencia idéntica. ChB: Chilpancingo de los Bravo, Ch-C: Chamela-Cuixmala; SM: Sierra de Manantlán.

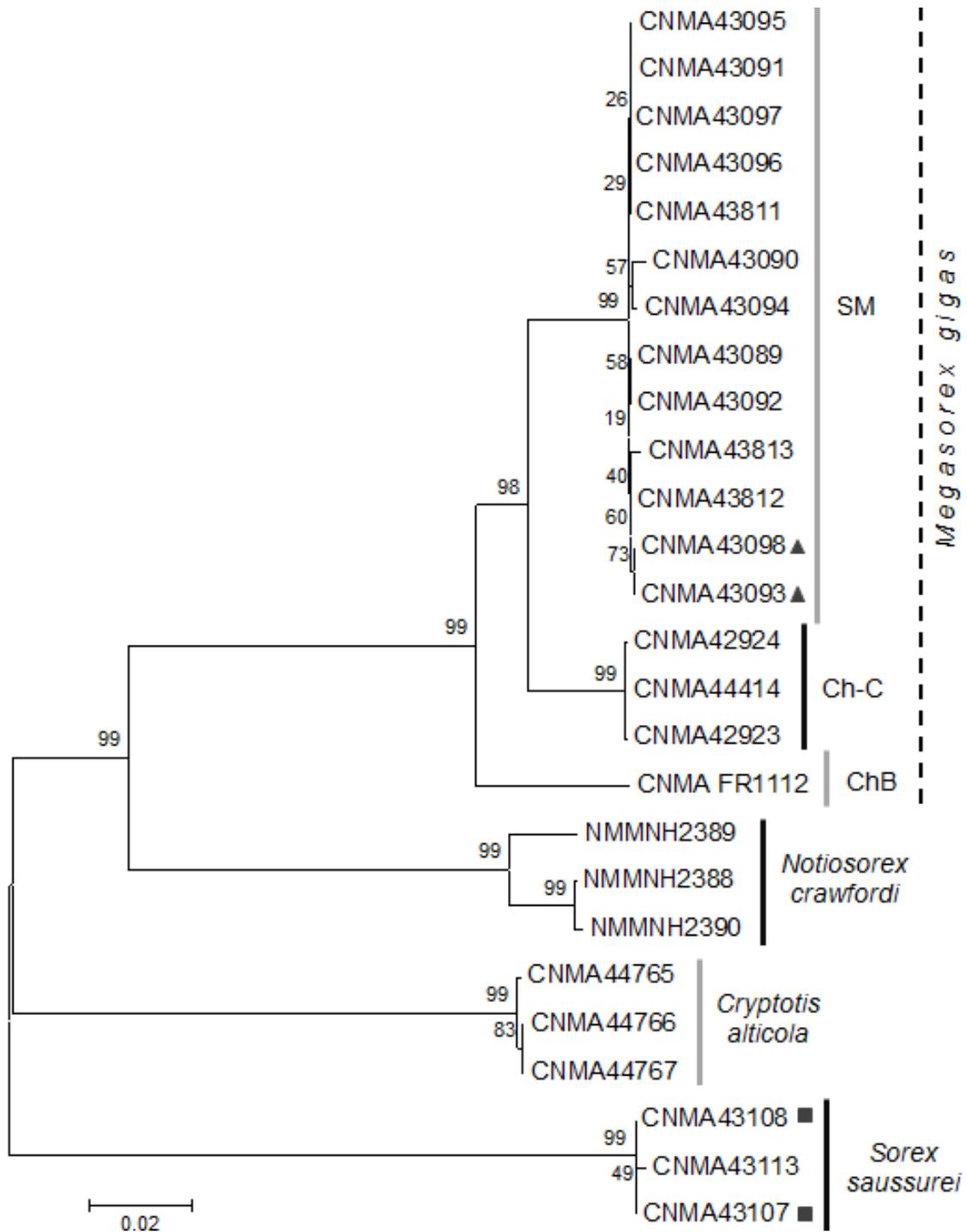


Figura 22. Árbol de vecino más cercano (modelo K2p) de dos genes mitocondriales (COI+Citb) de *S. saussurei*, *C. alticola*, *N. crawfordi* y *M. gigas*. Los números indican bootstrap de 1,000 réplicas. La escala indica distancia genética. Los símbolos ■, ▲ señalan ejemplares con secuencia idéntica. SM: Sierra de Manantlán, Ch-C: Chamela-Cuixmala, ChB: Chilpancingo de los Bravo.

Cuadro 11. Distancias genéticas K2p en porcentaje (abajo de la diagonal) de dos genes mitocondriales (COI+Citb) de *Sorex saussurei*, *Cryptotis alticola*, *Notiosorex crawfordi* y *Megasorex gigas*. Transiciones/transversiones (arriba de la diagonal) de estos genes de *M. gigas*.*

