



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

FILOGEOGRAFÍA DE LA MUSARAÑA *SOREX SAUSSUREI*  
(INSECTIVORA: SORICIDAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARTHA ELENA ESTEVA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ESTEVA GARCÍA MARTHA ELENA** con número de cuenta **503012283** con la tesis titulada: "**Filogeografía de la musaraña *Sorex saussurei* (Insectívora: Soricidae)**", realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA:**

Presidente:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES
Secretario:	DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA
Suplente:	DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Suplente	DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

De acuerdo con lo anterior, la alumna se acogió a la nueva normatividad, para la integración de su jurado con cinco sinodales, con base en el artículo **QUINTO TRANSITORIO**, en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 3 de mayo de 2011.

Dra. María del Coro Arriaga Arizmendi  
Coordinadora del Programa

## AGRADECIMIENTOS

Posgrado en Ciencias Biológicas de nuestra Universidad Nacional Autónoma de México.

UNAM, la mejor Universidad del país y de Iberoamérica, la máxima casa de estudios, el lugar en donde he pasado los días más felices como estudiante. Gracias.

CONACyT por otorgar la beca para estudios de posgrado con número de registro 176595 y al Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo para el desarrollo de una Estancia en la Universidad de Nuevo México en los Estados Unidos.

Miembros del Comité Tutoral y Jurado: Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga, Dr. Adrián Nieto Montes de Oca, Dra. Gloria Vázquez Domínguez, Dr. Joaquín Arroyo Cabrales, Dra. Livia Socorro León Paniagua y Dr. Fernando A. Cervantes Reza por todo el apoyo y valiosas aportaciones a este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Fernando A. Cervantes Reza por la dirección de la tesis, por sus observaciones más allá de lo evidente, por su extraordinario apoyo y confianza en todo momento. Muchas gracias Profe, por siempre tener tiempo para revisar, para comentar y discutir el trabajo, por su entusiasmo e interés.

Al Profesor Oscar J. Polaco Ramos, por todas tus enseñanzas, nunca te voy a olvidar.

A Laurita Márquez por todas sus enseñanzas y paciencia sobre todo para los que empezamos desde la nada en las técnicas moleculares, por tu ayuda en la secuenciación de las muestras, gracias por tu amistad y confianza durante todo este tiempo.

A Yolanda Hortelano y Julieta Vargas, por su ayuda en todo el trabajo de colecta y preparación de los bichos, así como en el largo proceso de incorporarlos a la colección y el catálogo; ese ya es motivo suficiente para un enorme agradecimiento, pero sobre todo por la amistad y solidaridad que siempre me han brindado tan generosamente.

Al Dr. Joseph Cook y Sara Brant por su apoyo en la obtención de muestras e infraestructura que permitió obtener secuencias fundamentales para el trabajo. Por su valiosa colaboración en la redacción del artículo.

A Rocío por tu apoyo en todos los menesteres administrativos del Posgrado, por tu buen humor, tu sonrisa y paciencia con nosotros, imposible salir con vida de este proceso sin ti.

A Noemi Matías Ferrer, por tu ayuda en la colecta de las musas, en la discusión de cualquier tema, pero lo más importante, gracias porque sé que puedo sincerarme, confiar y porque tengo la certeza de que siempre estarás conmigo. A Marthiux Solis, mi amiga de tantos años, mejor no los contamos, que me rescata siempre, que siempre tiene la solución para lo que sea, gracias por ser mi amiga.

A mis queridos compañeritos de viaje: Lazariux “el pequeño” *Megasorex*, Óscar el GPS a toda prueba, Luis (Légolas) y Helxine, a los gemelos Nahú y Salvador, por todos los viajes en busca de estos seres mitológicos, por los días y noches de trabajo en campo y en el lab, por su risa, por su compañía, por su invaluable ayuda, sin ustedes no habría sido posible capturar a las misteriosas musarañas. A Jesús Fernández, por su compañía y plática inteligente.

A Adrianiux y a Ireliá, por los buenos tiempos en el laboratorio, por los sustos, tristezas, y alegrías compartidas. Y qué decir de Kary (conocida en el bajo mundo como Lilo), nuestra pequeña gran viajera, un ejemplo de constancia y trabajo que en lo personal respeto y admiro, gracias por ayudarme con el arreglo de mis bichos, pero sobre todo por quererme. A Sandra (alias Osito), alguien que también se atrevió a salir, gracias por tu sonrisa de siempre, tu compañía, tu amistad, y por supuesto por el “piojito y el marcianito”.

A Terep, Terep, ¡ja!, por ser tan diferente y tan brutalmente crítica y sincera, pero también extraordinariamente solidaria. A Liz, por su humor negro en los momentos difíciles, siempre habrá manera de reír a mandíbula batiente aunque nos estemos hundiendo y porque jamás olvidaré que me acompañaste en tiempos de enfermedad y de enorme tristeza.

A Felisa Aguilar y Alicia Callejas, las amigas que se ven de vez en vez pero que siempre están presentes. A Gerardo Rodríguez, mi gurú de la genética, tu apoyo en el examen de candidatura fue decisivo.

A los “gringos buena onda”, al Dr. Joseph Cook: Pepe Cocinero, osea el Profe Cook, gracias por su apoyo y ayuda, gracias por el buen humor. A Sara Brant, que me permitió quedarme en su casa, me dejó cuidar a sus gatitos y lo más importante ¡me invitó una buena cerveza!.

A Anson, mi más querido gringo, mi compañerito en el lab de Nuevo México, gracias por todo lo vivido, comunicación con papelitos y pluma, elaboración de ofrendas, comidas con John Wayne etc. y aunque parezca increíble, nuestras largas conversaciones. A Dolly, Larisa y Sara por obligarme a salir del lab e

irnos de paseo. A Brittany por el té, a Fer por su apoyo y porque afortunadamente es chileno y habla español je je je.

Al Dr. Quincy: el Sr. Aurelio, mi amigo siempre. A los miembros del Lab de Arqueozoología, el laboratorio donde descubrí que quería dedicarme a buscar respuestas.

A Margarita Juárez, tu ayuda ha sido parte fundamental para lograr terminar. Y si eso fuera poco además me concedes tu amistad.

Al “Club de Tobi” del lab de genética, conformado por los Profesores Sergio, Octavio y Francisco, gracias por su paciencia y solidaridad en estos meses finales.

A los que por diferentes razones ya no veo pero que les debo mucho, incluyendo haber llegado a esta etapa. Siempre les agradeceré haber sido parte de mi vida. A Ernesto, Rosalía, Elena, Gustavo, Angélica, Donato.

A los Flor y Canto, en especial a Toño Dorantes, el último sobreviviente de los campamentos. ¡Ejem!, no puedo decir que gracias a ustedes termino este proyecto, pero sí puedo decir que nada tiene sentido, incluyendo la ciencia y el conocimiento si no es en beneficio del pueblo y de la nación. Y ustedes son lo más genuino que he vivido en la tarea de construir una patria que nos incluya a todos. A Froylán Yescas Cedillo, mi amigo y dirigente, siempre te voy a querer.

A mi familia, mis padres, mis hermanos, gracias por el ejemplo, las enseñanzas y el amor que siempre me han dado y me dan, y en particular gracias a mis más amados: Addi y Alejandro, por la felicidad de que existan, de verlos crecer y de ser mejores que nosotros.

## DEDICATORIA

A las minorías que a través de la historia han logrado las grandes transformaciones de nuestro país...

"Fui a los bosques porque quería vivir deliberadamente; enfrentar solo los hechos de la vida y ver si podía aprender lo que ella tenía que enseñar. Quise vivir profundamente y desechar todo aquello que no fuera vida...para no darme cuenta, en el momento de morir, que no había vivido" ....

Henry David Thoreau

# ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Las musarañas del género <i>Sorex</i> en América	
Capítulo I	17
Molecular phylogeny of long-tailed shrews (genus <i>Sorex</i> ) from México and Guatemala	
Capítulo II	37
Relaciones filogenéticas e inferencias filogeográficas de la musaraña <i>Sorex saussurei</i> y sus especies afines en México (Soricomorpha: Soricidae)	
Discusión Final	94

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1.- Musaraña <i>Sorex veraecrucis altoensis</i> (Fotografías Julieta Vargas)	5
Fig. 2.- Distribución de las musarañas <i>Sorex ixtlanensis</i> , <i>S. veraepacis mutabilis</i> , <i>S. mediopua</i> , <i>S. saussurei</i> , <i>S. veraepacis chiapensis</i> , <i>S. veraepacis mutabilis</i> (Carraway 2007).	6
Fig. 3 Distribución de las musarañas <i>Sorex veraecrucis altoensis</i> , <i>S. veraecrucis cristobalensis</i> , <i>S. veraecrucis oaxacae</i> , <i>S. veraecrucis veraecrucis</i> y <i>S. saussurei</i> (Carraway 2007).	7
Fig. 4.- Distribución de las musarañas <i>S. oreopolus</i> y <i>S. orizabae</i> (Carraway 2007).	8
Fig. 5.- Distribución de las musarañas <i>Sorex arizonae</i> , <i>S. emarginatus</i> , <i>S. macrodon</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. monticolus</i> , <i>S. ornatus juncensis</i> , <i>S. ornatus lagunae</i> , <i>S. ornatus ornatus</i> , <i>S. sclateri</i> , <i>S. stizodon</i> y <i>S. ventralis</i> (Carraway 2007).	9
Fig. 6.- Topología esperada de las relaciones de parentesco entre muestras de <i>S. veraecrucis</i> , <i>S. saussurei</i> y <i>S. veraepacis</i> con base en análisis de ADN mitocondrial.	44
Fig. 7.- Topología esperada de las relaciones de parentesco entre las poblaciones de <i>S. veraecrucis</i> , <i>S. orizabae</i> y <i>S. saussurei</i> con base en análisis de ADN mitocondrial.	45
Fig. 8.- Localidades que se consideraron para la obtención de ejemplares de <i>Sorex veraecrucis veraecrucis</i> , <i>S. v. oaxacae</i> , <i>S. v. cristobalensis</i> , <i>S. v. altoensis</i> , <i>S. saussurei</i> , <i>S. orizabae</i> .	48
Fig. 9.- Árbol de máxima parsimonia de las musarañas del género <i>Sorex</i> con distribución en México con los valores de bootstrap, 1000 réplicas.	59
Fig. 10.- Árbol de máxima verosimilitud de las musarañas del género <i>Sorex</i> con distribución en México con los valores de bootstrap, 1000 réplicas.	60
Fig. 11.- Árbol bayesiano de de las musarañas del género <i>Sorex</i> con distribución en México, 10,000,000 de generaciones con los valores de probabilidad posterior.	61

	Página
Fig. 12.- Clado A, análisis bayesiano de las especies de musarañas mexicanas del género <i>Sorex</i> . * Ejemplares examinados por Carraway (2007).	62
Fig. 13.- Clado B, análisis bayesiano de las especies de musarañas mexicanas del género <i>Sorex</i> . * Ejemplares examinados por Carraway (2007).	63
Fig. 14.- Cronograma con los tiempos de divergencia a partir de r8s (1.7; Sanderson 2003). Los números indican los millones de años.	66
Fig. 15.- Ubicación de las muestras de las musarañas <i>Sorex v. veraecrucis</i> , <i>S. v. oaxacae</i> y <i>S. ixtlanensis</i> en el estado de Oaxaca (Conabio 2003).	70

#### LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Cambios en la nomenclatura de las especies del género <i>Sorex</i> como resultado del estudio de Carraway (2007).	10
Cuadro 2.- Distancias genéticas entre musarañas de la misma especie y de la misma localidad, en comparación con las distancias genéticas entre distintos géneros.	53
Cuadro 3.- Distancias genéticas entre las especies cuyas localidades pertenecen al Eje Neovolcánico Transversal.	55
Cuadro 4.- Distancias genéticas entre las muestras de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal.	56
Cuadro 5.- Distancias genéticas entre las muestras cuyas localidades pertenecen al estado de Oaxaca.	57

## “Filogeografía de la musaraña *Sorex saussurei* (Insectivora: Soricidae)”

### RESUMEN

Las musarañas son mamíferos pequeños del Orden Soricomorpha, se distribuyen ampliamente en todo el mundo con excepción de los polos, Australia y el sur de Sudamérica. En México hay una gran diversidad de especies que sin embargo, han sido muy poco estudiadas. El género *Sorex* con 16 especies se distribuye en gran parte del territorio. La musaraña *Sorex saussurei* era hasta hace algunos años la especie con más amplia distribución en el país, un rearrreglo taxonómico que renombró y reagrupó los diferentes morfotipos tuvo como resultado que ahora *Sorex veraecrucis* sea la especie con más amplia distribución. Sin embargo, por su morfología y distribución es evidente que son varias las especies que están muy relacionadas: *S. veraecrucis*: *S. orizabae*, *S. saussurei*, *S. veraepacis*, *S. ixtlanensis*. El trabajo que se desarrolló consistió en establecer a través del análisis de secuencias del gen mitocondrial citocromo *b*, las relaciones filogenéticas entre la mayor cantidad posible de especies mexicanas del género *Sorex* y su relación con el resto de las especies del continente Americano. Un segundo objetivo fue establecer las relaciones filogeográficas entre las poblaciones de *S. veraecrucis* y entre *S. veraecrucis* y las especies más cercanas. Los resultados permitieron identificar dos clados principales dentro del subgénero *Otisorrex*, las cuales aparentemente son el resultado de una primera diversificación dentro de las musarañas soricini de Norteamérica. El primero incluye la mayoría de las especies de *Otisorrex* más cercanas al Estrecho de Bering y el segundo incluye a *S. trowbridgii* y las especies mexicanas y de Guatemala que marcan los límites sureños del subgénero *Otisorrex*. Nuestro estudio permitió ubicar las relaciones filogenéticas de una gran parte de las especies mexicanas y evidenciar el carácter polifilético de *S. veraecrucis* y su relación muy cercana con *S. ixtlanensis*, *S. orizabae* y *S. saussurei*, así como el carácter polifilético de *S. emarginatus*. Los datos aportados por la estructura filogenética se vieron reforzados por la información de las distancias genéticas. A partir de la realización de cálculos de reloj molecular pudimos mostrar que los eventos de diversificación de estas especies en México comenzaron en el Mioceno pero que tuvieron su punto máximo durante el Plioceno y Pleistoceno, que estos eventos están directamente relacionados con la topografía del territorio, el origen de las distintas cadenas montañosas (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Eje

Neovolcánico Transversal, Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca y la Sierra Madre de Chiapas) y el papel que como barrera geográfica representa el Istmo de Tehuantepec. Nuestros resultados nos permiten sugerir que las poblaciones que colonizan el territorio en un primer arribo logran cruzar el Istmo de Tehuantepec y que posteriormente en una segunda invasión las poblaciones de *Sorex* ya no son capaces de atravesarlo.

## Phylogeography of the shrew *Sorex saussurei* (Insectivora: Soricidae)

### ABSTRACT

Shrews are small mammals belonging to the Order Soricomorpha Order, and are found all over the world except in polar zones, Australia, and southern South America. A high number of shrew species occur in Mexico, yet the biology of these mammals is poorly known. The genus *Sorex* includes 16 species within Mexico and is widely distributed. Recent taxonomic work split *Sorex saussurei*, a relatively common shrew species, in several highly related taxa resulting *S. veraecrucis* a widely distributed taxon. In this study, therefore, we used the cytochrome *b* gene sequences to assess the phylogenetic relationships between Mexican *Sorex* shrews and with the rest of North American species; moreover, we studied the phylogeographic structure of populations of *S. veraecrucis* and its closest relatives. The results resolved two major clades within the *Otisorrex* subgenus as a consequence of the first diversification within soricini shrews in North America. The first clade includes the species distributed near to the Bering Strait and the second one: *Sorex trowbridgii* and some Mexican and Guatemala species, which occur in the the southernmost limit of the *Sorex* distribution. Our dataset produced a hypothesis of phylogenetic relationships between most of the Mexican species and showed the paraphyletic status of *S. emarginatus* and *S. veraecrucis*; in addition, the last species revealed a close relationship with *S. ixtlanesis*, *S. orizabae* and *S. saussurei*. This inference was supported by genetic distances and the molecular clock showed that speciation events began in the Miocene and peaked during the Pliocene and Pleistocene. This evolutionary scenario may have been strongly influenced by the complex topography of México and the origin of the principal mountain chains (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico Transversal, Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca and, Sierra Madre de Chiapas), in addition to the important role of the Tehuantepec Isthmus as a geographic barrier. The evolutionary history of shrews in southeastern México suggests that arrival events colonized areas beyond the Isthmus of Tehuantepec. If later differentiation events west of this barrier or a second migration wave that was not able to pass it east took place remains to be elucidated.

## INTRODUCCIÓN

### LAS MUSARAÑAS DEL GÉNERO *SOREX* EN AMÉRICA

Las musarañas son mamíferos pequeños del Orden Soricomorpha pertenecientes a la Familia Soricidae, de hocico alargado, orejas y ojos pequeños. Se distribuyen en prácticamente todo el mundo excepto en las áreas polares, Australia y el sur de Sudamérica (Wolsan y Hutterer 1998; Fig. 1). La familia Soricidae incluye tres subfamilias, con seis tribus, 26 géneros y más de 300 especies en el mundo (Hutterer 2005); en el continente Americano las musarañas están representadas por la subfamilia Soricinae con tres tribus y cinco géneros (Blarinini: *Blarina* y *Cryptotis*, Soricini: *Sorex*, Notiosoricini: *Notiosorex* y *Megasorex*), distribuidos desde el estrecho de Bering hasta el norte de Sudamérica (Hutterer 2005).

En México se conocen cuatro géneros de musarañas: *Sorex*, *Cryptotis*, *Megasorex* y *Notiosorex*, con 35 especies en total. Se distribuyen en toda la República, con excepción de Tabasco de donde no se tienen registros (Carraway 2007). A nivel mundial se han identificado 77 especies del género *Sorex* (Hutterer 2005), 41 se encuentran en América, desde los límites al norte del continente hasta el extremo sur de su distribución en Guatemala (Hutterer 2005; Wilson y Ruff 1999).

Las musarañas *Sorex* se caracterizan en general por tener una cola larga que representa el 40% o más de la longitud total del cuerpo; 32 dientes pigmentados y cinco dientes unicúspides superiores en cada lado de la maxila (Carraway 1995). Este género se localiza en bosques de encino, pino y pino encino, especialmente en lugares húmedos con capas gruesas de hojarasca, a altitudes que van de los 1600 a más de 3000 m (Carraway 2007; Villa y Cervantes 2003). Las musarañas son organismos de alta tasa metabólica que se alimentan en su mayoría de invertebrados como los artrópodos y los

gusanos de tierra (Brannon 2000; Chuchfield 1990; Churchfield y Sheftel 1994; Hanski y Kaikusalo 1989)



Fig. 1.- Musaraña *Sorex veraecrucis altoensis* (Fotografías Julieta Vargas)

A pesar del gran número de especies de musarañas en México, éstas han sido poco estudiadas (Carraway 2007; Choate 1970; Ramírez Pulido et al. 2004, 2005). La mayoría de los trabajos sobre este grupo taxonómico se han reducido a la revisión e inclusión en listados faunísticos, sobre todo por la dificultad que existe para capturar e identificar ejemplares (Carraway 2007). El estudio taxonómico más reciente con datos morfológicos de musarañas propone la existencia de 16 especies del género *Sorex* distribuidas en México (Figs 2-5; Carraway 2007). Este análisis cambió el arreglo taxonómico que hasta ese momento existía (Hutterer 2005); con lo que el número de especies descritas se incrementó (Cuadro 1). Es probable que el análisis de estas especies, ahora con datos moleculares, nos ayude a complementar la información que hasta el momento se tiene de las especies de este género.