	<i>S. saussurei</i>			<i>C. alticola</i>			<i>N. crawfordi</i>			<i>Megasorex gigas</i>																		
	CNMA 43113	CNMA 43107	CNMA 43108	CNMA 44765	CNMA 44766	CNMA 44767	NMMNH 2388	NMMNH 2389	NMMNH 2390	FR 1112	CNMA 44414	CNMA 42924	CNMA 42923	CNMA 43096	CNMA 43089	CNMA 43090	CNMA 43097	CNMA 43098	CNMA 43092	CNMA 43093	CNMA 43094	CNMA 43095	CNMA 43091	CNMA 43811	CNMA 43812	CNMA 43813		
<i>S. saussurei</i> (CNMA43113)	-																											
<i>S. saussurei</i> (CNMA43107)	0.2	-																										
<i>S. saussurei</i> (CNMA43108)	0.2	0	-																									
<i>C. alticola</i> (CNMA44765)	22.3	22	22	-																								
<i>C. alticola</i> (CNMA44766)	22.3	22	22	0.2	-																							
<i>C. alticola</i> (CNMA44767)	22.4	22.1	22.1	0.2	0.1	-																						
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2388)	22.2	22.1	22.1	21.5	21.7	21.8	-																					
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2389)	23.1	23	23	21.3	21.5	21.6	2.7	-																				
<i>N. crawfordi</i> (NMMNH2390)	22.5	22.3	22.3	21.6	21.8	21.9	0.2	2.7	-																			
<i>Megasorex gigas</i>	CNMAFR1112	24.5	24.2	24.2	21.7	21.7	21.7	18.8	18.3	18.9	-	84/19	86/21	85/18	86/22	87/21	89/26	87/22	88/21	87/20	88/21	89/22	87/21	89/22	86/21	88/22	88/22	
	CNMA44414	24.8	24.6	24.6	22.1	22.1	22.1	18.4	18.2	18.6	5.8	-	2/4	4/3	58/15	58/16	58/19	58/15	60/15	58/16	60/15	61/15	59/15	59/15	58/15	59/15	61/17	
	CNMA42924	24.8	24.6	24.6	22	22	22	18.4	18.2	18.5	5.8	0.1	-	3/4	61/16	61/17	61/20	61/16	63/16	60/17	63/16	64/16	62/16	61/16	61/16	62/16	64/18	
	CNMA42923	24.8	24.6	24.6	22.1	22.1	22.1	18.4	18.2	18.6	5.8	0.2	0.3	-	59/16	59/17	59/20	59/16	61/16	60/17	61/16	62/16	60/16	61/16	59/16	60/16	62/18	
	CNMA43096	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.6	6	3.9	3.9	3.9	-	1/1	5/2	1/0	2/1	1/2	2/1	3/0	1/1	3/0	0/1	2/0	4/2	
	CNMA43089	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.6	5.9	3.9	3.9	3.9	0.1	-	2/5	0/1	3/2	2/1	3/2	4/1	2/2	2/1	1/2	1/1	3/1	
	CNMA43090	24.4	24.2	24.2	22.2	22.2	22.2	18.8	18.9	18.9	6.4	4.1	4.1	4.1	0.3	0.4	-	2/4	5/5	4/6	5/5	4/4	4/5	4/4	3/5	3/4	5/6	
	CNMA43097	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.6	6	3.9	3.9	3.9	0.1	0.1	0.3	-	3/1	2/2	3/1	4/0	2/1	2/0	1/1	1/0	3/2	
	CNMA43098	24.4	24.2	24.2	21.9	21.9	21.9	18.5	18.6	18.6	6.1	4	4	4	0.1	0.2	0.5	0.1	-	3/1	0	5/1	3/0	5/1	2/0	2/1	4/3	
	CNMA43092	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.6	5.9	3.9	3.9	3.9	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2	-	3/1	4/2	2/1	2/2	1/1	3/2	5/2	
	CNMA43093	24.4	24.2	24.2	21.9	21.9	21.9	18.5	18.6	18.6	6.1	4	4	4	0.1	0.2	0.5	0.1	0	0.2	-	5/1	3/0	5/1	2/0	2/1	4/3	
	CNMA43094	24.5	24.3	24.3	22	22	22	18.6	18.7	18.8	6.2	4.1	4.1	4.1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	-	4/1	6/0	3/1	5/0	7/2	
	CNMA43095	24.4	24.2	24.2	21.9	21.9	21.9	18.5	18.6	18.7	6.1	3.9	4	3.9	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	-	4/1	1/0	3/1	5/3
	CNMA43091	24.4	24.2	24.2	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.7	6.1	3.9	4	3.9	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	-	3/1	3/0	5/2
	CNMA43811	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.5	18.6	18.6	6	3.9	3.9	3.9	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	-	2/1	4/3	
	CNMA43812	24.4	24.1	24.1	21.8	21.8	21.8	18.4	18.5	18.5	6.1	3.9	4	3.9	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	-	2/2	
	CNMA43813	24.4	24.2	24.2	22.1	22.1	22.1	18.5	18.6	18.6	6.1	4.2	4.2	4.2	0.3	0.2	0.6	0.3	0.3	0.2	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.2	-	

*: El mayor número de transiciones/transversiones entre especies de musarañas dificulta su colocación en este cuadro y no se mencionan en el texto.

La topología del árbol de parsimonia (Fig. 20), de probabilidad bayesiana (Fig. 21) y de vecino más cercano (Fig. 22) es muy similar. En todos estos árboles, el grupo monofilético de *S. saussurei* se encuentra en la base, seguido del de *C. alticola*, después el de *N. crawfordi* y por último el de *M. gigas*.

El clado monofilético de *M. gigas* está subdividido en tres filogrupos que incluyen los mismos haplotipos en los tres árboles filogenéticos (Figs. 20–22). El filogrupo Ch-C está integrado por tres secuencias que representan haplotipos distintos ya que, en promedio, tienen 6.6 ± 4.6 sustituciones (1 Ti; 3 Tv) y 0.2% de distancia genética (0.1–0.3%). El filogrupo SM está integrado por 13 secuencias que representan 12 haplotipos. En promedio, estos haplotipos tienen 4.5 ± 2.6 sustituciones (3 Ti; 2 Tv) y 0.2% de distancia genética (0.1–0.6%). Estos dos filogrupos se sustentan cada uno con un apoyo de bootstrap de 100 y 99 en el árbol de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 1.0 en el bayesiano.

Los filogrupos Ch-C y SM son grupos hermanos en los tres árboles con un apoyo de bootstrap de 99 y 98 en el de parsimonia y de vecino más cercano, respectivamente, y de probabilidad posterior de 1.0 en el bayesiano. Los haplotipos entre estos filogrupos, en promedio, tienen 76.5 ± 2.6 sustituciones (59 Ti; 17 Tv) y 4.0% de distancia genética (3.9–4.2%). El clado formado por estos dos filogrupos es el grupo hermano del ChB el cual está integrado por una secuencia que representa un haplotipo distinto. En promedio, los haplotipos entre los filogrupos Ch-C y ChB tienen 104.3 ± 2.6 sustituciones (84 Ti; 20 Tv) y 5.8% de distancia genética, mientras que los haplotipos entre los filogrupos SM y ChB tienen 109.3 ± 5.7 sustituciones (87 Ti; 22 Tv) y 6.1% de distancia genética (5.9–6.4%).

DISCUSIÓN

La variación del ADNmt entre unidades taxonómicas o taxa de la misma especie de acuerdo a análisis filogenéticos suele ser semejante o mayor a la encontrada en otras comparaciones entre especies dentro del grupo de interés (Bradley y Baker, 2001). Esto sugiere que las distancias genéticas entre secuencias de ADNmt pueden ser usadas como una fuente de datos adicional, en conjunto con la metodología filogenética, para el establecimiento de una apropiada “medida de intervalo taxonómico” (Bradley y Baker, 2001). Además, la variación del gen *Citb* ha mostrado un alto nivel de congruencia con los límites entre especies de vertebrados basados en estudios taxonómicos clásicos (Avice y Walker, 1999; Johns y Avice, 1998), mientras que un fragmento de alrededor de 600 pb de la terminal 5' del gen COI se propuso como un código de barras base para crear un sistema microgenómico de identificación de especies animales a nivel global (Hebert *et al.*, 2003).