9

Fig. 2.- Distribución de las musarañas *Sorex ixtlanensis*, *S. veraepacis mutabilis*, *S. mediopua*, *S. saussurei*, *S. veraepacis chiapensis*, *S. veraepacis mutabilis* (Carraway 2007).



Fig. 3.- Distribución de las musarañas *Sorex veraecrucis altoensis*, *S. veraecrucis cristobalensis*, *S. veraecrucis oaxacae*, *S. veraecrucis veraecrucis* y *S. saussurei* (Carraway 2007).

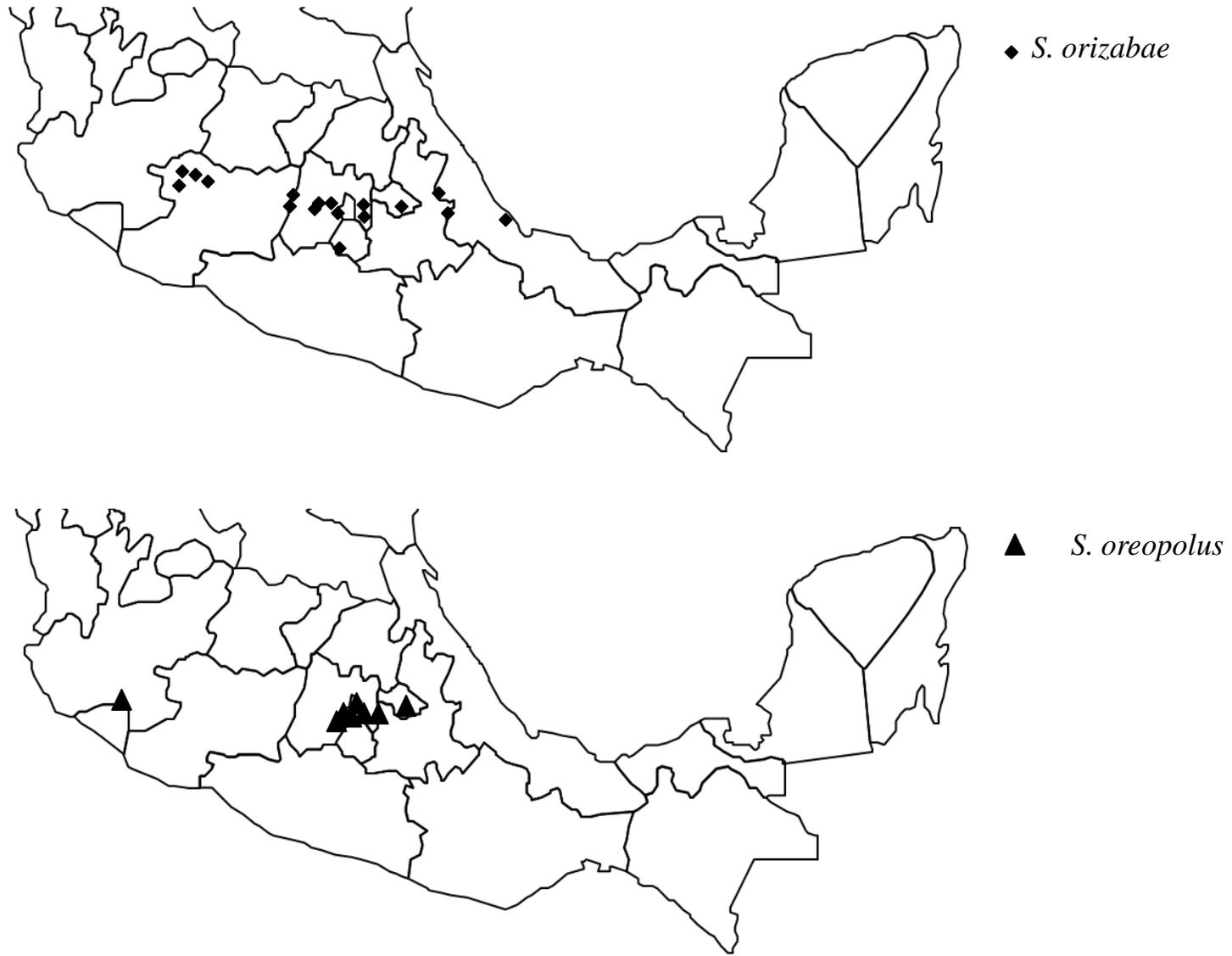


Fig. 4.- Distribución de las musarañas *S. oreopolus* y *S. orizabae* (Carraway 2007).

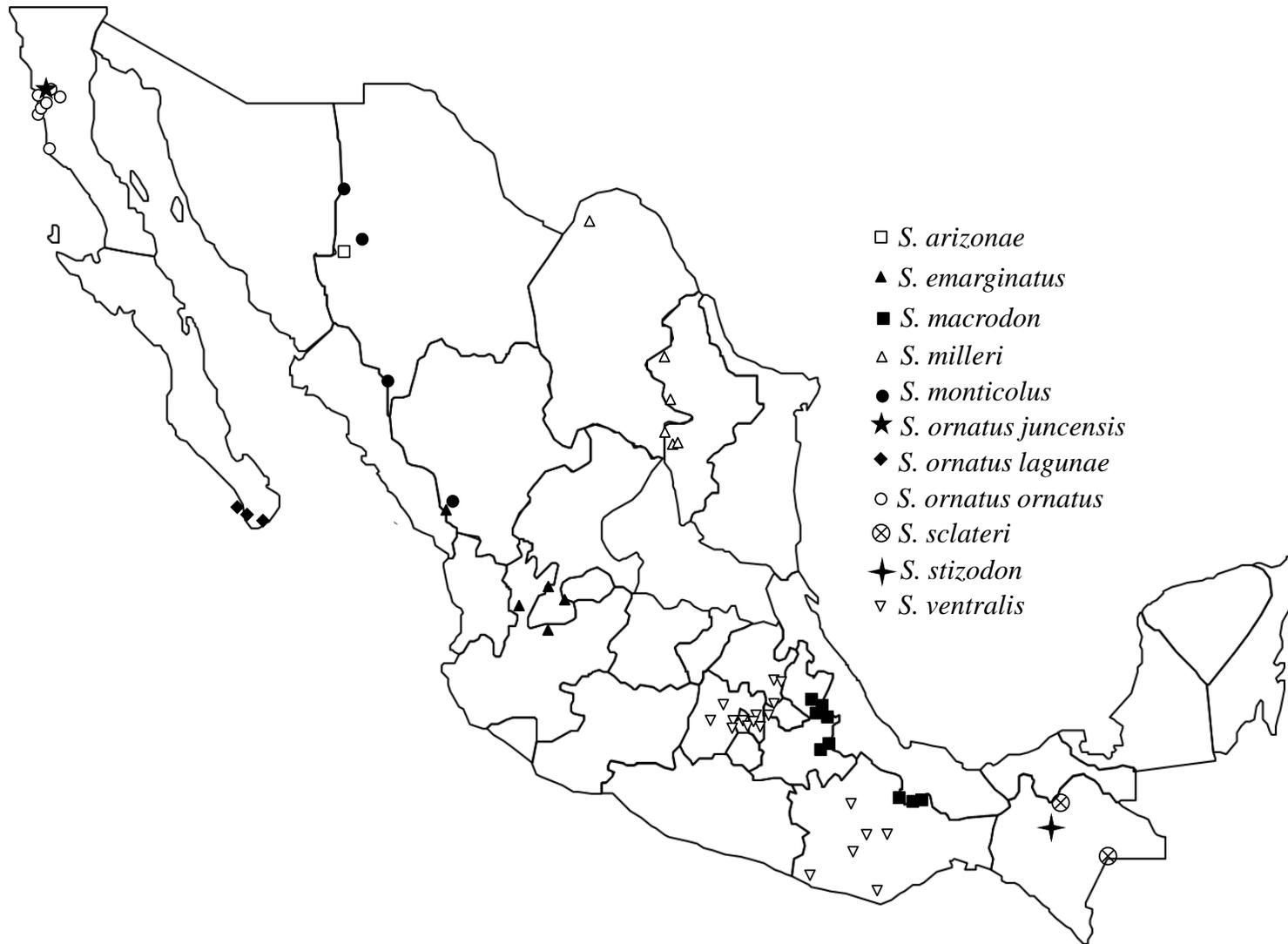


Fig. 5.- Distribución de las musarañas *Sorex arizonae*, *S. emarginatus*, *S. macrodon*, *S. milleri*, *S. monticolus*, *S. ornatus juncensis*, *S. ornatus lagunae*, *S. ornatus ornatus*, *S. sclateri*, *S. stizodon*, y *S. ventralis* (Carraway 2007).

Cuadro 1. Cambios en la nomenclatura de las especies del género *Sorex* como resultado del estudio de Carraway (2007).

Antes	Después
<i>S. veraepacis mutabilis</i>	<i>S. veraepacis mutabilis</i> , <i>S. ixtlanensis</i>
<i>S. saussurei saussurei</i>	<i>S. saussurei</i> <i>S. mediopua</i> <i>S. veraecrucis altoensis</i>
<i>S. saussurei veraecrucis</i>	<i>S. veraecrucis veraecrucis</i>
<i>S. saussurei oaxacae</i>	<i>S. veraecrucis oaxacae</i>
<i>S. saussurei cristobalensis</i>	<i>S. veraecrucis cristobalensis</i>

El género *Sorex* está subdividido en dos subgéneros: *Sorex*, que reúne a la mayoría de las especies de distribución geográfica en la región Paleártica además de *S. tundrensis*, *S. arcticus*, *S. maritimensis* y *S. yukonicus*. El otro subgénero es *Otisorex*, que incluye a especies con distribución Neártica o cercanas al estrecho de Bering (Hutterer 2005). Las características morfológicas que diferencian estos subgéneros incluyen la comparación del tamaño entre los dientes superiores tercero y cuarto con una sola cúspide (U3 y U4, respectivamente), a la pigmentación parcial o completa de los dientes unicúspides y a la presencia bien desarrollada o no del foramen posmandibular (Junge y Hoffmann 1981). Diversos autores han podido observar que las características que distinguen a los subgéneros *Otisorex* (U3<U4, pigmentación completa en los unicúspides, ausencia del foramen postmandibular) y *Sorex* (U3 ≥U4, sin pigmentación en los unicúspides, presencia bien desarrollada del foramen posmandibular) son muy variables (Carraway 1987; George 1988; Junge y Hoffmann 1981), lo que puede poner en duda la monofilia de los subgéneros. Diez de las especies del género *Sorex* que se distribuyen en América no tienen asignación para alguno de los

dos subgéneros: *S. merriami* y *S. trowbridgii* que son endémicas de los Estados Unidos de Norteamérica; *S. arizonae* que se distribuye tanto en los Estados Unidos como en México (Hutterer 2005; Wilson y Ruff 1999); *S. saussurei* en México y Guatemala y *S. emarginatus*, *S. sclateri*, *S. stizodon*, *S. ventralis*, *S. ixtlanensis* y *S. veraecrucis*, endémicas de nuestro país (Carraway 2007; Hutterer 2005). Las siete especies restantes que se distribuyen en México están asignadas al subgénero *Otisoorex* (Hutterer 2005). De tal manera que la incorporación de más especies del género *Sorex* en los análisis y la utilización de otras características como los datos moleculares, permitiría tener un panorama claro acerca de la validez taxonómica de estos subgéneros, conocer aspectos de su historia evolutiva y proponer un arreglo para ubicar estas especies en el contexto de todo el grupo.

Los restos de fósiles de musarañas más antiguos se han encontrado en Norteamérica, correspondientes al Eoceno medio (45 millones de años). De estos registros, los más antiguos de la familia Soricidae son del Mioceno temprano (25 ma), incluyendo representantes de la tribu Soricini con el género *Antesorex*. Por otro lado, los registros fósiles del género *Sorex* más antiguos son del Mioceno tardío (11 ma; Harris 1998). Mediante análisis con datos moleculares se ha podido esclarecer la historia evolutiva de este grupo taxonómico, en los que se ha sugerido que el género *Sorex* sufrió una radiación rápida e independiente, tanto en Eurasia como en el Nuevo Mundo, en un tiempo corto posterior a la aparición del género. Asimismo, que la fecha de divergencia entre los subgéneros *Sorex* y *Otisoorex* es de 11.5-13.9 ma (Dubey et al. 2007; Fumagalli et al. 1999; Ohdachi et al. 2006). Además, encontraron dos grupos monofiléticos de especies: *Otisoorex*, restringido a la mayoría de las especies de América, y *Sorex*, que incluye a las especies de Europa, Asia y África (Dubey et al. 2007; Fumagalli et al.

1999). Los últimos estudios con datos moleculares indican que el origen de la familia Soricidae es euroasiático en concordancia con el registro fósil (Dubey et al. 2007; Repenning 1967; Rzebik-Kowalska 1998; Storch et al. 1998). Se ha propuesto que ocurrieron tres invasiones al continente Americano durante el Mioceno medio, desde Eurasia a través del estrecho de Bering (Dubey et al. 2007), y que la diversificación del grupo en los principales géneros que ahora conocemos sucedió durante el Plioceno (George 1988; Harris 1998; Repenning 1967).

Existen varios estudios filogenéticos y filogeográficos utilizando datos moleculares de las musarañas *Sorex* en Norteamérica (Demboski y Cook 2001, 2003; George 1988; George y Sarich 1994; Fumagalli et al. 1999; Ohdachi et al. 2006; O'Neill et al. 2005; Shafer y Stewart 2007), los cuales reportan que las especies del género con distribución en Canadá y Estados Unidos, forman dos clados principales con las especies del grupo *vagrans* y el grupo *cinereus* (Demboski y Cook 2001, 2003; Ohdachi et al. 2006; Shafer y Stewart 2007). Sin embargo, hay poca información respecto a las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas en relación con este grupo taxonómico en el continente Americano.

Las especies del género *Sorex* que se distribuyen en México (Figs. 2-5; Carraway 2007; Hutterer 2005) presentan características que las vuelven un objeto de estudio de sumo interés: de las 16 especies, 11 son endémicas del país y la mayoría de ellas se distribuyen a lo largo de las principales cadenas montañosas y que se formaron mayormente, entre el Mioceno y Pleistoceno (Ferrusquía-Villafranca 1993), es decir antes y durante el arribo de las primeras poblaciones del género *Sorex* al continente Americano (Dubey et al. 2007; George 1988, Harris 1998). Diversos trabajos biogeográficos destacan el alto número de especies endémicas que habitan estas áreas

montañosas, enfatizando la importancia de México como zona de transición entre las regiones Neártica y Neotropical (Escalante et al. 2004; Marshall y Liebherr 2000). Estas montañas constituyen, barreras geográficas para diversas poblaciones de mamíferos pequeños, como las musarañas, aunado al efecto de las variaciones climáticas y de vegetación que ocurrieron durante el Pleistoceno en el continente (González-Medrano 1998; Toledo 1982). Los factores mencionados sin duda influyeron en los procesos de vicarianza y en la distribución de los linajes, lo cual puede explicar la alta diversidad de especies de este grupo taxonómico en nuestro país.

Conforme se va teniendo un panorama más completo de las especies de musarañas del género *Sorex*, se va haciendo también necesario abordar diversos temas como las relaciones genealógicas de estas especies, cuáles son las especies hermanas y cuál es su posición filogenética con respecto al resto de las musarañas *Sorex* del continente Americano. Si se conocen dichas relaciones es posible explicar cuáles fueron los procesos que condicionaron la distribución de estos linajes en el contexto geográfico, es decir, el análisis filogeográfico (Avice 2000; Fumagalli et al. 1999; Minelli 1993; Schuh 2000). En los últimos años los datos moleculares han resultado ser de gran utilidad para este tipo de estudios y la utilización de genes mitocondriales ha demostrado tener una buena resolución para el estudio de mamíferos pequeños, incluyendo las musarañas (Avice 1994, 1998; Fumagalli et al. 1999; Moritz y Hillis 1996).

Así, este estudio intenta describir las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Sorex* que se distribuyen en México, con la finalidad de conocer su ubicación con respecto al resto de las especies de Norteamérica y de evaluar filogeográficamente qué factores determinaron la distribución geográfica de estos linajes.

Dadas las características topográficas del país, de los atributos de las musarañas, así

como del gen citocromo *b*, planteamos la hipótesis de que encontraremos una estructura genética que nos permitirá dar un panorama general de las relaciones filogenéticas y filogeográficas de este grupo taxonómico y que éstas estarán muy relacionadas con las barreras geográficas y cambios climáticos que ha experimentado el territorio a través del tiempo.

#### LITERATURA CITADA

- AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Kluwer Academic Publishers. Boston, United States of America.
- AVISE, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
- AVISE, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, London, England.
- BRANNON, M. P. 2000. Niche relationships of two syntopic species of shrews, *Sorex fumeus* and *S. cinereus*, in the southern Appalachian Mountains. *Journal of Mammalogy* 81:1053-1061.
- CARRAWAY, L. 1987. Analysis of characters for distinguishing *Sorex trowbridgii* from sympatric *S. vagrans*. *Murrelet* 68:29-30.
- CARRAWAY, L. 1995. A key to Recent Soricidae of the western United States and Canada based primarily on dentaries. *Occasional Papers of the Natural History Museum, University of Kansas* 175:1-49.
- CARRAWAY, L. 2007. Shrews (Eulypotyphla: Soricidae) of Mexico. *Monographs of the Western North American Naturalist* 3:1-91.
- CHOATE, J. R. 1970. Systematics and zoogeography of Middle American shrews of the genus *Cryptotis*. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 19:195-317.
- CHURCHFIELD, S. 1990. The natural history of shrews. Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press, Cornell, USA.
- CHURCHFIELD, S. AND SHEFTEL, B. I. 1994. Food niche overlap and ecological separation in a multi-species community of shrews in the Siberian taiga. *Journal of Zoology* 234:105-124.
- DEMBOSKI, J. R., AND J. A. COOK. 2001. Phylogeography of the dusky shrew, *Sorex monticolus* (Insectivora, Soricidae): insight into deep and shallow history in northwestern North America. *Molecular Ecology* 10:1227-1240.
- DEMBOSKI, J. R., AND J. A. COOK. 2003. Phylogenetic Diversification within the *Sorex cinereus* group (Soricidae). *Journal of Mammalogy* 84:144-158.
- DUBEY, S., N. SALAMIN, S. D. OHDACHI, P. BARRIERRE, AND P. VOGEL. 2007. Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia:Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:126-137.
- ESCALANTE, T., G. RODRÍGUEZ, Y J. J. MORRONE. 2005. Las provincias

- biogeográficas del Componente Mexicano de Montaña desde la perspectiva de los mamíferos continentales. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76:199-205.
- FERRUSQUÍA-VILLAFRANCA, I. 1993. 1. Geology of Mexico: a synopsis. Pp. 3-107 in *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa, eds.). Oxford University Press, New York.
- FUMAGALLI, L., P. TABERLET, D. T. STEWART, L. GIELLY, J. HAUSSER, AND P. VOGEL. 1999. Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* shrews (Soricidae: Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11:222-235.
- GEORGE, S. B. 1988. Systematics, historical biogeography, and evolution of the genus *Sorex*. *Journal of Mammalogy* 69:443-461.
- GEORGE, S. B., AND V. M. SARICH. 1994. Albumin evolution in the Soricinae and its implications for the phylogenetic history of the Soricidae. Pp. 289-293 in *Advances in the Biology of Shrews* (J. F., Merritt, G. L., Kirkland Jr. and R. K., Rose, eds.). Carnegie Museum Natural History Special Publications 18:289-293.
- GONZÁLEZ-MEDRANO, F. 1998. La vegetación de México y su historia. *Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM* 52:58-65.
- HANSKI, I., AND A. KAIKUSALO. 1989. Distribution and habitat selection of shrews in Finland. *Annales Zoologici Fennici* 26:339-348.
- HARRIS, A. H. 1998. Fossil history of shrews in North America. Pp. 133-156 in *Evolution of Shrews*. (J.M. Wójcik and M. Wolsan, eds.). Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences.
- HUTTERER, R. 2005. Order Soricomorpha. Pp. 282–300 in *Mammal Species of the World* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- JUNGE, J. A., AND R. S. HOFFMANN. 1981. An annotated key to the long-tailed shrews (genus *Sorex*) of the United States and Canada, with notes on Middle American *Sorex*. *Occasional Papers of Museum of Natural History of the University of Kansas* 94:1–48.
- MARSHALL, C. J., AND J. K. LIEBHERR. 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography* 27:203-216.
- MINELLI, A. 1993. *Biological Systematics. The state of the art*. Chapman and Hall.
- MORITZ, C., AND D. M. HILLIS. 1996. Molecular systematics: context and controversies. Pp. 1-13 in *Molecular Systematics* (D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable, eds.). Sinauer Associates.
- O'NEILL, M. B., D. W. NAGORSEN, AND R. J. BAKER 2005. Mitochondrial DNA variation in water shrews (*Sorex palustris*, *Sorex bendirii*) from western North America: implications for taxonomy and phylogeography. *Canadian Journal of Zoology* 83:1469-1475.
- OHDACHI, S. D., M. HASEGAWA, M. A. IWASA, P. VOGEL, T. OSHIDA, L.K. LIN AN, AND 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.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., A. CASTILLO-MORALES, A. SALAME-MÉNDEZ Y A. CASTRO-CAMPILLO. 2004. Características morfológicas y morfométricas de cinco especies *Cryptotis* (Mammalia: Soricomorpha). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 20:9-37.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., A. CASTILLO-MORALES, A. SALAME-MÉNDEZ, A.

- CASTRO-CAMPILLO Y N. GONZÁLEZ-RUIZ. 2005. Variación y distribución de *Sorex* (Mammalia: Soricomorpha) del centro de México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 3ª Época 2:178-192.
- REPENNING, C. A. 1967. Subfamilies and genera of the Soricidae. United States Geological Survey Professional Paper 565:1-74.
- RZEBIK-KOWALSKA, B. 1998. Fossil History of Shrews in Europe. Pp. 23-92 in Evolution of Shrews. (J.M. Wójcik and M. Wolsan, eds.). Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences.
- SHAFER, A. B. A., AND D. T. STEWART. 2007. Phylogenetic relationships among Nearctic shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Soricidae) inferred from combined cytochrome *b* and inter-SINE fingerprint data using Bayesian analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution 44:192-203.
- SCHUH, R. T. 2000. Biological Systematics. Principles and applications. Cornell University Press.
- STORCH, G. ZH. QIU, AND V. S. ZAZHIGIN. 1998. Fossil History of Shrews in Europe. Pp. 93-120 in Evolution of Shrews. (J. M. Wójcik, and M. Wolsan, eds.). Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences.
- TOLEDO, V. M. 1982. Pleistocene changes in vegetation in tropical México. Pp. 93-111 in Biological diversification in the tropics (G. T. Prance, ed.). Columbia University Press, New York.
- VILLA, B., Y F. CERVANTES. 2003. Los mamíferos de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- WILSON, D. E., AND S. RUFF. 1999. The Smithsonian Book of North American Mammals. American Society of Mammalogists. Washington, D. C.
- WOLSAN, M., AND R. HUTTERER. 1998. Appendix. A list of the living species of shrews. Pp. 425-448 in Evolution of Shrews. (J. M. Wójcik and M. Wolsan, eds.). Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences.

## **CAPÍTULO I**

**MOLECULAR PHYLOGENY OF LONG-TAILED SHREWS  
(GENUS *SOREX*) FROM MÉXICO AND GUATEMALA  
ZOOTAXA 2615:47-65 (2010)**



## Molecular phylogeny of long-tailed shrews (genus *Sorex*) from México and Guatemala

MARTHA ESTEVA<sup>1</sup>, FERNANDO A. CERVANTES<sup>1</sup>, SARA V. BRANT<sup>2</sup> & JOSEPH A. COOK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zoología; Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; Apartado Postal 70-153, México, Distrito Federal, México 04510. E-mail: meeg@ibiologia.unam.mx; fac@ibiologia.unam.mx.

<sup>2</sup>Biology Department and Museum of Southwestern Biology, CERIA Building MSC03 2020, 1 University of New Mexico; Albuquerque, New Mexico, USA 87131-0001. E-mail: sbrant@unm.edu; cookjose@unm.edu.

### Abstract

We present a molecular phylogeny of North American species of long-tailed shrews of the genus *Sorex*. Our focus is on Mexican and Guatemalan species to begin understanding their evolutionary relationships and to test the validity of nominal species. Seventy-seven sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene were analyzed, including 19 specimens representing nine Mexican and one Guatemalan species. Phylogenetic analyses using parsimony, maximum likelihood and Bayesian approaches revealed two major clades of North American species, all within the subgenus *Otisorex*. The first major clade includes *S. trowbridgii* and southern species (*S. macrodon* from Oaxaca; *S. veraecrucis* from Nuevo León, Michoacán, Chiapas, *S. saussurei* from Jalisco and Guatemala; *S. veraepacis* from Guerrero and Guatemala). Relatively deep branches among taxa characterize this clade and suggest that their early divergence from other North American shrews was soon after arrival of the ancestral stock from the Beringian region. The other major clade includes all other North American species of *Sorex* we examined, with two Mexican species, *S. milleri* and *S. emarginatus*, grouped in a subclade with the *S. cinereus* complex. *Sorex veraecrucis* is not, however, a monophyletic taxon because specimens of this nominal species were included in both the major clades. The Isthmus of Tehuantepec has likely played a role as a biogeographic barrier in the evolutionary history of Mexican shrews. This study of mitochondrial variation in southern North American shrews of the genus *Sorex* indicates there is substantial, previously undetected diversity that necessitates a revision of the taxonomy of *S. veraecrucis* and *S. veraepacis*.

**Key words:** biogeography, mammals, mitochondrial DNA, Soricidae, systematics

### Introduction

Approximately 77 species of shrews in the genus *Sorex* (Soricomorpha, Soricidae) are currently recognized (Hutterer 2005). These diminutive species are often among the most abundant members of terrestrial mammalian communities in the boreal and mountainous regions of Europe, Asia, and North America. Phylogenetic relationships among some species have been studied using cranial, dental and other morphological characters (Junge & Hoffmann 1981; Carraway 1990), allozymes (George 1988), and molecular sequence data (Fumagalli *et al.* 1999; Ohdachi *et al.* 2006; Dubey *et al.* 2007). A comprehensive assessment that includes all species will be difficult to complete due to limited availability of specimens for many species within this widely distributed group. Nevertheless, new species are described regularly (e.g., Dokuchaev 1997; Rausch *et al.* 2007; Nagorsen & Panter 2009) as more detailed assessments of geographic variation are completed.

The ancestral lineages of *Sorex* are hypothesized to have arisen in Eurasia (Repenning 1967; Storch *et al.* 1998) and then split between 7.0–18.4 million years ago (mya) into two principal lineages that are recognized as: a) subgenus *Sorex* (most Palearctic species plus Holarctic *S. tundrensis* Merriam 1900 and Nearctic *S. arcticus* Kerr 1792, *S. maritimensis* Smith 1939, and *S. yukonicus* Dokuchaev 1997) and b) subgenus *Otisorex* (chiefly Nearctic or Beringian taxa, Hutterer 2005; and possibly including *S. trowbridgii* Baird 1857,

Fumagalli *et al.* 1999). Dubey *et al.* (2007) similarly estimated that these two subgenera diverged 10.2 – 17.5 mya (Table 1). Allozyme, immunological and chromosomal studies (e.g., George 1988; George & Sarich 1994; Ivanitskaya 1994) have generally recovered the two main clades of subgenera, but the placement of particular taxa (e.g., *S. trowbridgii*, *S. fumeus* G. M. Miller 1895, and most Mexican and Guatemalan species) has remained problematic (Hutterer 2005). Resolution of these relationships is critical to understanding the historical biogeography of the Holarctic, such as timing and impact of biotic exchange between Asia and North America.

**TABLE 1.** Species of subgenera *Sorex*, *Otisoorex* and species not previously classified (Hutterer 2005). Species included in this study (\*).

<i>Sorex (Otisoorex)</i>	<i>Sorex (Sorex)</i>	Unclassified
<i>alaskanus</i>	* <i>alpinus</i>	<i>arizonae</i>
* <i>bairdi</i>	<i>antinorii</i>	* <i>emarginatus</i>
* <i>bendirii</i>	<i>araneus</i>	<i>merriami</i>
* <i>camtschatica</i>	* <i>arcticus</i>	* <i>mirabilis</i>
* <i>cinereus</i>	<i>arunchi</i>	<i>planiceps</i>
<i>dispar</i>	<i>asper</i>	* <i>saussurei</i>
* <i>fumeus</i>	<i>averini</i>	<i>sclateri</i>
<i>gaspensis</i>	<i>bedfordiae</i>	<i>stizodon</i>
* <i>haydeni</i>	<i>buchariensis</i>	<i>thibetanus</i>
* <i>hoi</i>	<i>caecutiens</i>	* <i>trowbridgii</i>
* <i>jacksoni</i>	<i>cansulus</i>	* <i>ventralis</i>
<i>leucogaster</i>	<i>coronatus</i>	* <i>veraecrucis</i>
* <i>longirostris</i>	<i>cylindricauda</i>	
<i>lyelli</i>	<i>daphaenodon</i>	
* <i>macrodon</i>	<i>excelsus</i>	
* <i>milleri</i>	<i>gracillimus</i>	
* <i>monticolus</i>	<i>granarius</i>	
<i>nanus</i>	<i>hosonoi</i>	
* <i>neomexicanus</i>	<i>isodon</i>	
* <i>oreopolus</i>	<i>kozłovi</i>	
<i>orizabae</i>	<i>maritimensis</i>	
* <i>ornatus</i>	<i>minutissimus</i>	
* <i>pacificus</i>	<i>minutus</i>	
* <i>palustris</i>	<i>raddei</i>	
* <i>portenkoi</i>	<i>roboratus</i>	
* <i>preblei</i>	<i>samniticus</i>	
* <i>pribilofensis</i>	<i>satunini</i>	
* <i>sonomae</i>	<i>shinto</i>	
* <i>tenellus</i>	<i>sinalis</i>	
* <i>ugyunak</i>	* <i>tundrensis</i>	
<i>unguiculatus</i>	<i>volnuchini</i>	
* <i>vagrans</i>	<i>yukonicus</i>	
* <i>veraepacis</i>		

For members of the predominantly Eurasian subgenus *Sorex*, two independent colonizations of the New World were hypothesized through Beringia; the first wave by *S. arcticus* occurred about 2.3 mya (0.9–4.5), whereas *S. tundrensis* represents an undated, but more recent, second wave (Fumagalli *et al.* 1999). For members of the subgenus *Otisorex*, phylogenetic studies based on mitochondrial sequences improved our understanding of the biogeographic history of this clade that includes mostly Nearctic species (Demboski & Cook 2001, 2003; Shafer & Stewart 2007). For example, the *cinereus* group (van Zyll de Jong & Kirkland 1989) is composed of two primary lineages (Demboski & Cook 2003). One is a predominantly Beringian (northern) clade comprised of Nearctic and a few Palearctic species with distributions close to Beringia, and *S. preblei* Jackson 1922 as a sister taxon. The other lineage is formed by species occurring from Alaska to the southeastern United States, with *S. longirostris* Bachman 1837 the sister taxon. Notably missing from previous analyses of this mostly Nearctic clade has been representatives of species of *Sorex* from Mexico and Central America.

To more completely understand the diversification of long-tailed shrews of the subgenus *Otisorex* in the New World, we need to test hypotheses related to several stages of their evolutionary and biogeographic history. For example, some nominal species of this subgenus harbor deep sequence divergence that likely reflects the presence of multiple cryptic or previously unrecognized species, while other nominal species show minimal molecular differentiation from allied species that questions the validity of currently accepted taxonomy (Demboski & Cook 2001). Along the west coast of North America, *S. bairdi* Merriam 1895, *S. pacificus* Coues 1877, *S. bendirii* Merriam 1884, *S. palustris* Richardson 1828, *S. sonomae* Jackson 1921, and one distinctive lineage of *S. monticolus* Merriam 1890 are closely related, while in New Mexico, *S. neomexicanus* Bailey 1913 and a distinct evolutionary trajectory of *S. monticolus* are closely allied, if not conspecific. In this case, further research is required to understand the phylogenetic position and species identity of the alleged wide-ranging *S. monticolus* and a number of closely related forms. Populations of *S. monticolus* from northwestern Mexico had not been examined previously. Indeed, Mexican and Guatemalan species of *Sorex* are generally poorly studied and have seldom been included in molecular phylogenetic analyses. Yet, these southern-most shrews are critical to tying previous phylogenetic studies within *Sorex* across their northern distribution (e.g., Shafer & Stewart 2007) to the overall history of *Sorex* diversification in North America.

We use mitochondrial sequence variation to investigate the evolutionary relationships among 11 (*S. emarginatus* Jackson 1925, *S. ixtlanensis* Carraway 2007, *S. macrodon* Merriam 1895, *S. monticolus*, *S. milleri* Jackson 1947, *S. oreopolus* Merriam 1892, *S. ornatus* Merriam 1895, *S. saussurei*, Merriam 1892, *S. veraecrucis* Jackson 1925, *S. ventralis* Merriam 1895, *S. veraepacis* Alston 1877) of the 14 recognized Mexican and Guatemalan long-tailed shrews (Hutterer 2005). Collectively, these 11 nominal species have a wide geographical distribution across Mexico and two species (*S. veraepacis*, *S. veraecrucis*) range southward to eastern Guatemala (Hall 1981; Hutterer 2005). Of these, *S. monticolus* is the only species that occurs north of Mexico. We constructed a molecular phylogeny for these southern North American species in an effort to complement and further our knowledge of their evolutionary relationships with other North American long-tailed shrews of the genus *Sorex*.

## Material and methods

Previous taxonomic reviews of the genus *Sorex* listed either 12 (Villa & Cervantes 2003) or 14 (Hutterer 2005) species in Mexico, two of which also occur in Guatemala. Our analysis includes ten of those species (excluding *S. arizonae* Diersing and Hoffmeister 1977, *S. orizabae* Merriam 1895, *S. sclateri* Merriam 1897, and *S. stizodon* Merriam 1895). Carraway (2007) recently proposed that a total of sixteen species of *Sorex* are distributed in Mexico (Hall 1981; Villa & Cervantes 2003; Hutterer 2005). Our study also included representatives of one of her newly recognized species, *S. ixtlanensis*.

For this study, 19 samples collected from Mexico were sequenced and 58 sequences were downloaded from GenBank for a total of 26 species of *Sorex* (Table 2). *Crocidura suaveolens* Pallas 1811 was designated

as outgroup for phylogenetic analyses (George 1988; Hutterer 2005), which allowed us to set the point of divergence between the subfamilies Crocidurinae and Soricinae (Reumer 1994).

**TABLE 2.** Collection localities, specimen numbers and GenBank accession numbers or (\*) collection catalog number for specimens examined. Mammalian collection acronyms are as follows: CNMA or FAC = Colección Nacional de Mamíferos (Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City); KUNHM = University of Kansas (Lawrence, Kansas, USA); CDR = Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango (Instituto Politécnico Nacional, Mexico City); ECO-SC-M = El Colegio de la Frontera Sur (San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México); MCNG = Museo de Ciencias Naturales, Universidad de San Carlos de Guatemala (Guatemala City); BYU = Brigham Young University (Provo, Utah, USA).