El gen *Citb* y el gen COI de *M. gigas* y de las otras tres especies de musarañas (*N. crawfordi*, *C. alticola*, *S. saussurei*) tienen características semejantes, como las frecuencias de nucleótidos y codones, a los de otras especies de mamíferos y vertebrados (Andrews y Easteal, 2000; Irwin *et al.*, 1991; Prusak y Grzybowski, 2004). Esto se debe a que los genes mitocondriales de los animales están conservados lo cual es útil para el estudio de las relaciones evolutivas entre las especies.

El grupo hermano de *M. gigas* es *N. crawfordi* en todos los árboles filogenéticos generados con cuatro especies de musarañas. Esto confirma, con un limitado número de especies, lo reportado en árboles del gen *Citb* de varios integrantes de la familia Soricidae (Ohdachi *et al.*, 2006). Debido a esto, la variación de este gen y del gen COI es un indicio de la relación filogenética entre estas dos especies de musarañas.

La variación genética entre *M. gigas* y *N. crawfordi* (18.9–20.5% *Citb*; 15.8–17% COI), es semejante a la variación del gen *Citb* de especies de *Sorex* (1.3–22% K2p; Fumagalli *et al.*, 1999; Johns y Avice, 1998) y de géneros de roedores y murciélagos (2.2–22% K2p; Bradley y Baker, 2001). En contraste, el promedio de esta variación (19.8% *Citb*; 16.3% COI) es mayor a la del gen COI entre especies del mismo género de mamífero pequeño (10.1% K2p; Borisenko *et al.*, 2008; 7.8% K2p; Clare *et al.*, 2006). Sin embargo,

tres especies de *Notiosorex* fueron descritas a partir de evidencias tanto morfológicas (Carraway y Timm, 2000) como genéticas (Baker *et al.*, 2003; McAliley *et al.*, 2007). Entre las últimas está la variación del gen *Citb* entre especies de *Notiosorex* (12.9–13.8%; Baker *et al.*, 2003; McAliley *et al.*, 2007) la cual es menor a la variación mitocondrial obtenida entre este género y *Megasorex*. Por lo tanto, estos resultados confirman la distinción de los dos géneros de musarañas.

El gen *Citb* y el gen COI de *M. gigas* están diferenciados entre las poblaciones analizadas de esta especie de musaraña. Cuatro métodos distintos de reconstrucción de relaciones filogenéticas, tres de árboles filogenéticos y una de redes de haplotipos, generaron el mismo resultado: la subdivisión del clado monofilético de *M. gigas* en tres filogrupos mitocondriales distintivos. Sin embargo, la mayoría de las especies de vertebrados están subdivididas en al menos un pequeño número de filogrupos mitocondriales (Avice y Walker, 1999).

Al interior de los filogrupos de *M. gigas*, la variación genética (0.1–0.7% *Citb*; 0.1–0.3% COI) es semejante a la del gen *Citb* de especies de *Notiosorex* (0.9–1.3%; Baker *et al.*, 2003; 0.1–0.4%; McAliley *et al.*, 2007) y a la del gen COI de especies de mamíferos pequeños (1.0% K2p; Borisenko *et al.*, 2008; 0.6% K2p; Clare *et al.*, 2006). En contraste, entre los filogrupos de esta especie de musaraña, la variación genética (4.3–6.8% *Citb*; 3.1–5.6% COI) es mayor al límite de 2% del gen *Citb* para especies de mamíferos y se encuentra dentro del intervalo que requiere mayor estudio a este nivel taxonómico (2–11% K2p; Bradley y Baker, 2001). Estos valores son un reflejo de la amplia diversidad genética entre los filogrupos mitocondriales de *M. gigas*. Además, la variación genética considerable entre ramas de árboles filogenéticos indica separaciones antiguas de poblaciones históricas (Avice y Walker, 1999). Por lo tanto, la variación mitocondrial entre los filogrupos de *M. gigas* sugiere la presencia de varios linajes, series de poblaciones ancestrales y descendientes a través del tiempo, de esta especie de musaraña.

Varios linajes mitocondriales de *M. gigas* son indicio de la existencia de barreras reproductivas antiguas que permiten la diferenciación genealógica profunda entre unidades poblacionales históricas (Avice y Walker, 1999). Estas barreras pueden ser tanto intrínsecas como extrínsecas y entre estas últimas están las geológicas y las climáticas. Los tres filogrupos mitocondriales encontrados de *M. gigas* se localizan cada uno en una provincia biogeográfica distinta dentro de la distribución geográfica de esta especie de musaraña endémica de México (Fig. 23).



Figura 23. Distribución geográfica de los tres filogrupos mitocondriales de *Megasorex gigas* encontrados en este estudio. Ch-C: Chamela-Cuixmala, SM: Sierra de Manantlán, ChB: Chilpancingo de los Bravo. Los números indican las localidades donde se ha colectado a esta especie de musaraña y están citados en el Apéndice I.

El filogrupo Ch-C se localiza en la cuenca del Cuitzmala en la provincia biogeográfica de la Costa del Pacífico cerca del nivel del mar, mientras que el filogrupo SM, en la provincia biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) con un intervalo de altitud de 1,240–1,361 m. El promedio de la variación genética entre éstos (4.5% *Citb*; 3.1% COI) es semejante al reportado entre filogrupos del gen *Citb* de la tuza *Pappogeomys bulleri* distribuidos en la misma zona y considerados linajes distintos (4.6% K2p; Hafner *et al.*, 2009). Por lo tanto, estos filogrupos mitocondriales de *M. gigas* representan dos linajes de esta especie de musaraña.

La variación genética entre los linajes Ch-C y SM de *M. gigas* es considerable a pesar de que la distancia geográfica que los separa es poca, de alrededor de 140 km. En esta zona se localizan la extensión sur de la FVTM y la cuenca del Armería. Estas características fisiográficas delimitan a los linajes mitocondriales de la tuza *P. bulleri* (Hafner *et al.*, 2009). Debido a esto, es probable que los cambios de elevación y las cuencas de ríos locales sean la causa de la amplia divergencia genética entre dos linajes mitocondriales de esta especie de musaraña encontrados a corta distancia uno de otro.

El filogrupo ChB se localiza en la provincia biogeográfica de la Sierra Madre del Sur (SMS) a una altitud de alrededor de 1,420 m. La variación genética entre éste y el clado Ch-C–SM (6.0–6.8% *Citb*; 5.4–5.6% COI) es mayor a la reportada entre filogrupos considerados linajes distintos de otro pequeño mamífero pariente de los conejos, la pica *Ochotona hyperborea* ($\leq 5.3\%$ *Citb*; $\leq 3.6\%$ COI; Lissovsky *et al.*, 2007). Esto a pesar de que la distancia geográfica que separa a estas agrupaciones genéticas de *M. gigas* es de alrededor de 460–600 km, mientras que esta especie de pica tiene una distribución amplia en el noreste de Asia. Sin embargo, el promedio de esta variación genética de *M. gigas* (6.2% *Citb*; 5.5% COI) es semejante al reportado entre filogrupos del gen *Citb* del ratón *Baiomys musculus* distribuidos en la misma zona (6.5% K2p; Amman y Bradley, 2004). Por lo tanto, el filogrupo ChB de *M. gigas* representa un linaje de esta especie de musaraña a pesar de la amplia variación genética obtenida.