Species	Specimen identification code	Location	Specimen no. and GenBank number	Base pairs (bp)
<i>Crocidura suaveolens</i> (1)	0	AUSTRIA: Wien	AB077280	1140
<i>Sorex alpinus</i> (2)	0	SWITZERLAND: Pont de Nant, Vaud Canton	AB175120	1140
		SWITZERLAND: Col du Sanetsch, Valais Canton	AB175119	1140
<i>Sorex arcticus</i> (2)	2	CANADA: Quebec	AJ000428	1010
		CANADA: Windsor, Nova Scotia	AJ000427	1011
<i>Sorex bairdi</i> (2)	2	USA: Oregon, Yamhill County	AF238024	801
		USA: Oregon, Tillamook County	AF238023	801
<i>Sorex bendirii</i> (2)	2	CANADA: British Columbia, Fraser Valley	AY954947	1140
		CANADA: British Columbia	AY954946	1140
<i>Sorex camtschatica</i> (2)	0	RUSSIA: Magadan	AY014920	1140
		RUSSIA: Magadan	AY014919	1140
<i>Sorex cinereus</i> (2)	2	USA: Alaska: Kanuti National Wildlife Refuge	AY014951	1140
		USA: Minnesota, Goodhue County	AY014952	1140
<i>Sorex emarginatus</i> (1)	2	*MEXICO: State of Durango, Las Adjuntas	*KUNHM54346	647
<i>Sorex fumeus</i> (2)	2	USA: Pennsylvania, Westmoreland County	AB175116	1010
		CANADA: Edmundstone, New Brunswick	AJ000462	1010
<i>Sorex haydeni</i> (2)	2	USA: South Dakota, Davison County	AY014940	1010
		USA: South Dakota, Davison County	AY014939	1010
<i>Sorex hoyi</i> (2)	2	USA: Alaska, Hughes Quadrangle	AF238040	1140
		CANADA: AB, Seebe	AY310343	1010
<i>Sorex hoyi thompsoni</i> (2)	2	CANADA: Gogama	AY310344	1010
		CANADA: Toronto	AY310342	1010
<i>Sorex pribilofensis</i> (2)	2	USA: Alaska, St. Paul Island	AY014933	1140
		USA: Alaska, St. Paul Island	AY014932	1140
<i>Sorex ixtlanensis</i> (1)	3	*MEXICO: State of Oaxaca, San José de Cieneguilla	*FAC3181	1140
<i>Sorex jacksoni</i> (2)	2	USA: Alaska, St. Lawrence Island	AY014926	1140
		USA: Alaska, St. Lawrence Island	AY014925	1140
<i>Sorex longirostris</i> (2)	2	USA: Tennessee, Perry County	AY014954	1140
		USA: Virginia, Mecklenburg County	AY014953	1140
<i>Sorex macrodon</i> (1)	3	*MEXICO: State of Oaxaca, Vista Hermosa	*KUNHM12165 7	1081
<i>Sorex milleri</i> (3)	2	*MEXICO: State of Nuevo León, Cerro Potosí	*CNMA26549	1134
		*MEXICO: State of Coahuila, San Antonio de las Alazanas	*KUNHM67296	758

continued next page

**TABLE 2.** (continued)

Species	Specimen identification code	Location	Specimen no. and GenBank number	Base pairs (bp)
		*MEXICO: State of Coahuila, San Antonio de las Alazanas	*KUNHM67281	644
<i>Sorex mirabilis</i> (1)	0	South Korea	AB062737	1140
<i>Sorex monticolus</i> (7)	2	USA: Oregon, Tillamook County, Nestucca River	AJ000451	1010
		USA: Oregon, Tillamook County, Nestucca River	AJ000450	1010
		USA Colorado, Jackson County	AF238019	801
		USA: New Mexico, Cibola County	AF238018	801
		Canada: British Columbia, Barriere	AF238010	801
		Canada: British Columbia, Opax Mountain	AF238011	801
		*MEXICO: Durango	*CDR4360	1127
<i>Sorex neomexicanus</i> (2)	2	USA: New Mexico, Otero County	AF238030	801
		USA: New Mexico, Otero County	AF238029	801
<i>Sorex oreopolus</i> (1)	3	*MEXICO: Distrito Federal, Delegación Tlalpan, 1 km sur Parrés	*CNMA31955	1085
<i>Sorex ornatus</i> (2)	2	USA: California, San Diego County	AF238036	801
		USA: California, San Diego County	AF238035	801
<i>Sorex pacificus</i> (2)	2	USA: Oregon, Rock Creek, Lane County	AJ000453	1010
		USA: Oregon, Rock Creek, Lane County	AJ000452	1010
<i>Sorex palustris</i> (2)	2	Canada: Alberta, Alta, Calling Lake	AY954942	1140
		Canada: Alberta, Alta, Calling Lake	AY954941	1140
<i>Sorex portenkoi</i> (1)	0	RUSSIA: Provideniya	AY014921	1140
<i>Sorex preblei</i> (2)	2	USA: Oregon, Harney County	AY014937	1140
		USA: Oregon, Harney County	AY014936	1140
<i>Sorex saussurei</i> (2)	2	*MEXICO: State of Jalisco, Bolaños	*FAC3205	1140
	4	*GUATEMALA: Departamento Huehuetenango, Municipio San Mateo Ixtatán	*MCNG789	1140
<i>Sorex sonomae</i> (2)	2	USA: California, Humboldt County	AF238027	801
		USA: California, Humboldt County	AF238026	801
<i>Sorex tenellus</i> (2)	2	USA: California, Lassen Volcanic	DQ086472	983
		USA: California, Mono County	AY014955	1140
<i>Sorex trowbridgii</i> (3)	2	USA: Oregon	AJ000464	1010
		USA: Oregon	AJ000463	1010
		USA: Washington, Kittitas County	AY014956	1140
<i>Sorex tundrensis</i> (2)	1	Russia: Moneron Island	AB244646	1140
		Russia: Moneron Island	AB244645	1140
<i>Sorex ugyunak</i> (2)	2	USA: Alaska, Galbraith Lake	AY014930	1140
		USA: Alaska, Seward Peninsula	AY014928	1140
<i>Sorex vagrans</i> (2)	2	USA: California, Sagehen Creek, Nevada County	AJ000454	1010
		USA: Montana, Lake County	AF154551	1140
<i>Sorex ventralis</i> (1)	3	*MEXICO: State of Puebla, San Martín Texmelucan	*CNMA26543	939
<i>Sorex veraecrucis</i> (4)	3	*MEXICO: State of Michoacán, Pátzcuaro	*BYU15995	1127
	2	*MEXICO: State of Nuevo León, Galeana	*FAC2960	1140

continued next page

**TABLE 2.** (continued)

Species	Specimen identification code	Location	Specimen no. and GenBank number	Base pairs (bp)
	3	*MEXICO: State of Oaxaca, Santa María Pápalo	*CNMA39369	1127
	4	*MEXICO: State of Chiapas, San Cristóbal de las Casas	*CNMA42918	1127
<i>Sorex veraepacis</i> (4)	3	*MEXICO: State of Guerrero, Omiltemi	*CNMA41838	1140
		*MEXICO: State of Guerrero, Omiltemi	*CNMA41839	1126
		*GUATEMALA: Departamento Huehuetenango, Municipio Todos los Santos Cuchumatán	*MCNG806	1137
	4	*GUATEMALA: Departamento Huehuetenango, Municipio Todos los Santos Cuchumatán	*MCNG823	1134

DNA was extracted from frozen or alcohol-preserved tissues of field collected specimens, or skin samples from museum specimens, following a proteinase K-phenol- chloroform protocol (Darbre 1999; Surzycki 2000). Some extractions from skins were performed using the DNeasy® Tissue Kit. Extraction from museum specimens was preceded by cleaning with STE (sodium chloride-Tris-EDTA) to remove impurities (Hillis *et al.* 1996).

Amplification of the mitochondrial cytochrome *b* gene (*cyt b*) was performed via polymerase chain reaction (PCR). Several primer pairs were used for PCR amplification and sequencing of *cyt b* gene (Table 3). Two protocols were used for the PCR: 1. Primers L-14115(A-Soricidae)/H-Sorex770 and L-14764Sorex/H-15895(E) were used, with an initial denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 45 or 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1.5 min. All amplifications were performed for 30 cycles (Lessa & Cook 1998). 2. Primers L-14115(A-Soricidae), MVZs, UNMF14 and UNMR17, with an initial denaturation at 94°C for 4 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min (Francisco X. González pers. comm.). In both cases the concentrations were: MgCl 3mM, Primers 0.4uM, Buffer 1X, dNTP's 2mM, Taq 1ul. PCR products were purified and sequenced in both directions with 25 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 50°C for 5 sec, and extension at 60°C for 4 min. We used 2µl Big Dye, 2µl 5 x Buffer, 1µl 1pM each primer and 2 ul of PCR product. Sequences were run on an Applied Biosystems 3100 DNA sequencer and assembled and aligned with Sequencher Version 4.7 and Bio Edit version 7.0.5 (Hall 1999).

An uncorrected (“*p*”) genetic distance matrix was generated using PAUP\* version 4.0b (Swofford 1999) to compare with other reports (e.g., Demboski & Cook 2001). The best fit model of DNA substitution was determined by hierarchical likelihood-ratio tests using MODELTEST Version 3.06 (Posada & Crandall 1998). Phylogenies and nodal support (posterior probabilities) were estimated using MrBayes, version 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Bayesian analysis was initiated with random starting trees, and run for 5 x 10<sup>6</sup> generations with four chains sampling every 1000 generations. Two independent replicates were conducted (Huelsenbeck & Imennov 2002). The stationary stage of the Markov chain was determined by plotting log-likelihood values against number of generations. The first 1000 trees sampled from generations preceding stationary were discarded as burn-in (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Data collected following burn-in were used to estimate nodal support as posterior probabilities.

Maximum likelihood (ML) and bootstrap analysis (Felsenstein 1985) were used to infer the phylogeny and nodal support using PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel 2003). Because the sequences have different lengths and missing data in different positions, we tested if sequence size variation might produce different tree topologies. Therefore, we ran two analyses, one with sequences from 647 to 1140 bp and the other with sequences from 647 to 827 bp.

Maximum likelihood was used to infer divergence times of different lineages. Molecular clock was estimated using r8s version 1.70 (Sanderson 2003); only one or two individuals for each species were used (43

sequences total). The divergence date of 20 million years between the subfamilies Crocidurinae and Soricinae was used as reference for the calibration of the molecular clock, this date has been used in previous studies of molecular clock for Soricidae shrews as an estimate of the time of the split between Crocidurinae and Soricinae subfamilies as suggested by the fossil record (Reumer 1994; Fumagalli *et al.* 1999).

**TABLE 3.** Primers used for PCR amplification. Due to the antiquity of some museum samples, we used primers in the following combinations: L-14115-MVZ06, MVZ03-MVZ04, MVZ05-MVZ04, MVZ05-MVZ10, MVZ03-MVZ10, MVZ45-MVZ16, MVZ45-MVZ26, MVZ23-MVZ16, MVZ03-H-Sorex770, MVZ17-MVZ14, MVZ23-MVZ16, UNMF14-MVZ14, MVZ17-UNMR17.

Primer name	Primer Sequence 5' ---> 3'	Source
L-14115	GACATGAAAAATCATCGTTG	Endo <i>et al.</i> (2004)
H-Sorex770	TTGAGGGGATTAGCGGGTGT	J. Demboski (pers. comm.)
L-14764Sorex	GGMGTVCACCTMCTATTCCT	J. Demboski (pers. comm.)
H-15895(E)	TAGAATGTCAGCTTTGGGTGCT	Ohdachi <i>et al.</i> (2001)
UNMF14	GGMGGHGTMCTAGCYYYTA GTC	Designed in this study
UNMR17	TATYASGCTDCGTTGTTTRGATGT	Designed in this study
MVZ03	GCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATG	Smith & Patton (1993)
MVZ04	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	Smith & Patton (1993)
MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	Smith & Patton (1993)
MVZ06	GCTGTGTCTGATGTGTAGTGTAT	Smith & Patton (1993)
MVZ07	AACCCCATCTAACATTTCLTCYTGATG	Smith & Patton (1993)
MVZ10	TATGAGCCGTAGTARAKKCTC	Smith & Patton (1993)
MVZ14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC	Smith & Patton (1993)
MVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT	Smith & Patton (1993)
MVZ17	ACCTCCTAGGAGAYCCAGAHAAAYT	Smith & Patton (1993)
MVZ23	TACTCTTCTCCACGAAACJGGNTC	Smith & Patton (1993)
MVZ26	AGATCTTTGATTGTGTAGTAGGGGT	Smith & Patton (1993)
MVZ45	ACJACHATAGCJACAGCATTCGTAGG	Smith & Patton (1993)

We assessed probabilities of the biogeographic origin of the clades through reconstruction of ancestral geographical origins with a maximum likelihood approach using Mesquite 2.0 software (Maddison & Maddison 2007). We followed the method used by Dubey *et al.* (2007) and coded the current geographical distribution of the species considering significant biogeographic barriers: (0) only Eurasia, (1) Eurasia and America, (2) North America north of the Trans Neovolcanic Belt of Mexico, (3) between Trans Neovolcanic Belt and the Tehuantepec Isthmus of Mexico and (4) south of the Tehuantepec Isthmus (Table 2). We used the Mk1 model of evolution (Lewis 2001) which assumes an equal rate of change between any two character states, and used the phylogenetic tree obtained from r8s.

## Results

### Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences

Cytochrome *b* gene was sequenced from 19 Mexican samples belonging to 11 species of *Sorex*. Due to marginal preservation conditions for some samples, different size fragments were obtained. Skins from museum specimens were the most difficult samples to assay, however, 15 sequences are > 1000 base pairs (bp) long, and four are 644–939 bp. Available GenBank sequences also differed in length (800–1140 bp; Table 2).

### Phylogenetic analysis

Fifty six models were tested by MODELTEST and GTR + I + G (-lnL = 11678.6426, A:0.3245, C: 0.3211, G:0.0970, T:0.2574, gamma = 1.4578) was the model chosen for Bayesian and maximum likelihood (ML) analysis (Figs. 1, 2). Bayesian and ML analyses showed very similar topologies, however, support values differed (Figs. 1, 2).

Bayesian analysis using short sequences of similar size (644 – 827 bp) produced a phylogenetic tree (not shown) similar to that generated by longer sequences size (644 – 1140 bp; Fig. 1). The former tree showed less structure, with polytomies and lower posterior probabilities possibly due to a reduction of phylogenetic signal, so we used the phylogenetic tree based on sequences ranging from 644 to 1140bp in length.

New World shrews of the genus *Sorex* are composed of two major clades, A and B (Fig. 1). Clade A consists of species of the *vagrans* group (Fig. 1-A.1; Hennings & Hoffmann 1977) and *S. hoyi*, the *cinereus* group (Fig. 1-A.2; van Zyll de Jong & Kirkland 1989), a few Mexican shrews and shrews from California and the Appalachian region of North America (Fig. 1-A.3).

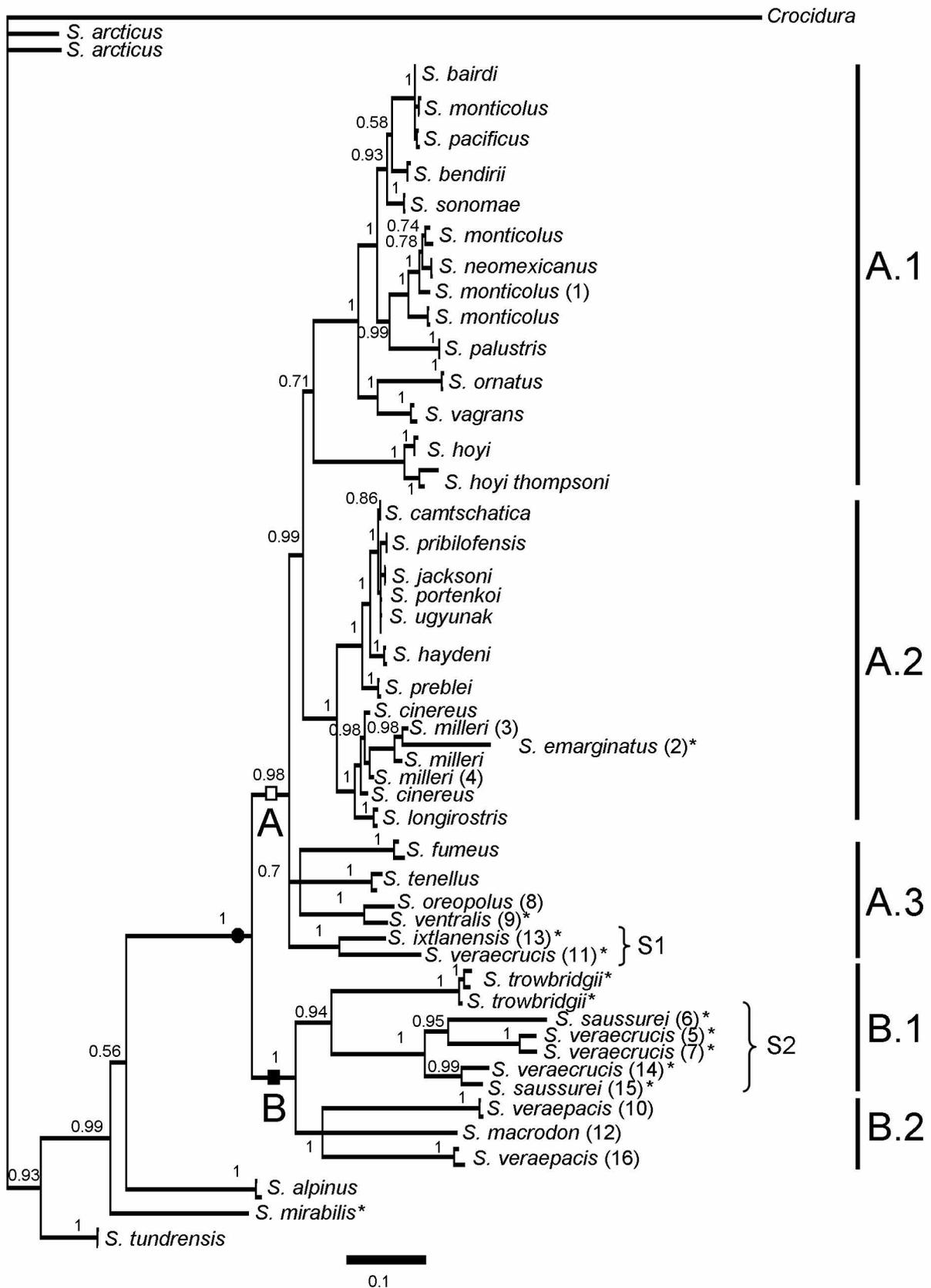
Clade A.1 indicates that *S. monticolus* from Durango (northern Mexico; Figs. 1, 3), is sister taxon to *S. monticolus* (New Mexico)—*S. neomexicanus*. This population of *S. monticolus* from Durango had not been included in previous phylogenetic analyses. Moreover, *S. monticolus* from British Columbia groups with *S. bairdi*. In addition, the species of the *vagrans* group share a common ancestor with the clade *S. hoyi* Baird 1857, although this split is supported by a relatively low posterior probability value.

Clade A.2 shows that the Mexican shrews *S. milleri* and *S. emarginatus* (Fig. 3) are monophyletic, but nested within *S. cinereus* Kerr 1792 from Alaska and Minnesota. *Sorex longirostris* (from Tennessee and Virginia) is sister to this group. Other members of clade A.2 represent northern members of the Beringian clade of the *cinereus* group. These did not group with Mexican samples of this clade.

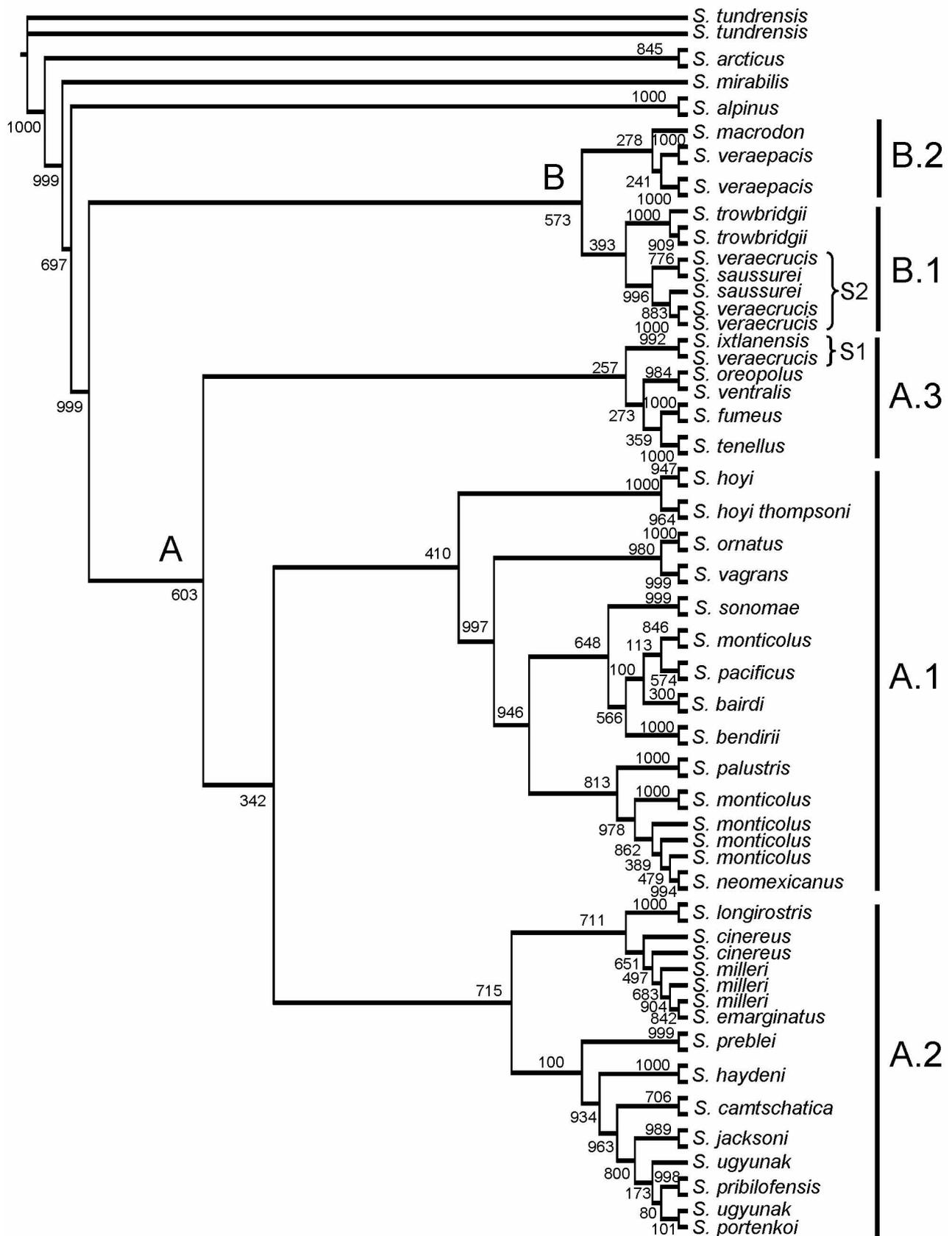
An unresolved group of basal species, A.3, shows *S. fumeus* and *S. tenellus* Merriam 1895 closely related to *S. oreopolus* and *S. ventralis*, which are sister species. These last two shrews are morphologically similar and are sympatric in the forests of the Trans Neovolcanic Belt of Central Mexico (Fig. 3). The samples of *S. veraecrucis* and *S. ixtlanensis* are from two mountain ranges of Oaxaca in southeastern Mexico (Sierra de Juárez in the north and Sierra Madre del Sur in the south), but group together (S1).

In contrast, the second major clade (B) includes only Mexican species of shrews and *S. trowbridgii* from California, which are sister to *S. saussurei* and *S. veraecrucis*. Samples of *S. saussurei* (S2) from mountain ranges in western (Sierra Madre Occidental) and samples of *S. veraecrucis* from eastern (Sierra Madre Oriental) and central (Trans Neovolcanic Belt) Mexico group together. Other samples of *S. veraecrucis* and *S. saussurei*, occurring in southeastern Mexico (Chiapas) and Guatemala beyond the Tehuantepec Isthmus, share a common ancestor (Fig. 3).

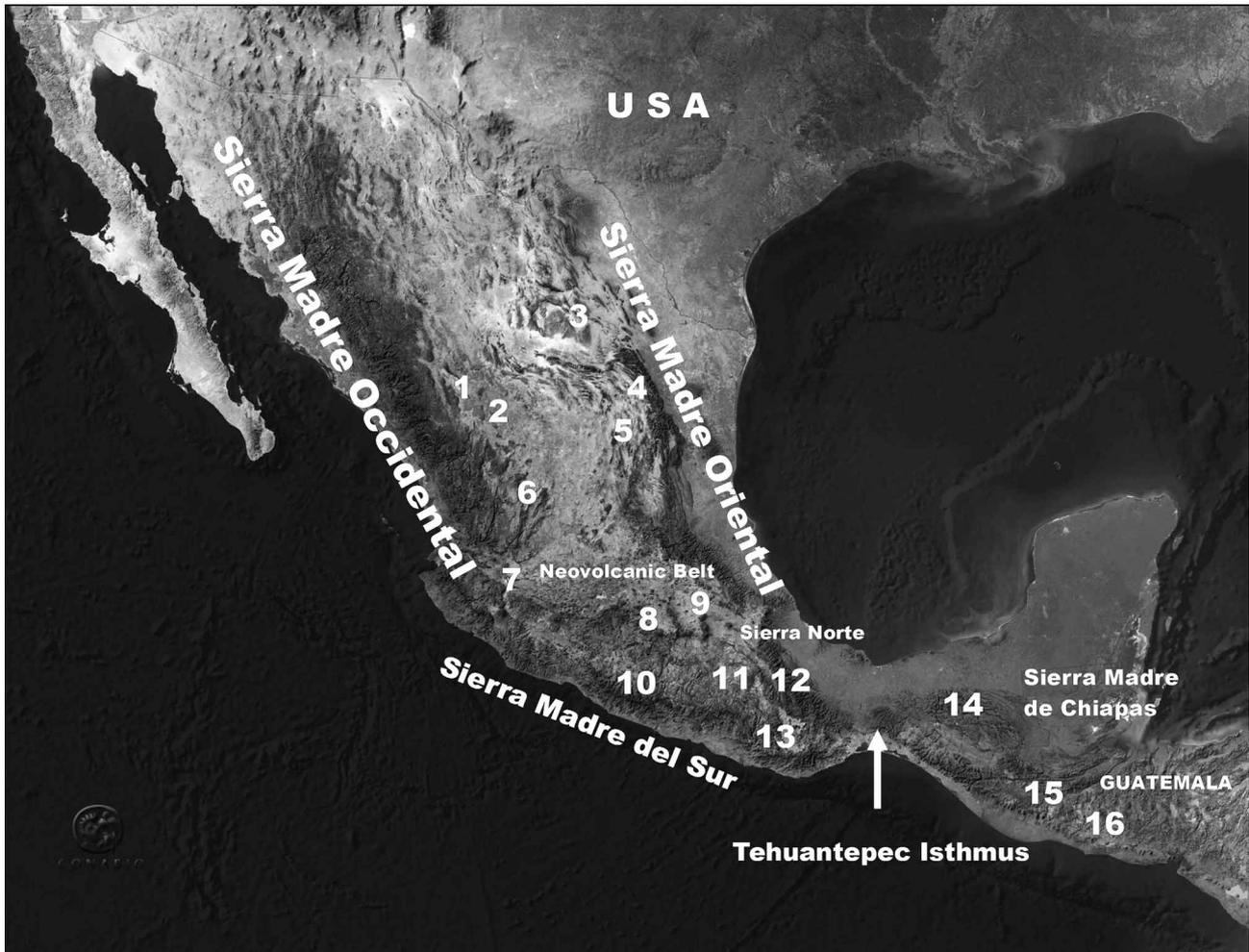
Another unresolved clade (Fig. 1-B.2) shows that *S. macrodon*, a highly endemic shrew of eastern (Veracruz) and southeastern (Oaxaca) Mexico is closely related to *S. veraepacis*. One of the samples of the *S. veraepacis* comes from a mountain range in Sierra Madre del Sur (Guerrero), southern Mexico, whereas the other sample (Guatemala) represents the southernmost distribution of the genus *Sorex* in the New World; these localities are east and west, respectively, of the Tehuantepec Isthmus (Fig. 3).



**FIGURE 1.** Phylogenetic relationships among long-tailed shrews of the genus *Sorex* from Mexico based on 77 mtDNA sequences of the cytochrome *b* gene. The tree represents the Bayesian analysis estimated through 6,000,000 generations. Numbers on branches indicate posterior probability values of nodal support. The numbers in parenthesis refer to the localities of samples from México (see Fig.3). Symbols point to the ancestral nodes of primary clades: A–B (●), A (□), B (■). \* Not yet classified to either subgenera *Sorex* or *Otisorex* (see Table 1).



**FIGURE 2.** Phylogenetic relationships among long-tailed shrews of the genus *Sorex* from Mexico based on 77 mtDNA sequences of the cytochrome *b* gene. The tree represents the maximum likelihood analysis. Numbers indicate bootstrap probability values of nodal support. Bayesian method identified the same supported clades.



**FIGURE 3.** Major mountain ranges of México (Conabio 2003) and geographical location of the collecting localities for Mexican samples of long-tailed shrew species of the genus *Sorex*. Durango: 1= *S. monticolus*, 2= *S. emarginatus*; Coahuila: 3= *S. milleri*; Nuevo León: 4= *S. milleri*, 5= *S. veraecrucis*; Jalisco: 6= *S. saussurei*; Michoacán: 7= *S. veraecrucis*; Distrito Federal: 8= *Sorex oreopolus*; Puebla: 9 = *S. ventralis*; Guerrero: 10= *S. veraepacis*; Oaxaca: 11= *S. veraecrucis*, 12 = *S. macrodon*, 13= *S. ixtilanensis*; Chiapas: 14= *S. veraecrucis*; Guatemala: 15= *S. saussurei*; 16 = *S. veraepacis*.

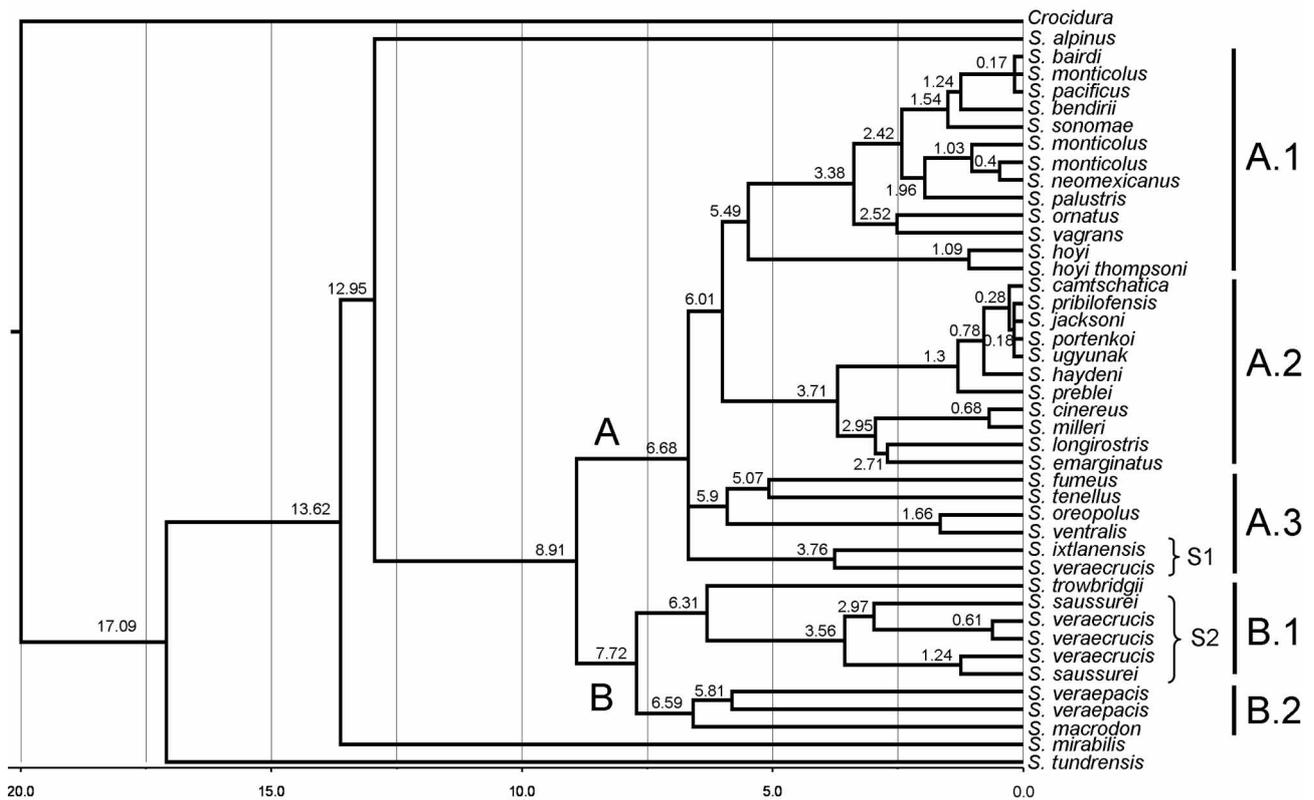
### Molecular clock and biogeographic analysis

Diversification of the *Otisorex* shrew taxa examined herein (i.e., divergence between major clades A and B; Fig. 4) was estimated to have begun 8.91 mya (Miocene) and ended 0.68 mya (Pleistocene). Separation of the *monticolus-vagrans* and *cinereus* clades (A), bifurcation between the populations from Sierra Norte and Sierra Madre del Sur of Oaxaca (S1), and divergence between *S. oreopolus* and *S. ventralis* (A.3) were dated in the Pliocene (1.6 mya). In contrast, the split between *S. cinereus* and *S. milleri* occurred more recently during the Pleistocene (680,000 years ago; - A.2).

Diversification of Clade B (Fig. 4) was estimated during the Miocene (5–10 mya). The split between *S. trowbridgii* and *S. saussurei-veraecrucis*, as well as the divergence between *S. macrodon* and *S. veraepacis* was during the late Miocene. Similarly, populations of *S. veraepacis* from Guerrero and Guatemala diverged about 5.81 mya. Finally, divergence between populations of this species from the Trans Neovolcanic Belt – Sierra Madre Oriental group and those from the Chiapas and Guatemala group was in the Pliocene (Fig. 4-B).

The ML assessment of the ancestral biogeographic origins indicates that *Otisorex* shrews have an American origin (Fig. 5). The probability that the ancestral node of the A-B clade has an American origin is

0.84, whereas the ancestral node of the A clade showed a probability of 0.93 of an American origin; a comparatively smaller value (0.82) suggests that the ancestral node of the B clade has the same origin.



**FIGURE 4.** Chronogram tree with the divergence time estimated of speciation events derived from the r8s test (version 1.7; Sanderson 2003). Numbers indicate millions of years.

## Discussion

Molecular systematics often provides key insight into species-level diversity, especially when applied to complex taxonomic groups that have otherwise proven problematic. Such is the case of southern North American shrews of the genus *Sorex*; a group that, based on this initial view of mitochondrial variation, exhibits substantial previously undetected diversity.

**Origin and diversification of North American long-tailed shrews, *Sorex (Otisorex)*.** The cytochrome *b* phylogenetic reconstruction presented herein is the most comprehensive molecular assessment of New World species of *Sorex* to date, even though a few North American species were not included. We identify a primary evolutionary split between most Palaearctic and Nearctic species of *Sorex* (Fig. 1). With the exception of *S. tundrensis* (found in northern Alaska and eastern Russia), all New World species we examined grouped in a clade that includes species in the subgenus *Otisorex*. This result is consistent with earlier molecular studies (Fumagalli *et al.* 1999; Ohdachi *et al.* 2006; Dubey *et al.* 2007; Shaffer & Stewart 2007). Also included in this clade are two Palaearctic endemics (*S. camtschatica* Yudin 1972, and *S. portenkoi* Stroganov 1956) of eastern Siberia. However, these two species are part of a previously identified Beringian clade within the *cinereus* complex that includes both Palaearctic and Nearctic species (Demboski & Cook, 2003). Relative to subgenus assignment, the previously enigmatic *S. trowbridgii* and *S. fumeus* (Findley 1955; George 1988; Ivanitskaya 1994) are part of the *Otisorex* clade. A rigorous test of whether the two nominal subgenera, *Otisorex* and *Sorex*, are valid will eventually require more complete worldwide sampling of all species in the genus *Sorex*. We identify two major clades within the North American *Otisorex* species (Fig. 1) that appear to be the result of an early split in North American soricine shrews. This division identifies clade A, which includes most North American (and Beringian) species of *Otisorex*, and clade B, which consists of *S. trowbridgii* (a Pacific

coastal species ranging from southern British Columbia to northern California) and three species found at the southern limits in North America of species of *Otisorex* (southern Mexico and Guatemala). Within *Otisorex*, the deep split into two clades has resulted in members of both clades reaching the southern latitudes of central Mexico likely via mountain ranges that included the Trans Neovolcanic Belt in Mexico. Only members of Clade B extend beyond the Isthmus of Tehuantepec, perhaps reflecting the influence of this important biogeographic barrier (Sullivan *et al.* 1997; Conroy *et al.* 2001).



**FIGURE 5.** ML reconstruction of ancestral geographical origins using Mesquite 2.0 software (Maddison & Maddison 2007). The current geographical distribution of the species was coded: (0) only Eurasia, (1) Eurasia and America, (2) North America north of the Trans Neovolcanic Belt of Mexico, (3) between Trans Neovolcanic Belt and the Tehuantepec Isthmus of Mexico and (4) south of the Tehuantepec Isthmus. The pie charts represent the proportional likelihoods of each character state.

**Phylogenetic relationships of long-tailed shrews (subgenus *Otisorex*) from México.** The *vagrans* group (A.1). In this group, specimens of *S. monticolus* from Mexico (Fig. 1) are allied with the continental *monticolus* clade proposed by Demboski & Cook (2001). The results are consistent with previous work that showed *S. monticolus* encompasses two distinct clades, coastal and continental, that are paraphyletic with respect to several other species of *Sorex* (Demboski & Cook 2001). In this case, *S. bairdi*, *S. pacificus*, *S. bendirii*, and *S. sonomae* Jackson 1921 are more closely allied with the coastal clade (Demboski & Cook 2001) of *S. monticolus*, while *S. palustris* Richardson 1828 and *S. neomexicanus* are more closely allied to the continental clade of *S. monticolus*. Hence, *S. monticolus* likely constitutes at least two independent species.

The position of *S. hoyi* has been debated and some (e.g., Findley 1955) indicated that this species formed a third distinct radiation, independent of the *Otisorex* and *Sorex* clades. George (1988) suggested this species belonged in *Otisorex* and previous mtDNA studies have supported this classification (Fumagalli *et al.* 1999; Ohdachi *et al.* 2006). The close association of *S. hoyi* and *S. thompsoni* Baird 1858 (Fig. 1-A.1) has been noted previously (Long 1974; Diersing 1980; Stewart *et al.* 2003; Shafer & Stewart 2007). Hutterer (2005) considered these species to be synonymous, consistent with the suggestion that *S. thompsoni* is a subspecies of *S. hoyi* (Long 1974; Diersing 1980). Genetic distances among *S. hoyi* samples, including *S. hoyi thompsoni*

(between 2.5 and 3.8%) found herein are not high (Table 4), but these relatively low values are similar to genetic distances among a few other nominal species of *Sorex*, which may raise questions related to rates of morphological and molecular divergence (e.g., *S. sonomae* and northern continental *S. monticolus*; Demboski & Cook 2001). Our molecular data suggest that *S. hoyi* and *S. thompsoni* may be conspecific. With regard to *S. hoyi*, the allozyme study of George (1988) identified a clade of *S. hoyi* and *S. vagrans* Baird 1857. In contrast, our mtDNA study (Fig. 1) places *S. hoyi* as sister taxon to the other species in the A.1 group, although this position is weakly supported.

Clade A.2 supported the relationship between the Russian species, *S. camtschatica* and *S. portenkoi*, and other North American members of the *cinereus* group (*S. ugunak* Anderson and Rand 1945, *S. pribilofensis* Merriam 1895, *S. jacksoni* Hall and Gilmore 1932, *S. haydeni* Baird 1857 and *S. preblei*; Demboski & Cook 2003; Hutterer 2005). The majority of these species are found at high latitudes with the exception of *S. haydeni* and *S. preblei*. This topology is congruent with the molecular study of Demboski & Cook (2003).