En el área entre el linaje ChB y el clado Ch-C–SM de *M. gigas* se localiza el río Balsas y la unión de la extensión sur de la FVTM con el norte de la SMS cerca de la costa

con una altitud mayor a 600 m. Estas características fisiográficas delimitan a los linajes mitocondriales del ratón *B. musculus* (Amman y Bradley, 2004). Debido a esto, es probable que los cambios de elevación y las cuencas de ríos en el área sean la causa de la amplia divergencia genética entre linajes mitocondriales de esta especie de musaraña no sólo a nivel local sino también a lo largo de su distribución geográfica en la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas.

Los tres linajes de *M. gigas* encontrados corresponden a tres poblaciones genéticamente estructuradas resultado del poco flujo génico entre ellas. Además, patrones similares en la distribución geográfica de linajes mitocondriales con amplia divergencia genética de *M. gigas* y de otras especies de mamíferos pequeños que se dispersan poco a lo largo de su vida, como la tuza *P. bulleri* y el ratón *B. musculus*, sugieren que eventos vicariantes promovieron la diferenciación genética dentro de estas especies. Entre los eventos de este tipo más recientes que ocurrieron en México están la formación de la FVTM a finales del Mioceno y los cambios de temperatura y precipitación que provocaron la continua expansión y fragmentación del bosque tropical caducifolio durante el Pleistoceno (Ceballos, 1995; Ferrari *et al.*, 2000).

Megasorex carece de registro fósil, sin embargo, a mediados del Mioceno se originó la tribu Notiosoricini (13.8 millones de años) y los restos fósiles más antiguos de especies de *Notiosorex*, hallados en Wyoming y Arizona, Estados Unidos, datan de esa época (12 millones de años; Dubey *et al.*, 2007; Harris, 1998). En este tiempo, en el centro de México, comenzó la formación de la FVTM (~12 millones de años) la cual es un arco volcánico de 1,000 km de longitud que en el oeste llega a la costa del Pacífico y tiene una altitud promedio de 1,000–1,500 m (Ferrari *et al.*, 2000; Ferrusquía-Villafranca, 1993). La distribución geográfica de *M. gigas* en el área abarca del nivel del mar a los 1,800 m y cruza esta característica fisiográfica. Además, los linajes mitocondriales encontrados de esta especie de musaraña tienen niveles de divergencia similares a los de especies de reptiles y anfibios hallados al norte y al sur de la FVTM (Devitt, 2006; Zaldivar-Riverón *et al.*, 2004; Zarza *et al.*, 2008). Por lo tanto, es probable que la presencia de esta característica fisiográfica promueva la divergencia genética de este pequeño mamífero.

Megasorex gigas habita en áreas ribereñas con suelo húmedo, troncos, rocas y cantos rodados en el bosque tropical caducifolio de la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas. Este tipo de refugios son escasos durante los cinco a ocho meses sin lluvias de la temporada de secas en este bosque (Rzedowski, 1983). Por otro lado, la fragmentación del hábitat durante las condiciones de sequía en el Pleistoceno promovieron el aislamiento y especiación de varias especies de vertebrados pequeños que habitan en este tipo de vegetación en el país (Ceballos, 1995). Debido a esto, es probable que los cambios en las condiciones del hábitat influyan en la divergencia genética de esta especie de musaraña.

Los linajes mitocondriales de *M. gigas* podrían representar subespecies ya que están genéticamente diferenciados, por ejemplo, en la variación de nucleótidos y aminoácidos, y tienen distribución geográfica definida. En el caso de la tuza *P. bulleri*, se describieron cinco subespecies a partir de la concordancia entre sus linajes mitocondriales y nucleares (Hafner *et al.*, 2009), mientras que en el caso de *Notiosorex cockrumi*, se describió a partir de diferencias en genes mitocondriales y nucleares con *N. crawfordi* (Baker *et al.*, 2003). Una opción para definir la presencia de subespecies en *M. gigas* podría ser conocer la variación cromosómica entre linajes ya que ésta ha mostrado diferenciación considerable dentro y entre especies de musarañas de la subfamilia Soricinae (Fumagalli *et al.*, 1999).

Este estudio encontró linajes mitocondriales con divergencia genética en pequeñas porciones cercanas a los extremos de la distribución geográfica de *M. gigas*. Una limitada muestra que sólo represente los extremos de la distribución geográfica puede dar como resultado una subestimación substancial del número de los principales filogrupos y una sobreestimación de la variación genética promedio presentes en una especie (Avice y Walker, 1999; Bradley y Baker, 2001). Por lo tanto, aún falta conocer la existencia y distribución geográfica de linajes mitocondriales de *M. gigas* a lo largo de la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas, en particular, alrededor del oeste de la FVTM y el río Balsas para determinar que tan eficientes son éstos para promover la divergencia genética de esta especie de musaraña.

CONCLUSIONES

Megasorex gigas representa un género distinto y es el grupo hermano de las especies de *Notiosorex*.

Los ejemplares de *Megasorex gigas* analizados forman un grupo monofilético subdividido en tres filogrupos mitocondriales que representan tres linajes definidos geográficamente.

La variación genética entre los tres linajes mitocondriales de *M. gigas* es mayor a la reportada entre linajes de especies de mamíferos pequeños con distribución geográfica más amplia pero similar a la de aquellos y de especies de reptiles y anfibios que habitan en el bosque tropical caducifolio de la costa del Pacífico y la cuenca del Balsas.

Los cambios de elevación y las cuencas de ríos entre los linajes mitocondriales de *M. gigas* probablemente sean la causa de la amplia divergencia genética entre éstos a nivel local y a lo largo de la distribución geográfica de esta especie de musaraña.

Las características fisiográficas, como el oeste de la FVTM y el río Balsas, y las condiciones climáticas en el bosque tropical caducifolio probablemente delimitan la distribución geográfica de linajes mitocondriales y, por lo tanto, promueven la diferenciación genética de *M. gigas*.