Our study showed that *S. cinereus* is most closely related to *S. milleri* and *S. emarginatus*. In the *cinereus* complex (clade A.2), *S. milleri* has been considered a relict species derived from *S. cinereus* (van Zyll de Jong & Kirkland 1989). *Sorex cinereus* has boreal affinities whereas the southerly distribution of *S. milleri* may indicate a tolerance of warmer climatic conditions (Hall 1981; Villa & Cervantes 2003; Hutterer 2005). Although these shrew populations are now separated by considerable geographical distance (ca. 2200 km), the genetic distance computed herein between these taxa is low (2%). The low genetic distance may reflect a much wider range for *S. cinereus* in southern North America when Pleistocene climatic conditions were cooler and wetter. Subsequent climatic shifts may have isolated *S. milleri* in northern Mexico (Kurtén & Anderson 1980; Toledo 1982; Luna & Alcántara 2001).

*Sorex emarginatus* (clade A.2) is an endemic species from northern Mexico with a close relationship to *S. milleri* and *S. cinereus* (Hall 1981; Villa & Cervantes 2003; Hutterer 2005). This first view of the phylogenetic position of *S. emarginatus* shows that this shrew is highly differentiated relative to other members of this clade and, more generally, to other species of *Sorex*. The genetic distance between *S. milleri* and *S. emarginatus* averages 6.7% (Table 4). The northern representative of this clade, *S. cinereus*, occurs widely across Canada and the United States, while the southern representative, *S. milleri*, is found in northern Mexico. *Sorex emarginatus* (southeastern United States) appears to have diverged from the *S. milleri*-*S. cinereus* group as early as the Pliocene (Fig. 4), but additional samples of *S. emarginatus* and multiple loci should be examined to more rigorously assess this point.

Though still a part of clade A, there are six species of *Sorex* that together are sister taxa to the A.1-A.2 groups of shrews (Fig. 1-A.3). The phylogenetic positions of these six species are not well defined, although four are in a weakly supported clade that includes *S. fumeus* and *S. tenellus* as sister to a well supported subclade of *S. oreopolus* and *S. ventralis*. *Sorex oreopolus* and *S. ventralis* are morphologically distinct species (Villa & Cervantes 2003; Carraway 2007), that are sympatric in the Trans Neovolcanic Belt. The mtDNA sequences reveal that they are about 4% different (Table 4). Also in this group (S1) are *S. ixtlanensis* and a few samples of *S. veraecrucis*. *Sorex veraecrucis* is polyphyletic in this mtDNA analysis and clearly in need of further taxonomic study. *Sorex ixtlanensis* is endemic to Guerrero and the mountain ranges in northern and southern Oaxaca. The sample examined here came from the south of Oaxaca where *S. veraepacis* and *S. veraecrucis* also occur. These three taxa are morphologically similar to each other (Carraway 2007), however, *S. ixtlanensis* is genetically distinct (7.8% ; Table 4) from its sister species, *S. veraecrucis* from northern Oaxaca.

The second major group (Clade B) of the subgenus *Otisorex*, includes species that had not previously been assigned to a subgenus. Clade B includes *S. trowbridgii*, samples of *S. saussurei* from Jalisco and Guatemala, sequences of *S. veraecrucis* from Nuevo Leon, Michoacan, Chiapas, *S. macrodon* from Oaxaca, and *S. veraepacis* from Guerrero and Guatemala. Significantly, this clade unites the enigmatic *S. trowbridgii* with a suite of southern shrews, thus revealing that the historical biogeography of *Otisorex* shrews in North America is complex, with multiple episodes of southern colonization of Mexico.

This mtDNA analysis places *S. trowbridgii* and *S. veraecrucis* and the southern branch of the paraphyletic *S. saussurei* (Clade S2) as sister taxa. This is the oldest clade and displays a wide geographical distribution.

*Sorex trowbridgii* occurs farther north along the coast, valleys and slopes of coastal mountains from California to southern British Columbia, *S. veraecrucis* is distributed from northern Mexico down to Guatemala, whereas *S. saussurei* is endemic to central Mexico (Hall 1981; Wilson & Ruff 1999). Previous studies placed *S. trowbridgii* in various nodes throughout the phylogenetic tree of the North American species ranging from sister taxon to an all-inclusive clade of both the subgenera *Otisorex* and *Sorex* (George 1988), to sister taxon to all species of only *Otisorex* (Fumagalli *et al.* 1999), to sister taxon to *S. saussurei* (Ohdachi *et al.* 2006). Inclusion of Mexican specimens has helped to resolve this long standing taxonomic question.

The polyphyletic nature of *S. veraecrucis* suggests further sampling and analyses are needed. In addition to the placement of an Oaxacan sample of *S. veraecrucis* in clade A, three populations of *S. veraecrucis* (S2) in clade B are deeply divergent from each other. Specimens of *S. veraecrucis* from Nuevo Leon and Michoacan form a clade and are distinct from the Jalisco population of *S. saussurei*. In turn, this clade is distinctive from populations of *S. veraecrucis* from Chiapas and *S. saussurei* from Guatemala. This southern clade may reflect isolation produced by the formation of the Isthmus of Tehuantepec as a geographical barrier. Hence, there is considerable geographic structure in this single nominal species with representatives from Mexico through the Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, in central Mexico in the Transversal Neovolcanic Belt, and then as far south as Guatemala.

*Sorex veraepacis*, as currently delimited, also shows considerable variability and is included in the second subclade within Clade B (Fig. 1). This species is morphologically similar to *S. veraecrucis* and *S. ixtlanensis* (from north and south of Oaxaca), however, molecular data suggest comparatively deep divergence among them (up to 15%; Table 4). Similarly *S. veraepacis* has a disjunct distribution with populations found to the west and east of the Isthmus of Tehuantepec that showed a considerable genetic distance of 15% (Table 4). *Sorex macrodon* is a poorly known shrew that occurs in Veracruz and Puebla, Mexico (Hall 1981; Villa & Cervantes 2003). This first perspective on its evolutionary affinities suggests that it is distantly related to *S. veraepacis* (Table 4).

Further research is needed to elucidate the molecular relationships and species limits of *S. saussurei* and *S. veraecrucis*. Morphological evidence indicates that *S. saussurei* likely represents multiple species (Carraway 2007). In addition, our molecular study showed deep intraspecific genetic differences among the samples of *S. veraecrucis* from Sierra Madre Oriental, Transversal Neovolcanic Belt and Oaxaca.

**Biogeography and molecular clock.** Diversification among North American long-tailed shrews has been attributed to vicariance events associated with environmental changes (George 1988; Demboski & Cook 2003; O'Neill *et al.* 2005). Our analysis is tentative as it is based on a single locus, but these preliminary data indicate that initial events related to the origin of *Sorex* shrews occurred during the Miocene, with the emergence of a large number of species in the Pliocene and then further diversification in the climatically variable Pleistocene (Clades A & B). This conclusion is largely in line with what other researchers have hypothesized (Findley 1955; George 1988; Churchfield 1990; Harris 1998). The split between the two major clades of *Otisorex* took place in North America during the Miocene, when most of the mountain ranges of the United States, Mexico and Guatemala were formed (Maldonado-Koerdell 1964; Halffter 1987; Ferrusquía-Villafranca 1993; González-Medrano 1998; Campbell 1999; Centeno-García 2004); our data support this scenario (Fig. 4-A.1 & A.2). The structured topology within and among species of *Otisorex* (Fig. 4) likely reflects the influence of biogeographic barriers that appear to be most critical in species with potentially low dispersal capability (Avice 2000; Hewitt 2004), but critical testing of individual species responses will require much more detailed geographic sampling and examination of independent genes.

The distribution of *S. monticolus* is wide and two primary clades have been identified. Demboski and Cook (2003) hypothesized that the northern and southern continental populations form a clade to the exclusion of Pacific coastal populations. Our results showed that Mexican populations of *S. monticolus* are more closely related to the southern continental group, than they are to the coastal forms. Southern continental populations of *S. monticolus* are located in the Rocky Mountains, thus our work extends the distribution of members of this clade southward to the Sierra Madre Occidental. Also in this major clade are the central Mexican species, *S. oreopolus* and *S. ventralis*, which are estimated to have diverged in the Miocene. These divergent taxa provide the first evidence of an early colonization of this phylogenetic lineage south to at least Oaxaca.

**TABLE 4.** Percent divergence in cytochrome *b* gene sequences among long-tailed shrews (genus *Sorex*) from Mexico and Guatemala.

	<i>Sorex monticolus</i> (Durango)	<i>Sorex milleri</i>	<i>Sorex emarginatus</i>	<i>Sorex oreopolus</i>	<i>Sorex ventralis</i>	<i>Sorex ixtlanensis</i> (Oaxaca south)	<i>Sorex veraecrucis</i> (Oaxaca north)	<i>Sorex saussurei</i> (Jalisco)	<i>Sorex veraecrucis</i> (Nuevo León)	<i>Sorex veraecrucis</i> (Michoacán)	<i>Sorex veraecrucis</i> (Chiapas)	<i>Sorex saussurei</i> (Guatemala)	<i>Sorex macrodon</i>	<i>Sorex veraepacis</i> (Guerrero)	<i>Sorex veraepacis</i> (Guatemala)
<i>Sorex monticolus</i> (Durango)	-----														
<i>Sorex milleri</i>	11.0– 12.2	-----													
<i>Sorex emarginatus</i>	13.9	4.8–8.4	-----												
<i>Sorex oreopolus</i>	11.5	9.4–9.8	10.7	-----											
<i>Sorex ventralis</i>	12.0	6.9–9.7	11.3	4.1	-----										
<i>Sorex ixtlanensis</i> (Oaxaca south)	11.3	10.6–11.7	12.2	9.9	11.7	-----									
<i>Sorex veraecrucis</i> (Oaxaca north)	13.2	11.2–12.0	13.4	11.7	12.8	7.8	-----								
<i>Sorex saussurei</i> (Jalisco)	15.2	14.6–15.5	11.0	13.3	15.1	13.6	14.3	-----							
<i>Sorex veraecrucis</i> (Nuevo León)	14.9	15.1–17.2	15.6	14.0	15.5	14.2	15.6	10.7	-----						
<i>Sorex veraecrucis</i> (Michoacán)	15.9	15.5–17.2	16.8	14.2	15.9	14.4	16.2	10.9	2.9	-----					
<i>Sorex veraecrucis</i> (Chiapas)	14.1	15.4–17.3	14.9	13.5	14.8	15.3	16.0	10.7	9.6	9.7	-----				
<i>Sorex saussurei</i> (Guatemala)	14.0	15.6–17.5	14.8	13.2	15.0	13.6	14.6	10.1	9.5	9.7	4.0	-----			
<i>Sorex macrodon</i>	15.0	9.0–11.3	10.3	10.9	12.7	12.7	14.6	14.7	15.1	15.4	14.8	14.0	-----		
<i>Sorex veraepacis</i> (Guerrero)	15.0	13.0–13.8	14.5– 14.9	15.1	15.5– 15.6	15.3– 15.4	15.1 – 15.3	15.9	14.9– 15.0	15.0 15.2	14.3– 14.5	14.6	14.0	-----	
<i>Sorex veraepacis</i> (Guatemala)	15.7	14.1–15.7	18.1– 18.6	14.0– 14.6	15.3	14.0– 14.2	15.1– 15.4	15.5– 15.9	13.1– 13.2	13.0– 13.2	14.1– 14.2	12.6– 12.7	13.0– 13.3	14.5– 14.7	

The second major clade (B) of Mexican and Guatemalan shrews in the subgenus *Otisorex* includes *S. veraepacis* and *S. saussurei*, which had not been previously classified (Fig. 1). In both of these species, the Isthmus of Tehuantepec, may have played a role as a biogeographic barrier in the evolutionary divergence of each of these neotropical shrew taxa. The southernmost distribution of the long-tailed shrews of the genus *Sorex* in the New World is *S. veraepacis* of the highlands of Guatemala (Matson 2008). These species, *S. macrodon*, and *S. trowbridgii* form clade B (Fig. 4) and this arrangement reinforces the idea that the Mexican/Guatemalan shrews belong to one of the oldest evolutionary lineages of Soricidae in North America (7.72 mya). Our data suggest two distinct arrivals of independent lineages of *Sorex* to southern Mexico that differ by at least one million years. The first wave (7.72 mya) reached the mountain region of the highlands of Guatemala and gave rise to species identified as *S. veraepacis* (Guerrero and Guatemala), *S. macrodon* (Oaxaca), *S. veraecrucis* (Nuevo Leon, Michoacan, Chiapas), *S. saussurei* (Jalisco and Guatemala), and *S. trowbridgii* (United States). The second migration event (6.68 mya) colonized areas only as far south as southwestern Mexico and this lineage eventually differentiated into the *vagrans* group, *cinereus* group, *S. fumeus*, *S. tenellus*, *S. oreopolus*, *S. ventralis* and *S. veraecrucis* and *S. ixtlanensis*.

In summary, this paper establishes an initial view of diversification in Mexican and Guatemalan shrews and provides an opportunity to further test and refine our understanding of their evolution. Expanded research initiatives that are focused on these southern species of long-tailed shrews are necessary to understand the pattern and tempo of diversification at the southern limit of their distribution in the New World.

## Acknowledgments

We thank our Mexican collaborators who helped in the field work. Tissues and skin samples were provided graciously by R. M. Timm from The University of Kansas (KU); Celia López from Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Unidad Durango IPN; Consuelo Lorenzo from El Colegio de la Frontera Sur (ECO-SC-M), Chiapas, México; Sergio Pérez from Museo de Historia Natural, Universidad San Carlos de Guatemala; and D. S. Rogers from Brigham Young University (BYU). We also thank the Posgrado en Ciencias Biológicas (Graduate School Program) of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT, México) for financial support to ME. This study was also supported in part by a National Science Foundation grant (NSF 0415668) to JAC. Andrew Hope and two anonymous reviewers provided suggestions that improved this manuscript. We dedicate this contribution to Oscar J. Polaco, outstanding scholar, colleague and teacher, whose academic work has promoted the knowledge of Mexican biodiversity.

## References

- Avice, J.C. (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, London, England, 447 pp.
- Campbell, J.A. (1999) Distribution patterns of amphibians in Middle America. In: Duellman, W.E. (Ed.), *Patterns of distribution of amphibians. A Global Perspective*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, pp. 111–210.
- Carraway, L.N. (1990) A morphologic and morphometric analysis of the “*Sorex vagrans* species complex” in the pacific coast region. *Special publications. The Museum Texas Tech University*, 32, 1–76.
- Carraway, L.N. (2007) Shrews (Eulypotyphla: Soricidae) of Mexico. *Monographs of the Western North American Naturalist*, 3, 1–91.
- Centeno-García, E. (2004) Configuración geológica del Estado. In: García-Mendoza, A. M. de J. Ordoñez & M. Briones-Salas (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*, Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund, pp. 29–42.
- Churchfield, S. (1990) *The natural history of shrews*. Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press, Cornell, USA, 178 pp.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2003) México: Imagen desde el espacio. Conabio, México. Mosaico 2002 de imágenes Modis sin nubes del satélite Terra, bandas 1,4,3 (RGB), resolución espacial 250

metros, sobre un modelo digital de terreno.

- Conroy, C.J., Hortelano, Y., Cervantes, F. & Cook, J.A. (2001) The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus*. *Mammalian Biology* (Zeitschrift für Säugetierkunde) 66, 332–344.
- Darbre, P.D. (1999) *Basic molecular biology: essential techniques*. Wiley, New York, 193 pp.
- Demboski, J.R. & Cook, J.A. (2001) Phylogeography of the dusky shrew, *Sorex monticolus* (Insectivora, Soricidae): insight into deep and shallow history in northwestern North America. *Molecular Ecology*, 10, 1227–1240.
- Demboski, J.R. & Cook, J.A. (2003) Phylogenetic Diversification within the *Sorex cinereus* group (Soricidae). *Journal of Mammalogy*, 84, 144–158.
- Diersing, V.E. (1980) Systematics and Evolution of the pygmy shrews (Subgenus *Microsorex*) of North America. *Journal of Mammalogy*, 61, 76–101.
- Dokuchaev, N.E. (1997) A new species of shrew (Soricidae, Insectivora) from Alaska. *Journal of Mammalogy*, 78, 811–817.
- Dubey, S., Salamin, N., Ohdachi, S.D., Barriere, P. & Vogel, P. (2007) Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia:Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 126–137.
- Endo, H., Fukuta, K., Kimura, J., Sasaki, M., Hayashi, Y. & Oshida, T. (2004) Phylogenetic relationships among populations of the mouse deer in the Southeast Asian Region from the nucleotide sequence of cytochrome *b* gene. *Mammal Study*, 29, 119–123.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1993) 1. Geology of Mexico: a synopsis. In: (Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A. & Fa, J. (Eds.) *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*. Oxford University Press, New York, pp. 3–107.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Findley, J.S. (1955) Taxonomy and distribution of some American shrews. *University of Kansas Publications Museum of Natural History*, 7, 613–618.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Stewart, D.T., Gielly, L., Hausser, J. & Vogel, P. (1999) Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* shrews (Soricidae: Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11, 222–235.
- George, S.B. (1988) Systematics, historical biogeography, and evolution of the genus *Sorex*. *Journal of Mammalogy*, 69, 443–461.
- George, S.B. & Sarich, V.M. (1994) Albumin evolution in the Soricinae and its implications for the phylogenetic history of the Soricidae. In: Merritt, J.F., Kirkland, Jr., G. L. & Rose, R. K. (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews*. Carnegie Mus. Nat. Hist. Spec. Publ. 18, 289–293.
- González-Medrano, F. (1998) La vegetación de México y su historia. *Ciencias*, 52, 8–65.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.
- Halfpiter, G. (1987) Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual Review of Entomology*, 32, 95–114.
- Hall, E.R. (1981) *The mammals of North America*. John Wiley & Sons. New York, 1:1–600 + 90 pp.
- 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. In: Wójcik, J.M. & Wolsan, M. (Eds.), *Evolution of Shrews*. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, pp. 133–156.
- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 359, 183–195.
- Hennings, D. & Hoffmann, R.S. (1977) A review of the taxonomy of the *Sorex vagrans* species complex from western North America. *Univ. Kans. Publ., Mus. Nat. Hist.* 68, 1–35.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, 655 pp.
- Huelsenbeck, J.P. & Imennov, N.S. (2002) Geographic origin of human mitochondrial DNA: accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. *Systematic Biology*, 51, 155–165.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Hutterer, R. (2005) Order Insectivora. In: Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (Eds.), *Mammal Species of the World*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 282–300.
- Ivanitskaya, E.Y. (1994) Comparative cytogenetics and systematic of *Sorex*, a cladistic approach. In: Merritt, J. F., Kirkland, G., & R. K. Rose, (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews*. Carnegie Museum of Natural History Special Publication, Pittsburgh, pp. 313–323,
- Junge, J.A. & Hoffmann, R.S. (1981) An annotated key to the long-tailed shrews (genus *Sorex*) of the United States and Canada, with notes on Middle American *Sorex*. *Occasional Papers of Museum of Natural History of the University of Kansas*, 94, 1–48.
- Kurtén, B. & Anderson, E. (1980) *Pleistocene mammals of North America*. Columbia University Press, New York.
- Lessa, E.P. & Cook, J.A. (1998) The molecular phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae)

- suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9, 88–99.
- Lewis, P.O. (2001) A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, 50, 913–925.
- Long, C.A. (1974) *Microsorex hoyi* and *Microsorex thompsoni*. *Mammalian Species*, 33, 1–4.
- Luna Vega, I. & Alcántara Ayala, O. (2001) Análisis de simplicidad de endemismos (PAE) para establecer un modelo de vicarianza preliminar del bosque mesófilo de montaña mexicano. In: Llorente Bousquets, J. & Morrone, J. J. (Eds.), *Introducción a la Biogeografía en Latinoamérica: Teorías, Conceptos, Métodos y Aplicaciones*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 273–277.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2007) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Versión 2.0 <http://mesquiteproject.org>
- Maldonado-Koerdell, M. (1964) Geohistory and paleogeography of Middle America. In: West, R. C. (Ed.), *Handbook of Middle American Indians Vol. 1*. University of Texas Press Austin, pp. 3–32.
- Matson, J.O. (2008) Intrapopulation variation in Ibarra's Verapaz shrew (*Sorex veraepacis ibarraei*) from Guatemala. *Mammalian Biology*, 73, 66–69.
- Nagorsen, D. & Panter, N. (2009) Identification and status of the Olympic shrew (*Sorex rohweri*) in British Columbia. *Northwestern Naturalist*, 90, 117–129.
- Ohdachi, S.N., Dokuchaev, E., Hasegawa, M. & Masuda, R. (2001) Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences. *Molecular Ecology*, 10, 2199–2213.
- Ohdachi, S.D., Hasegawa, M., Iwasa, M.A., Vogel, P., Oshida, T., Lin An, L.K. & Abe, H. (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.
- O'Neill, M.B., Nagorsen, D.W. & Baker, R.J. (2005) Mitochondrial DNA variation in water shrews (*Sorex palustris*, *Sorex bendirii*) from western North America: implications for taxonomy and phylogeography. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 1469–1475.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1, 817–818.
- Rausch, R.L., Feagin, J. & Rausch, V.R. (2007) *Sorex rohweri* sp. nov. (Mammalia, Soricidae) from northwestern North America. *Mammalian Biology*, 72, 93–105.
- Repenning, C.A. (1967) Subfamilies and genera of the Soricidae. *United States Geological Survey Professional Paper*, 565, 1–74.
- Reumer, J.W.F. (1994) Phylogeny and distribution of the Crocidosoricinae (Mammalia: Soricidae). In: Merritt, J.F., Kirkland Jr., G. L. & Rose, R. K. (Eds.), *Advances in the Biology of Shrews*. Carnegie Mus. Nat. Hist. Spec. Publ. 18, 345–356.
- Sanderson, M.J. (2003) r8s; inferring absolute rates of evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*, 19, 301–302.
- Shafer, A.B.A. & Stewart, D.T. (2007) Phylogenetic relationships among Nearctic shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Soricidae) inferred from combined cytochrome *b* and inter-SINE fingerprint data using Bayesian analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 192–203.
- Smith, M.F. & Patton, J.L. (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50, 149–177.
- Stewart, D.T., McPherson, Robichaud, M. & Fumagalli, J. (2003) Are there two species of pigmy shrews (*Sorex*)? Revisiting the question using DNA sequence data. *Can Field-Nat*, 117, 82–88.
- Storch, G., Qiu, Z.H. & Zazhigin, V.S. (1998) Fossil history of shrews in Asia. In: Wójcik, J.M. & Wolsan, M. (Eds.), *Evolution of Shrews*. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, pp. 92–117.
- Sullivan, J, Markert, J.A. & Kilpatrick, C.W. (1997) Phylogeography and molecular systematic of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology*, 46, 426–440.
- Surzycki, S. (2000) *Basic techniques in molecular biology*. Springer, Berlin, 434 pp.
- Swofford, D.L. (1999) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods) PAUP\* 4.0*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA..
- Toledo, V.M. (1982) Pleistocene changes in vegetation in tropical Mexico. In: Prance, G. T. (Ed.), *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York, pp. 93–111.
- Villa, B. & Cervantes, F. (2003) *Los mamíferos de México*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 140 pp.
- Van Zyll de Jong, C.G. & Kirkland JR., G.L. (1989) A morphometric analysis of the *Sorex cinereus* group in central and eastern North America. *Journal of Mammalogy*, 70, 110–122.
- Wilson, D.E. & Ruff, S. (1999) *The Smithsonian Book of North American Mammals*. American Society of Mammalogists. Washington, D. C., 750 pp.

## CAPÍTULO II

### RELACIONES FILOGENÉTICAS E INFERENCIAS FILOGEOGRÁFICAS DE LA MUSARAÑA *SOEX SAUSSUREI* Y SUS ESPECIES AFINES EN MÉXICO (SORICOMORPHA: SORICIDAE)

#### INTRODUCCIÓN

Después de haber obtenido una aproximación de las relaciones filogenéticas de las especies de musarañas mexicanas en la topología general de las musarañas del continente Americano (Capítulo I), utilizamos un mayor número de muestras, a lo largo de un área más amplia de muestreo, e hicimos un acercamiento a la historia de los linajes con distribución en México y un análisis filogeográfico.

La filogeografía permite evaluar los aspectos históricos de la distribución espacial contemporánea de linajes de los genes. A través de esta disciplina y mediante el uso del ADN mitocondrial, ha sido posible precisar la relación entre la distribución geográfica y los patrones de diversidad y estructura genética de las especies, además de los procesos evolutivos asociados. Con ello se tiene un mejor entendimiento de la biogeografía regional y las áreas de endemismo, además de poder describir los patrones de colonización, migración y diversificación de las especies (Avise 1998; Bermingham y Moritz 1998; Hewitt 2001).

Estos estudios han sido particularmente efectivos para demostrar la influencia de los ciclos glaciares del Pleistoceno en la estructura genética de la fauna continental, como en el caso de las musarañas del oeste de los Estados Unidos de Norteamérica, Alaska y Canadá (Demboski y Cook 2001, 2003; Maldonado 2000; O'Neill et al. 2005). La magnitud y el patrón geográfico de la estructura genética de las poblaciones de una especie es el resultado

tanto de su historia biogeográfica como de los eventos contemporáneos. La divergencia de los grupos de ADN mitocondrial en las especies también puede estar asociada con eventos tectónicos que de alguna manera favorecieron la acción prolongada de barreras geográficas que impidieron el flujo génico y que son independientes de los efectos de las glaciaciones (Dodson et al. 1995; Gübitz et al. 2000).

Los patrones filogeográficos de diferentes especies de vertebrados, particularmente de mamíferos terrestres y pequeños con escasa capacidad de dispersión, como es el caso de las musarañas, muestran una diferenciación profunda a nivel intraespecífico (Avice 2000; Demboski y Cook 2001, 2003). Los estudios filogeográficos de musarañas que se distribuyen en América del Norte han evidenciado el efecto de las barreras geográficas, la importancia de las glaciaciones pleistocénicas y cómo afectaron sus consecuencias en el patrón biogeográfico de estos mamíferos (Demboski y Cook 2001, 2003; Maldonado et al. 2001). Sin embargo, sólo en algunos trabajos se han incluido ejemplares de musarañas colectadas en México (Maldonado et al. 2001; Ohdachi et al. 2006).

A pesar de los pocos trabajos taxonómicos acerca de las musarañas con distribución en México, éstos han evidenciado la alta diversidad de especies, pero también lo complejo que es su identificación (Carraway 2007). Inicialmente nuestro objeto fue evaluar a *Sorex saussurei*, con seis subespecies (*S. s. saussurei*, *S. s. veraecrucis*, *S. s. oaxacae*, *S. s. cristobalensis*, *S. s. godmani* y *S. s. salvini*; Hall 1981; Hutterer 1993). Este arreglo taxonómico ha cambiado y, lo que antes se consideraba una sola especie, ahora son tres especies diferentes: *S. mediopua*, *S. saussurei* y *S. veraecrucis*, esta última con tres subespecies *S. v. altoensis*, *S. v. oaxacae* y *S. v. cristobalensis* (Carraway 2007; Hutterer 2005). Así, *S. veraecrucis* es ahora la especie que presenta una distribución más amplia con

registros desde Durango, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas hasta el centro, sur y sureste del país con límites en Chiapas.

La distribución de este grupo de especies coincide con la de otros mamíferos pequeños (*Microtus*, Conroy et al. 2001; *Neotoma mexicana*, Edwards y Bradley 2002; *Peromyscus fuvvus*, Harris et al. 2000; complejo *Peromyscus aztecus/Peromyscus hylocetes*, Sullivan et al. 1997; *Reithrodontomys sumichrasti*, Sullivan et al. 2000). Estas especies han sido estudiadas bajo enfoques filogenéticos y filogeográficos, con ADN mitocondrial, y han demostrado también una diferenciación filogeográfica profunda. A partir de estos trabajos se ha planteado, con algunas variantes, que las poblaciones que se encuentran en la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, el Eje Neovolcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre de Oaxaca y la Sierra Madre de Chiapas, forman un grupo monofilético de haplotipos (Conroy et al. 2001; Edwards y Bradley 2002; Harris et al. 2000; Sullivan et al. 1997, 2000).

Dicha topología está relacionada con la colonización de esta región por estos organismos durante los períodos más fríos y húmedos, cuando la vegetación tenía una distribución continua. Sin embargo, cuando el ambiente se volvió más seco y cálido las poblaciones comenzaron a aislarse en las partes más altas. En un análisis de simplicidad de endemismos (PAE) para el bosque mesófilo de montaña mexicano se propone que fragmentos extensos de bosque mesófilo divergieron y se aislaron secuencialmente de un bosque ancestral más continuo (Luna y Alcántara 2001). Este aislamiento se ha relacionado con la contracción de los bosques mesófilo de montaña y de pino-encino que también estuvieron influenciados por los cambios climáticos. El ciclo de colonización y aislamiento pudo haber ocurrido varias veces durante el Pleistoceno, y haber contribuido a la compleja

historia biogeográfica de la región (Conroy et al. 2001; Sullivan et al. 1997, 2000; Toledo 1982).

Los resultados de los estudios de ADN mitocondrial de mamíferos pequeños mencionados anteriormente, permiten establecer que las poblaciones de la Sierra Norte de Oaxaca, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur (al oeste del Istmo de Tehuantepec), tienen una historia biogeográfica similar. Asimismo, con base en los bajos niveles de divergencia observados, se ha concluido que existe un flujo génico entre las poblaciones de la Sierra Norte de Oaxaca y la Sierra Madre del Sur (Conroy et al. 2001; Edwards y Bradley 2002; Harris et al. 2000; Sullivan et al. 1997, 2000). Sin embargo, las poblaciones que se encuentran en Chiapas y Guatemala, al este del Istmo de Tehuantepec, son distintas filogeográficamente, presentando valores muy altos de divergencia genética (*Peromyscus aztecus*,  $D = 7.5-9.1\%$ ; *Neotoma mexicana*,  $D = 7.82\%$ ; Edwards y Bradley 2002; Sullivan et al. 1997). En estos dos últimos estudios, estas poblaciones consideradas de la misma especie o subespecie, son propuestas como diferentes. Estos resultados sugieren que el Istmo de Tehuantepec separó estas poblaciones probablemente durante el Pleistoceno (Edwards y Bradley 2002; Sullivan et al. 1997, 2000). Por otro lado, el estudio de las especies hermanas que se distribuyen a cada lado del Istmo de Tehuantepec, mostró que tienen nichos ecológicos muy semejantes, por lo que el Istmo es un ejemplo de que las barreras geográficas son una de las fuerzas principales en la generación de nuevos taxa, (Campbell 1999; Flores-Villela 1993; Peterson et al. 1999; Toledo 1982; Wuethrich 1999). Apoyando la teoría de que en una escala de algunos millones de años, la especiación toma lugar en una dimensión geográfica y que las diferencias ecológicas evolucionan posteriormente (Peterson et al. 1999).

El efecto de esta barrera se ha observado no sólo en mamíferos sino también en anfibios y reptiles, cuyo estudio confirma también la propuesta de que las poblaciones ancestrales se dispersaron a través de corredores que posteriormente desaparecieron dando lugar a procesos de vicarianza (Campbell 1984). En otros organismos como los insectos, el Istmo ha funcionado como una barrera geográfica efectiva, y se ha visto que la composición de este grupo al este del Istmo tiene afinidades Neárticas y en el oeste dominan los elementos mesoamericanos (Halffter 1987; Morrone y Márquez 2001). En los trabajos biogeográficos realizados exclusivamente con insectos y en los trabajos con insectos, aves y plantas en conjunto, se observó una afinidad faunística entre la Sierra Madre del Sur y la Sierra Madre Oriental (Liebherr 1991; Morrone et al. 1999; Morrone y Márquez 2001). A través del análisis del número de especies de mamíferos pequeños terrestres localizados en el bosque mesófilo de montaña de siete sistemas montañosos mesoamericanos (Eje Neovolcánico Transversal, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre de Oaxaca, Sierra Madre del Sur-Oeste, Sierra Madre del Sur-Este, Núcleo Centroamericano y Sierra Talamancana; Carleton et al. 2002), se establecieron también afinidades faunísticas muy similares a las que se encontraron en los estudios de ADN mitocondrial de roedores. Los resultados sugieren que en el pasado existieron conexiones bióticas entre estas cadenas montañosas y que posteriormente, sucedieron eventos de vicarianza (Carleton et al. 2002).

La distribución de este grupo de especies: *Sorex veraecrucis*, *S. orizabae* y *S. saussurei* está estrechamente relacionada con estos procesos. El Istmo de Tehuantepec se formó entre el Mioceno y el Plioceno y, el Eje Neovolcánico Transversal entre el Plioceno y el Pleistoceno. Al término del Plioceno, en México ya se habían formado la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental, el Altiplano, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre

de Chiapas y, en Guatemala: la Sierra de las Minas, la Sierra de Chuacús y la Sierra de los Cuchumatanes (Campbell 1999; Ferrusquía-Villafranca 1993; González-Medrano 1998; Halfpter 1987; Maldonado-Koerdell 1964). Entre el Mioceno y el Plioceno, sucedió la migración de los ancestros del género *Sorex*, la formación del género, su divergencia en dos subgéneros y, finalmente durante el Pleistoceno, la diversificación y establecimiento de numerosas especies (Churchfield 1990; Findley 1955; George 1988; Harris 1998).

*Sorex veraecrucis*, *S. orizabae* y *S. saussurei* son especies que se encuentran principalmente en lugares con vegetación de bosque de coníferas, bosque de encino y bosque mesófilo de montaña. Esta característica se repite en poblaciones que se encuentran al norte del Eje Neovolcánico Transversal, en el Eje mismo, hacia el sur y al este del Istmo de Tehuantepec hasta Guatemala, lo que permite suponer que estas especies ocuparon estos territorios cuando dicha vegetación tuvo una distribución continua. Los cambios en el área de distribución por la contracción y la expansión de estos tipos de vegetación debieron haber impactado a las poblaciones de estos organismos y, es muy probable que se refleje en su filogenia.

Con base en los trabajos filogeográficos y filogenéticos realizados con otras especies de mamíferos pequeños que se distribuyen en el centro y el sureste del país, y en la historia geológica del mismo, se plantea la hipótesis de que las poblaciones de *Sorex veraecrucis*, *S. orizabae*, *S. saussurei* localizadas en la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, el Eje Neovolcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Norte de Oaxaca, la Sierra Madre de Chiapas, la Sierra de Minas, la Sierra de Chuacús y la Sierra de los Cuchumatanes, forman un grupo monofilético. Nuestra hipótesis supone que el clado formado por las poblaciones que se encuentran al este del Istmo de Tehuantepec,

probablemente tengan valores altos de distancia genética con respecto a las poblaciones del oeste del Istmo e, incluso podrían detectarse haplotipos únicos. Se proponen como más cercanas entre sí a las poblaciones de la Sierra Madre de Oaxaca, la Sierra Madre Oriental, el Altiplano y la Sierra Madre del Sur, clado al cual estará asociado otro formado por las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal y, finalmente la población de la Sierra Madre-Occidental (Figs. 6 y 7).

El estudio filogeográfico de este grupo de especies *Sorex veraecrucis*, *S. orizabae*, *S. saussurei* permitirá conocer la estructura genética de sus poblaciones y sus relaciones genealógicas, de tal manera que será posible deducir cuáles fueron los procesos que generaron la distribución geográfica de sus haplotipos. La distribución del grupo de especies *Sorex veraecrucis*, *S. orizabae*, *S. saussurei* es más amplia que la de la mayoría de las especies de mamíferos pequeños citados anteriormente, por lo que su estudio nos permitiría no sólo confirmar las topologías propuestas por estos autores, sino complementarlas con los datos de poblaciones más norteñas y la posibilidad de conocer de manera más completa cómo fue el proceso de colonización.

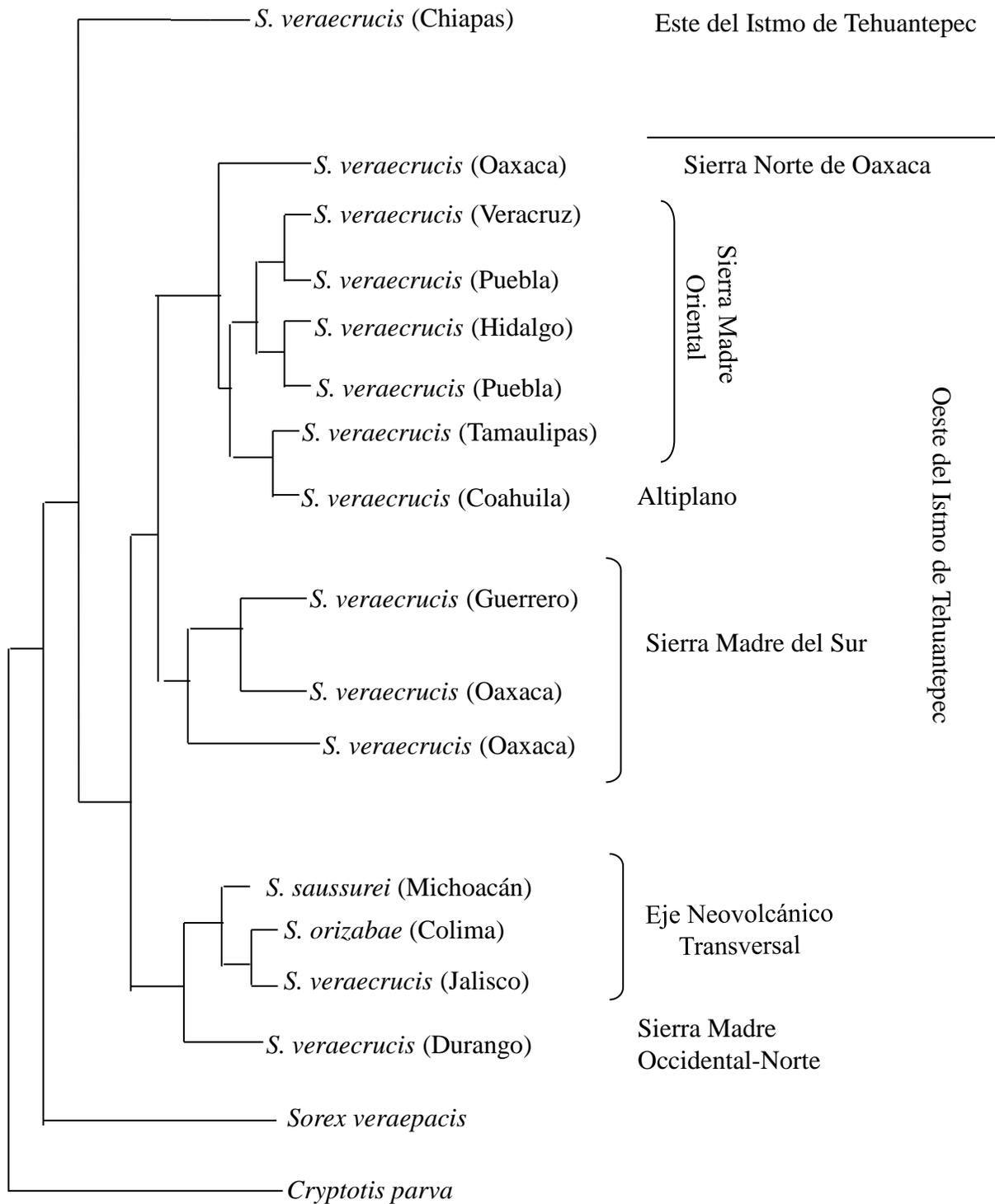


Fig. 6.-Topología esperada de las relaciones de parentesco entre muestras de *Sorex veraecrucis*, *S. saussurei* y *S. veraepacis* con base en el análisis de ADN mitocondrial.