LITERATURA CITADA

- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**: 716-723.
- AMMAN, B. R. y R. D. BRADLEY. 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for a genetic subdivision in *B. musculus*. *Journal of Mammalogy*, **85** (1): 162-166.
- ANDREWS, T. D. y S. EASTEL. 2000. Evolutionary rate acceleration of cytochrome *c* subunit I in simian primates. *Journal of Molecular Evolution*, **50**: 562-568.
- ARMSTRONG, D. M. y J. K. JONES JR. 1972. *Megasorex gigas*. *Mammalian Species*, **16**: 1-2.
- AVISE, J. C. y DE. WALKER. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**: 992-995.
- BAKER, R. J., M. B. O'NEILL y L. R. McALILEY. 2003. A new species of desert shrew, *Notiosorex*, based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, **222**: 1-12.
- BANDELT, H-J., P. FORSTER y A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 37-48.
- BORISENKO, A. V., B. K. LIM, N. V. IVANONA, R. H. HANNER y P. D. N. HEBERT. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 471-479.
- BRADLEY, R. D. y R. J. BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, **82** (4): 960-973.
- CARRAWAY, L. N. y R. M. TIMM. 2000. Revision of the extant taxa of the genus *Notiosorex* (Mammalia: Insectivora: Soricidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **113** (1): 302-318.
- CARRAWAY, L. N. 2005. Comparative osteology of the glenoid fossa and condyloid process in North American Soricinae shrews (Insectivora: Soricidae). Pp. 77-86. **In: Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa** (V. Sánchez-Cordero y R. A. Medellín, eds.). Instituto de Biología, UNAM; Instituto de Ecología, UNAM; CONABIO, México.
- CARRAWAY, L. N. 2007. Shrews (Eulpyotyphla: Soricidae) of Mexico. *Monographs of the Western North American Naturalist*, **3**: 1-91.
- CARROLL, D. S. y R. D. BRADLEY. 2005. Systematics of the genus *Sigmodon*: DNA sequences from beta-fibrinogen and cytochrome *b*. *Southwestern Naturalist*, **50** (3): 342-349.
- CEBALLOS, G. y P. RODRÍGUEZ. 1993. Diversidad y conservación de los mamíferos de México: II Patrones de endemidad. Pp. 87-108. **In: Avances en el estudio de los mamíferos de México** (R. A. Medellín y G. Ceballos, eds.). Publicaciones Especiales, Vol. 1, Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C., México.

- CEBALLOS, G. y A. GARCÍA. 1995. Conserving neotropical biodiversity: the role of dry forests in western Mexico. *Conservation Biology*, **9** (6): 1349-1353.
- CEBALLOS, G. 1995. Vertebrate diversity, ecology, and conservation in neotropical dry forests. Pp.:195-220. *In: Seasonally Dry Tropical Forests* (S. H. Bullock, H. A. Mooney y E. Medina, eds.). Prensa de la Universidad de Cambridge, Nueva York, Estados Unidos.
- CERVANTES, F. A., A. MONTIEL y A. GARCÍA. 2008. Shrews (Mammalia, Soricomorpha) from Colima Mexico. *Southwestern Naturalist*, **53** (1): 101-129.
- CLARE, E. L., B. K. LIM, M. D. ENGSTROM, J. L. EGER y P. D. N. HEBERT. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 184-190.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 1997. Provincias biogeográficas de México. Escala 1:4,000,000. México.
- DAVIS, W. B. 1957. Notes on the Mexican shrew *Megasorex gigas* (Merriam). *Southwestern Naturalist*, **2** (4): 174-175.
- DEVITT, T. J. 2006. Phylogeography of the Western Lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Neartic-Neotropical transition. *Molecular Ecology*, **15**: 4387-4407.
- DUBEY, S., N. SALAMIN, S. D. OHDACHI, P. BARRIÈRE y P. VOGEL. 2007. Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia: Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**: 126-137.
- DUCOMMUN, M. A., F. JEANMAIRE-BESANCON y P. VOGEL. 1994. Shield morphology of curly overhair in 22 genera of Soricidae (Insectivora, Mammalia). *Revue Suisse de Zoologie*, **101**: 623-643.
- EXCOFFIER, L., P. SMOUSE y J. M. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- EXCOFFIER, L. y H. E. L. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10** (3): 564-567.
- FARRIS, J. S., M. KALLERSJO, A. G. KLUGE y C. BULT. 1994. Testing the significance of incongruence. *Cladistics*, **10**: 315-320.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39** (4): 783-791.
- FERRARI, L., S. CONTICELLI, G. VAGGELLI, C. M. PETRONE y P. MANETTI. 2000. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics*, **318**: 161-185.

- FERRUSQUÍA-VILAFRANCA, I. 1993. Geology of Mexico: A synopsis. Pp. 3-107. **In:** *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa, eds.). Prensa de la Universidad de Oxford, Nueva York, Estados Unidos.
- FISHER, R. D. y M. A. BOGAN. 1977. Distributional notes on *Notiosorex* and *Megasorex* in Western Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **90** (4): 826-828.
- FUMAGALLI, L., P. TABERLET, D. T. STEWART, L. GIELLY, J. HAUSER y P. VOGEL. 1999. Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* shrews (Soricidae: Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11** (2): 222-235.
- GANNON, W. L., R. S. SKIES y EL COMITÉ DE CUIDADO Y USO ANIMAL DE LA ASM. 2007. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, **88** (3): 809-823.
- GARCÍA, A. 2006. Using ecological niche modelling to identify diversity hotspots for the herpetofauna of Pacific lowlands and adjacent interior valleys of Mexico. *Biological Conservation*, **130**: 25-46.
- GARCÍA-MORENO, J., A. G. NAVARRO-SIGÜENZA, A. T. PETERSON y L. A. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**: 186-196.
- GEORGE, S. B. 1986. Evolution and historical biogeography of soricine shrews. *Systematic Zoology*, **35** (2): 153-162.
- GOODWIN, G. G. 1969. Mammals from the state of Oaxaca, Mexico, in the American Museum of Natural History. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **141**: 1-270.
- GUINDON S. y O. GASCUEL. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, **52**: 696-704.
- HAFNER, M. S., D. J. HAFNER, J. W. DEMASTES, G. L. HASTY, J. E. LIGHT y T. A. SPRADLING. 2009. Evolutionary relationships of pocket gophers of the genus *Pappogeomys* (Rodentia: Geomyidae). *Journal of Mammalogy*, **90** (1): 45-56.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- HARRIS, A. H. 1998. Fossil history of shrews in North America. Pp. 133-156. **In:** *Evolution of shrews* (J. M. Wojcik y M. Wolsan, eds.). Instituto de Investigaciones sobre Mamíferos, Academia Polaca de Ciencia, Bialowieza, Polonia.
- HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL y J. R. DeWAARD. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **270**: 313-322.
- HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN y W. HALLWACHS. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes*

- fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 14812-14817.
- HIBBARD, C. W. 1950. Mammals of the Rexroad formation from Fox Canyon, Meade County, Kansas. *Contributions to the Museum of Paleontology, University of Michigan*, **8**: 113-192.
- HUELSENBECK, J. P. y F. RONQUIST. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17** (8): 754-755.
- HUTTERER, R. 2005. Order Soricomorpha. Pp.: 220-311. *In: Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson y D. M. Reeder, eds.). 3a Ed. Prensa del Instituto Smithsonian, Washington D. C., Estados Unidos.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2009. Cuéntame de México, Mapoteca Digital. <www.cuentame.inegi.gob.mx>
- IRWIN, D. M., T. D. KOCHER y A. C. WILSON. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, **32** (2): 128-144.
- IUCN, 2008. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2008.1. <www.iucnredlist.org>
- JOHNS, G. C. y J. C. AVISE. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular Biology and Evolution*, **15** (11): 1481-1490.
- JONES JR., J. K. 1966. Recent records of the shrew, *Megasorex gigas* (Merriam), from Western Mexico. *American Midland Naturalist*, **75** (1): 249-250.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- LISSOVSKY, A. A., N. V. IVANOVA y A. V. BORISENKO. 2007. Molecular phylogenetics and taxonomy of the subgenus pika (*Ochotona*, Lagomorpha). *Journal of Mammalogy*, **88** (5): 1195-1204.
- LÓPEZ-WILCHIS, R. 2003. Base de datos de los mamíferos de México depositados en colecciones de Estados Unidos y Canadá. Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa. <<http://investigación.izt.uam.mx/mamiferos/>>
- LUISELLI FERNÁNDEZ, C. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 - Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial*, (segunda sección), miércoles 6 de marzo.
- McALILEY, L. R., M. B. O'NEILL y R. J. BAKER. 2007. Molecular evidence for genetic subdivisions in the desert shrew, *Notiosorex crawfordi*. *Southwestern Naturalist*, **52** (3): 410 – 417.
- MEDELLÍN, R. A., G. CEBALLOS y H. ZARZA. 1998. *Spilogale pygmaea*. *Mammalian Species*, **600**: 1-3.
- MENDOZA, D., A. y G. CEBALLOS. 2005. *Megasorex gigas* (Merriam, 1897). Pp. 138-140. *In: Los mamíferos silvestres de México* (G. Ceballos y G. Oliva, coordinadores). Ciencia y Tecnología, CONABIO, Fondo de Cultura Económica, México.

- MERRIAM, C. H. 1897. Descriptions of five new shrews from Mexico, Guatemala, and Colombia. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **11**: 227-230.
- MONTIEL, A., A. R. 2006. *Registro de musarañas (Mammalia: Soricomorpha) de bosques templados de Colima, México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- MORRONE, J. J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*, **51**: 467-494.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Prensa de la Universidad de Columbia, Nueva York, Estados Unidos.
- NIKAIIDO, M., K. KAWAI, Y. CAO, M. HARADA, S. TOMITA, N. OKADA y M. HASEGAWA. 2001. Maximum likelihood analysis of the complete mitochondrial genomes of eutherians and a reevaluation of the phylogeny of bats and insectivores. *Journal of Molecular Evolution*, **53** (4-5): 508-516.
- OHDAKI, S. D., M. HASEGAWA, M.A. IWASA, P. VOGEL, T. OSHIDA, L.-K. LIN y H. ABE. 2006. Molecular phylogenetics of soricid shrews (Mammalia) based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences: with special reference to the Soricinae. *Journal of Zoology*, **270**: 177-191.
- ORR, R. T. 1963. An extension of the range of Merriam's desert shrew. *Journal of Mammalogy*, **44**: 424.
- PESOLE, G., G. DELLISANTI, G. PREPARATA y C. SACCONI. 1995. The importance of base composition in the correct assessment of genetic distance. *Journal of Molecular Evolution*, **41**: 1124-1127.
- PFUNDER, M., O. HOLZGANG y J. E. FREY. Development of microarray-based diagnostics of voles and shrews for use in biodiversity monitoring studies, and evaluation of mitochondrial cytochrome oxidase I vs. cytochrome *b* as genetic markers. *Molecular Ecology*, **13**: 1277-1286.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25** (7): 1253-1256.
- PRUSAK, B. y T. GRZYBOWSKY. 2004. Non-random base composition in codons of mitochondrial cytochrome *b* gene in vertebrates. *Acta Biochimica Polonica*, **51** (4): 897-905.
- RAMAMOORTHY, T. P., R. BYE, A. LOT y J. FA (eds.). 1993. *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*. Prensa de la Universidad de Oxford, Nueva York, Estados Unidos.
- REPENNING, C. A. 1967. Subfamilies and genera of the Soricidae. *Geological Survey Professional Paper*, **565**: iv + 1-74.
- RONQUIST, F. y J. P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19** (12): 1572-1574.
- RUBINOFF, D. y B. S. HOLLAND. 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*, **54** (6): 952-961.
- RZEDOWSKI, J. 1983. *Vegetación de México*. 3ª Ed. Limusa, México.

- SALAZAR, J. B. 1932. *Animales mexicanos, mamíferos*. Museo Nacional de Historia Natural. Imprenta Patricio Sanz, México.
- SÁNCHEZ-CORDERO, V., P. ILLOLDI-RANGEL, M. LINAJE, S. SARKAR y A. T. PETERSON. 2005. Deforestation and extant distributions of Mexican endemic mammals. *Biological Conservation*, **126**: 465-473.
- SMITH, M. F. y J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**: 149-177.
- SWOFFORD, D. L. 2001. *PAUP*4.0. Phylogenetic analyses using parsimony (*and other methods). Beta version 4.0b 10a for PC*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI y S. KUMAR. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- TAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, **17**: 57-86.
- TÉLLEZ-GIRÓN, G., A. MENDOZA-DURÁN y G. CEBALLOS. 1997. Registros notables de mamíferos del oeste de México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, **2**: 97-100.
- TOBE, S. S., A. KITCHENER y A. LINACRE. 2009. Cytochrome *b* or cytochrome *c* oxidase subunit I for mammalian species identification – An answer to the debate. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **2** (1): 306-307.
- TREJO, I. y R. DIRZO. 2000. Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation*, **94**: 133-142.
- VILLA R., B. y F. A. CERVANTES. 2003. *Los mamíferos de México*. Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V.; Instituto de Biología, UNAM, México.
- WINKELMAN, J. R. 1962. Mammal records from Guerrero and Michoacan, Mexico. *Journal of Mammalogy*, **43** (1): 108-109.
- ZALDÍVAR-RIVERÓN, A., V. LEÓN-REGAGNON y A. NIETO-MONTES DE OCA. 2004. Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**: 38-49.
- ZARZA, E., V. H. REYNOSO y B. C. EMERSON. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, **17**: 3259-3275.
- ZUNINO, M. y A. ZULLINI. 2003. *Biogeografía: la dimensión espacial de la evolución*. Fondo de Cultura Económica, México.
- ZWICKL, D. J. y M. T. HOLDER. 2004. Model parameterization, prior distributions, and the general time-reversible model in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology*, **53** (6): 877-888.

APÉNDICE I

Ejemplares de *Megasorex gigas* reportados en la literatura y depositados en colecciones científicas de México y Estados Unidos.

*: Tejidos congelados de la CNMA utilizados en este estudio. #M: Número correspondiente en los mapas de las Figs. 7–11 y 23.

No. Catálogo	Colección	Localidad	Municipio	Entidad Federativa	Fecha	Sexo	Elevación (msnm ⁺)	Referencia	# M
MR17086	MSU ¹	Mineral del Tigre, 10 km E Huajicori	Huajicori	Nayarit	16/07/ 1971	♂	409	Fisher y Bogan, 1977	1
79264	CMNH ²	5.63 km W Venustiano Carranza	Tepic	Nayarit	-	-	884	López- Wilchis, 2003	2
41954- 41955 41956- 41959	TCWC ³	5.95 km SW / 6.44 km SW Venustiano Carranza	Tepic	Nayarit	04- 05/07/ 1981	6♀	-	López- Wilchis, 2003	3
MR16102	MSU ¹	14.5 km WSW Compostela	Compostela	Nayarit	16/07/ 1970	♀	610	Fisher y Bogan, 1977	4
511264	NMNH ⁴	4.8 km N Coapan	Jala	Nayarit	31/10/ 1975	♂	1,417	Fisher y Bogan, 1977	5
98879	KUM ⁵	11.8 km ESE Amatlán de Cañas	Amatlán de Cañas	Nayarit	17/09/ 1964	♀	1,524	Jones, 1966	6
88012	NMNH ⁴	Las Milpillas	San Sebastián del Oeste	Jalisco	15/03/ 1897	♀	1,173	Merriam, 1897	7
88010- 88011	NMNH ⁴	San Sebastián del Oeste	San Sebastián del Oeste	Jalisco	14- 15/03/ 1897	♀/♂	-	López- Wilchis, 2003	8

No. Catálogo	Colección	Localidad	Municipio	Entidad Federativa	Fecha	Sexo	Elevación (msnm ⁺)	Referencia	# M
111388	KUM ⁵	6.4 km SW Puerto Vallarta	Puerto Vallarta	Jalisco	26/03/1967	♂	6	Armstrong y Jones, 1972	9
42923-42924 44414 *	CNMA ⁶	5 km SSE / 5.5 km SE Estación de Biología Chamela	La Huerta	Jalisco	04/04/2005; 01/11/2005 15/07/2006	-	29 72	-	10
-	-	Estación de Biología Chamela	La Huerta	Jalisco	- /11/1990; - /01/1992-1994	♀/ 2♂	80	Téllez-Girón <i>et al.</i> , 1997	11
13568	LACM ⁷	4.8 km NE Colima	Colima	Colima	16/10/1959	♀	-	Repenning, 1967	12
43099-43100	CNMA ⁶	6 km SE El Sauz	Minatitlán	Colima	06/02/2004	♀	1,108	Cervantes <i>et al.</i> , 2008 Montiel, 2006	13
26645	OMNH ⁸	1 km NW Ranchitos	Minatitlán	Colima	02/01/1998	-	-	-	14
TK52536	UAMI ⁹	3.4 km SE Las Canoas	Minatitlán	Colima	20/11/1996	♀	550	-	15
33815	LACM ⁷	El Mixcuate	Villa de Álvarez	Colima	16/12/1969	♀	-	López-Wilchis, 2003	16

No. Catálogo	Colección	Localidad	Municipio	Entidad Federativa	Fecha	Sexo	Elevación (msnm ⁺)	Referencia	# M
55131-55133	LACM ⁷	23.3 km N Comala	Comala	Colima	20-21/04/1975	♀/ 2♂	1,280	López-Wilchis, 2003 Ohdachi <i>et al.</i> , 2006	17
43089-43095 43811-43813 *	CNMA ⁶	Rancho La Mora, 16.7–16.8 km NNE Comala	Comala	Colima	- /12/2004 - /02/2005 20-24/06/2006	9♀/ ♂	1,240– 1,322	Cervantes <i>et al.</i> , 2008 Montiel, 2006	18
43096-43098 *	CNMA ⁶	Rancho El Guayabal, 16.5–16.6 km NNE Comala	Comala	Colima	15/11/2004; 05/12/2004	3♀	1,348- 1,361	Cervantes <i>et al.</i> , 2008 Montiel, 2006	19
29059-29060	LACM ⁷	Los Llanitos	Comala	Colima	25-27/06/1969	♀/♂	1,798	López-Wilchis, 2003	20
55074-55077 55079-55084	LACM ⁷	8.0 km NE / 11.3 km NE Cofradía de Suchitlán	Comala	Colima	07-22/08/1968	5♀/ 4♂	1,128 -	López-Wilchis, 2003	21
-	-	7 km N Cofradía de Suchitlán	Comala	Colima	-	2♀	1,460	Téllez-Girón <i>et al.</i> , 1997	22
26553	CNMA ⁶	6 km NE Aquila	Aquila	Michoacán	22/05/1977	♂	-	Carraway, 2007	23

No. Catálogo	Colección	Localidad	Municipio	Entidad Federativa	Fecha	Sexo	Elevación (msnm ⁺)	Referencia	# M
876	CNMA ⁶	Coalcomán de Vázquez Pallares	Coalcomán	Michoacán	09/08/1950	♂	1,800	Carraway, 2007	24
TK45891	UAMI ⁹	Coalcomán de Vázquez Pallares	Coalcomán	Michoacán	-	-	1,800	Carraway, 2007	25
110522-110523 110520-110521	UMMZ ¹⁰	12.1 km E / 17.7 km E Dos Aguas	Aguililla	Michoacán	23-29/07/1960; 02/08/1960	2♀/ 2♂	1,707 1,372	Winkelman, 1962	26
34380	LSUMZ ¹¹	5.3 km N Arteaga	Arteaga	Michoacán	03/05/1993	♀	900	-	27
125896	NMNH ⁴	Los Reyes de Salgado	Los Reyes	Michoacán	17/02/1903	♂	1,463	Hibbard, 1950	28
TK45530- TK45531	UAMI ⁹	2 km W Cerro Colorado	Juárez	Michoacán	-	-	1,113	Carraway, 2007	29
9064	CNMA ⁶	Texcalzintla 6 km NNW Teloloapan	Teloloapan	Guerrero	27/10/1948	♀	-	Carraway, 2007	30
12693	CNMA ⁶	13 km S Mezcala	Eduardo Neri	Guerrero	09/09/1969	-	720	-	31
12246	CAS ¹²	22.5 km S Chilpancingo de los Bravo	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	1959	♂	1,067	Orr, 1963	32

No. Catálogo	Colección	Localidad	Municipio	Entidad Federativa	Fecha	Sexo	Elevación (msnm ⁺)	Referencia	# M
99537-99538	KUM ⁵	5 km N Agua del Obispo	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	12-14/06/1964	♀/♂	991	Jones, 1966	33
5824-5827-5828-5831	TCWC ³	Acahuizotla	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	03-28/01/1957; 05-14/02/1957	6♀/2♂	853	Davis, 1957	34
5644	TCWC ³	2 km SE Acahuizotla	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	06/11/1955	♀	762	Davis, 1957	35
FR1112*	CNMA ⁶	1.7 km SE Jaleaca de Catalán	Chilpancingo de los Bravo	Guerrero	18/08/2008	♂	1,420	-	36
212190	AMNH ¹³	Llano de San Vicente	Putla Villa de Guerrero	Oaxaca	-	♀	-	Goodwin, 1969	37

⁺msnm = metros sobre el nivel del mar

¹MSU = Michigan State University

²CMNH = Carnegie Museum of Natural History

³TCWC = Texas Cooperative Wildlife Collection

⁴NMNH = United States National Museum of Natural History

⁵KUM = Kansas University Museum

⁶CNMA = Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, UNAM

⁷LACM = Los Angeles County Museum of Natural History

⁸OMNH = Oklahoma Museum of Natural History

⁹UAMI = Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

¹⁰UMMZ = University of Michigan Museum of Zoology

¹¹LSUMZ = Louisiana State University Museum of Natural Science

¹²CAS = California Academy of Science

¹³AMNH = American Museum of Natural History

APÉNDICE II

Ejemplares de *Sorex saussurei* y *Cryptotis alticola* con tejidos solicitados a la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología de la UNAM y de *Notiosorex crawfordi*, al Museo de Historia Natural y Ciencia de Nuevo México (NMMNH).

No. Catálogo	Especie	Sexo	Entidad Federativa	Sitio de Colecta	Elevación (msnm*)	Fecha de Colecta
CNMA43113	<i>Sorex saussurei</i>	♂	Colima	0.92 km NE, El Terrero, Minatitlán	2,320	21/06/2006
CNMA43107	<i>Sorex saussurei</i>	♀	Colima	0.931 km NE, El Terrero, Minatitlán	2,314	22/06/2006
CNMA43108	<i>Sorex saussurei</i>	♀	Colima	0.931 km NE, El Terrero, Minatitlán	2,314	22/06/2006
CNMA44765	<i>Cryptotis alticola</i>	♀	Edo. de México	Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan, Amecameca de Juárez	3,653	01/02/2008
CNMA44766	<i>Cryptotis alticola</i>	♂	Edo. de México	Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan, Amecameca de Juárez	3,653	01/02/2008
CNMA44767	<i>Cryptotis alticola</i>	♀	Edo. de México	Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl-Zoquiapan, Amecameca de Juárez	3,653	01/02/2008

No. Catálogo	Especie	Sexo	Entidad Federativa	Sitio de Colecta	Elevación (msnm*)	Fecha de Colecta
NMMNH2388	<i>Notiosorex crawfordi</i>	♂	Nuevo México	Refugio Nacional de Vida Silvestre del Lago Bitter, Condado de Chávez	-	04/10/1996
NMMNH2389	<i>Notiosorex crawfordi</i>	-	Nuevo México	Refugio Nacional de Vida Silvestre del Lago Bitter, Condado de Chávez	-	04/10/1996
NMMNH2390	<i>Notiosorex crawfordi</i>	-	Nuevo México	Refugio Nacional de Vida Silvestre del Lago Bitter, Condado de Chávez	-	13/10/1996

*msnm = metros sobre el nivel del mar

APÉNDICE III

Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación por PCR del gen *Citb* (1,140 pb) y del gen COI de *Megasorex gigas* y *Notiosorex crawfordi* (720 pb) y de *Cryptotis alticola* y *Sorex saussurei* (468 pb*).

Reactivo	Concentración Original	Volumen a Tomar	Concentración Final
Buffer para PCR (Invitrogen)	10x	2.5 µl	1x
MgCl ₂ (Invitrogen)	25 mM ó 50 mM	1.5 µl ó 2.5 µl	2.5 µM ó 3.0 µM
DNTP's	100 mM	0.5 µl	200 µM
Primer F	10 µM	0.25 µl	0.4 µM
Primer R	10 µM	0.25 µl	0.4 µM
Taq Polimerasa (Invitrogen)	5 U/µl	0.2 µl	1U
ADN		Necesario para 100 ng de ADN	100 ng / 25 µl
H ₂ O		Completar un volumen final de 25 µl	

*Para amplificar el fragmento de 468 pb del gen COI de las musarañas *C. alticola* se agregó 0.625 µl de BSA 100x a la mezcla de reacción manteniendo el volumen total en 25 µl.

APÉNDICE IV

Condiciones de la PCR para amplificar las 1,140 pb del gen *Citb* (columnas A y B; Carroll y Bradley, 2005; Smith y Patton, 1993) y las 720 pb (columna C; Clare *et al.*, 2007) o las 468 pb (columna D; Pfunder *et al.*, 2004) del gen COI de *Megasorex gigas* y *Notiosorex crawfordi* (A y C) y de *Cryptotis alticola* y *Sorex saussurei* (B y D).

Evento	Temperatura (°C)				Tiempo (min) s = segundos				Número de Ciclos			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Desnaturalización Inicial	95	94	94	95	1	5	1	15	1	1	1	1
1ª Desnaturalización	95	94	94	95	1	1	30 s	40 s				
1ª Alineación	50	50	50	*50	1	1	40 s	40 s	27	35	5	45
1ª Extensión	72	72	72	72	2	1	1	1				
2ª Desnaturalización	-	-	94	-	-	-	30 s	-				
2ª Alineación	-	-	55	-	-	-	40 s	-	-	-	35	-
2ª Extensión	-	-	72	-	-	-	1	-				
Extensión Final	72	72	72	72	7	5	10	7	1	1	1	1

*Temperatura original de publicación (ver Secuencias de Genes Mitocondriales en RESULTADOS para modificaciones).