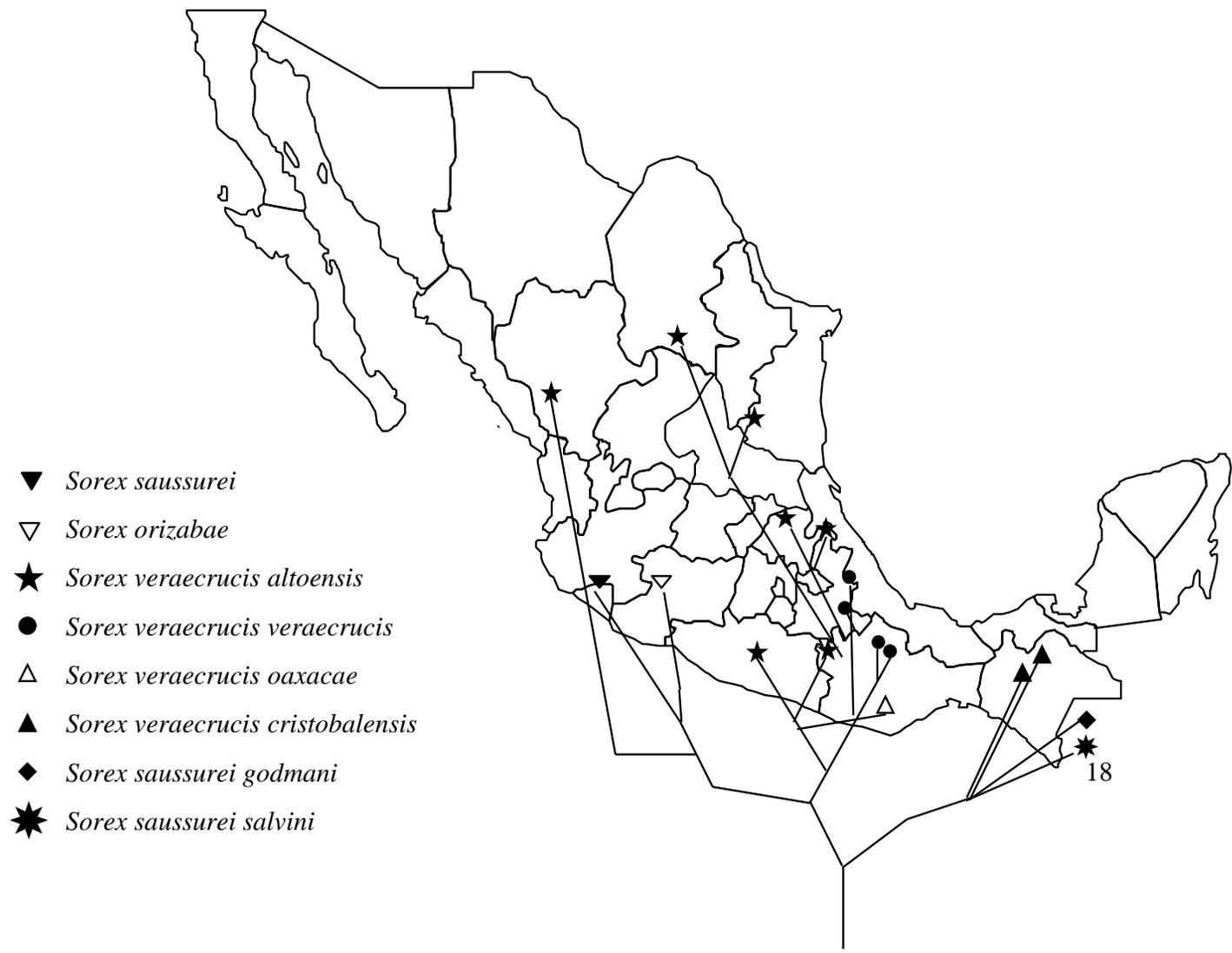


Fig. 7.-Topología esperada de las relaciones de parentesco entre las poblaciones de *Sorex veraecrucis*, *S. orizabae*, y *S. saussurei* con base en el análisis de ADN mitocondrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Muestras.*-Se llevó a cabo el análisis de secuencias de ADN mitocondrial de muestras de musarañas de las especies *Sorex veraecrucis* (*veraecrucis*, *oaxacae*, *crystalensis*, *altoensis*) y *Sorex saussurei*, así como muestras de la mayoría de las especies que se encuentran en simpatría con ellas: *S. orizabae*, *S. ixtlanensis* y *S. veraepacis* (*mutabilis*, *chiapensis*). Dados los resultados previos de una filogenia con un número limitado de secuencias de la mayoría de las especies mexicanas, se consideró importante incluir las muestras de las especies con distribución en México *S. milleri*, *S. monticolus*, *S. emarginatus*, *S. oreopolus*, *S. ventralis*, *S. macrodon*, además de *S. trowbridgii* que se distribuye en la suroeste de los Estados Unidos.

Se procesaron muestras de *Cryptotis parva* y *Megasorex gigas*, las cuales se designaron como grupos externos, estas muestras se utilizaron para enraizar el árbol. Consideramos conveniente utilizar *S. tundrensis* debido a que esta especie tiene distribución tanto en la zona Paleártica como Neártica y a que se ha detectado más de una invasión de la misma al continente americano (Fumagalli 1999). Una secuencia del género *Crocidura*, procedente del GenBank se utilizó para calibrar el reloj molecular. Dados los resultados previos de la filogenia que se presentó en el artículo publicado (Esteve et al. 2010), se consideró adecuado incluir las secuencias de ADN de *S. trowbridgii* (3).

Las muestras se obtuvieron de dos maneras: la primera, de fragmentos de piel de ejemplares de diferentes colecciones mastozoológicas (34.7% del total de las muestras procesadas) y, la segunda, de tejidos de hígado o riñón de ejemplares colectados.

Las colecciones biológicas pertenecen a las siguientes instituciones: Instituto de Biología, UNAM (CNMA); Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo

Integral Regional IPN (CIIDIR), Unidad Durango; El Colegio de la Frontera Sur (ECO-SC-M); la University of Kansas (KU); Museo de Ciencias Naturales, Universidad de San Carlos de Guatemala y de la Brigham Young University (Provo, Utah, USA) .

Las muestras proceden del Eje Neovolcánico Transversal, de la Sierra Madre Oriental como de la Occidental, la Sierra Norte de Oaxaca, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala (Fig. 8). Se procesaron aproximadamente tres muestras por población, dando un total de 69 incluyendo las muestras de los grupos externos y se utilizaron cinco secuencias del GenBank: *Crocidura* (1), *Sorex tundrensis* (1) y tres secuencias de *Sorex trowbridgii*. La colecta de ejemplares se realizó a través de dos métodos, el primero utilizando trampas Sherman con cebos de avena, sardina o de insectos y, el segundo, a través de la instalación de botes enterrados hasta el nivel del suelo, cada esfuerzo de colecta requirió de colocar un promedio de 600 botes por sitio.

La identificación del material se realizó con base en las descripciones originales de las especies y las claves correspondientes para el grupo taxonómico (Diersing y Hoffmeister 1977; Hall 1981; Hennings y Hoffmann, 1977; Junge y Hoffmann 1981; Jackson 1925; Merriam 1892, 1895, 1897). Por otra parte, también consideramos las claves y las descripciones de nuevas especies de Carraway (2007).

1. Durango: El Salto
2. Durango: Las Adjuntas
3. Coahuila: San Antonio de las Alazanas
4. Nuevo León: Cerro Potosí,
5. Nuevo León: Tejocotes
6. Tamaulipas: Reserva de la Biosfera El Cielo
7. Jalisco: Bolaños
8. Colima: Volcán de Colima
9. Michoacán: Pátzcuaro
10. Distrito Federal
11. Tlaxcala: Huamantla
12. Puebla: San Martín Texmelucan
13. Veracruz: Las Vigas
14. Guerrero: Omiltemi
15. Oaxaca: Huautla de Jiménez
16. Oaxaca: Sta. María Pápalo
17. Oaxaca: La Esperanza
18. Oaxaca: Sta. María Tlahuitoltepec
19. Oaxaca: Cerro Zempoaltepetl
20. Oaxaca: Vista Hermosa
21. Oaxaca: Cieneguilla
22. Chiapas: Huitepec San Cristóbal
23. Chiapas: El Triunfo
24. Guatemala: Depto. Huehuetenango Mpio. San Mateo Ixtatán
25. Guatemala: Depto. Huehuetenango Mpio. Todos los Santos Cuchumatán



Fig. 8.-Localidades que se consideraron para la obtención de ejemplares de *Sorex veraecrucis veraecrucis*, *S. v. oaxacae*, *S. v. cristobalensis*, *S. v. altoensis*, *S. saussurei*, *S. orizabae*.

Carraway (2007) propone nuevas especies del género *Sorex*, varias de las cuales eran anteriormente identificadas como *S.saussurei*. Considerando que el 31% de las muestras que se procesaron del género *Sorex* con distribución en México fueron revisados por Carraway (2007), nuestros resultados nos permitirán contrastar este arreglo taxonómico construido con datos morfológicos, con los resultados que nosotros obtuvimos utilizando datos moleculares.

*Análisis de las muestras.*- Para la extracción del ADN se siguió el protocolo de extracción con proteinasa K y fenol-cloroformo (Darbre 1999; Surzycki 2000); asimismo, se utilizó el DNeasy® Tissue Kit para hacer algunas extracciones de pieles. Antes de llevar a cabo la extracción de ADN de los ejemplares de museo se procedió a lavar las pieles con STE (Cloruro de Sodio-Tris-EDTA) y, de esta manera, remover las impurezas (Hillis et al. 1996).

Se amplificó el gen mitocondrial citocromo *b* en ambos sentidos con los iniciadores L-14115 (5'-GACATGAAAATCATCGTTG-3') / H-Sorex770 (5'-TTGAGGGGATTAGCGGGTGT-3'; J. Demboski com. pers. 2002) and L-14764Sorex (5'-GGMGTVCACCTMCTATTCCT-3') / H-15895(E) (5'-TAGAATGTCAGCTTTGGGTGCT-3'; J. Demboski com. pers 2002; Ohdachi et al. 2001). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes 30 ciclos, desnaturalización 94° C por 1'; alineamiento 4 5°C por 1', y extensión de 72°C por 1.5' (Lessa y Cook 1998).

Debido a que el material de las colecciones en muchos casos era muy antiguo y el ADN estaba muy degradado, fue necesario utilizar quince primers con las siguientes combinaciones para amplificar fragmentos pequeños y después unirlos: L-14115-MVZ06, MVZ03-MVZ04, MVZ05-MVZ04, MVZ05-MVZ10, MVZ03-MVZ10, MVZ45-MVZ16,

MVZ45-MVZ26, MVZ23-MVZ16, MVZ03-H-Sorex770, MVZ17-MVZ14, MVZ23-MVZ16; J. Demboski com. pers. 2002; Smith y Patton 1993). Además se diseñaron los iniciadores UNMF14 (5'- GGM GGH GTM CTA GCY YTA GTC -3') y UNMR17 (5'- TAT YAS GCT DCG TTG TTT RGA TGT -3') que se utilizaron en las siguientes combinaciones: UNMF14-MVZ14, MVZ17-UNMR17. Para este último caso las condiciones de la PCR fueron una desnaturalización inicial de 94° C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización de 94° C por 1', alineamiento de 50°C por 1', extensión 72°C por 1', y una extensión final de 72°C por 5' (Francisco X. González comm. pers. 2004).

Se secuenciaron los productos de la PCR en los dos sentidos, utilizando un secuenciador Applied Biosystems ADN Sequencer. Las secuencias se alinearon con el programa Sequencher versión 4.7 y Bio Edit versión 7.0.5.2 (Hall 1999).

*Análisis de los datos.*- Se calcularon las distancias genéticas ("p") no corregidas utilizando el programa PAUP\* versión 4.0b (Swofford 1999). Se procesó un árbol de máxima parsimonia, para lo cual se hicieron 10 análisis de parsimonia conjuntando cuatro estrategias de búsqueda: ratchet, fusión de árboles, deriva de árboles y búsqueda sectorial, con 1000 réplicas cada uno. Los árboles encontrados en cada uno de los análisis se sumaron en un archivo final, posteriormente se obtuvieron los valores de soporte de bootstrap (Felsenstein 1985), el análisis se llevó a cabo utilizando el programa TNT (Goloboff et al. 2008). Se obtuvo la diversidad haplotípica utilizando el programa DNASP versión 5.0 (Librado y Rozas 2009).

Se obtuvo el modelo óptimo de sustitución de las secuencias usando el programa Modeltest versión 3.06 (Posada y Crandall 1998). El modelo resultante se utilizó para hacer los análisis bayesiano y de máxima verosimilitud.

Se construyó un árbol bayesiano y se calculó el soporte de las ramas a través de probabilidades posteriores con el programa MrBayes, versión 3.1 (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Para el análisis bayesiano se corrieron dos réplicas independientes (Huelsenbeck e Imennov 2002) de 10,000,000 de generaciones, con 8 cadenas y por cada posición de codón. Se eliminaron los árboles que correspondían al “burnin in” para lo cual usamos como referencia el gráfico con “ruido blanco” del número de generaciones y los valores de logaritmo de probabilidad. Los árboles restantes se utilizaron para el cálculo de las probabilidades posteriores.

Se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud y los valores de bootstrap utilizando PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel 2003).

Los valores de soporte de los clados varían de un análisis a otro, los valores de bootstrap para el análisis de parsimonia y verosimilitud generalmente son más bajos que el valor de soporte (probabilidades posteriores) del análisis bayesiano. Valores de bootstrap de 80% de soporte en los análisis de parsimonia y verosimilitud se consideran adecuados mientras que 0.9 es el valor de probabilidad posterior mínimo que se requiere para considerar un clado como fuertemente apoyado.

Se aplicó un análisis de máxima verosimilitud para calcular los tiempos de divergencia de los linajes, donde el reloj molecular se calculó usando el software r8s versión 1.7 (Sanderson 2003); para este análisis se utilizó un solo individuo de cada población (32 secuencias, incluyendo un ejemplar de la musaraña asiática *Crocidura suaveolens*). La fecha de divergencia entre las subfamilias de soricomorfos Crocidurinae y Soricinae de 20 millones de años, se utilizó para calibrar el reloj (Fumagalli et al. 1999; Reumer 1994).

## RESULTADOS

*Muestras.*- Se obtuvieron fragmentos de ADN de diferentes longitudes (pares de bases) del gen citocromo *b* para 69 individuos. El gen citocromo *b* (1140pb) es un gen codificante por lo tanto no presenta gaps. En algunos casos no fue posible obtener las secuencias completas, sobre todo con las muestras de piel de ejemplares de colección, sin embargo, solo una de las secuencias tuvo una longitud de 644pb, el resto de las secuencias son de por lo menos 1000 pares de bases. Los sitios faltantes o ambiguos se codificaron con el símbolo (?) que significa datos perdidos. Se utilizaron también cuatro secuencias del GeneBank, *Sorex trowbridgii* (3) *Crocidura suaveolens* (1) y *S. tundrensis* (1). En total se analizaron 73 secuencias.

*Distancias genéticas.*- Las distancias genéticas no corregidas (“*p*”) estimadas mostraron valores altos entre los diferentes géneros (20%) y, pequeños entre individuos de la misma especie, pertenecientes a la misma localidad (0-1.4%; Cuadro 2).

Cuadro 2.- Distancias genéticas entre musarañas de la misma especie y de la misma localidad, en comparación con las distancias genéticas entre distintos géneros.

Especie	No. de individuos	Localidad	Distancia genética %
<i>Cryptotis parva</i> y <i>Sorex v. altoensis</i>	2	Tamaulipas	19.67
<i>Megasorex gigas</i> y <i>S. saussurei</i>	2	Colima	21.26
<i>S. veraepacis mutabilis</i>	5	Omiltemi, Guerrero	0.0-1.40
<i>S. emarginatus</i>	4	Bolaños, Jalisco	0.0-0.17
<i>S. saussurei</i>	5	Minatitlán, Colima	0.0-0.10
		San Cristóbal de las Casas	
<i>S. veraecrucis cristobalensis</i>	2	Chiapas	0.00
<i>S. veraecrucis altoensis</i>	10	Cumbres de Monterrey y Cerro Potosí, Nuevo León	0.0-1.30
<i>S. veraecrucis altoensis</i>	3	El Cielo, Tamaulipas	0.08-0.20
<i>S. ixtlanensis</i>	4	Cieneguilla, Oaxaca	0.30-1.00
<i>S. orizabae</i>	2	Pátzcuaro, Michoacán	0.20
<i>S. veraecrucis altoensis</i>	2	Distrito Federal	0.50

Se agruparon los resultados por regiones considerando que, con excepción de *S. emarginatus*, las especies *Sorex veraecrucis*, *S. saussurei*, *S. orizabae*, *S. veraepacis* y *S. ixtlanensis* son consideradas cercanas y que nuestras muestras cubren de manera general desde el norte de Jalisco, Nuevo León y Tamaulipas, bajando por las Sierras Oriental y Occidental hasta el Eje Neovolcánico Transversal, llegando a la Sierra Madre del Sur y la Sierra Norte de Oaxaca, atravesando el Istmo de Tehuantepec y llegando a los Altos de

Chiapas y Guatemala.

Las distancias genéticas entre las muestras de la Sierra Madre Oriental mostraron distancias de 0 a 1.3% (Cuadro 2); entre las muestras que conforman el Eje Neovolcánico Transversal de 0.08 a 2.6% con excepción de las muestras que se encuentran en Colima (*Sorex saussurei*; Cuadro 3), las cuales mostraron una distancia genética de 0 a 0.1%, mientras que la distancia entre éstas y el resto de las muestras del Eje Neovolcánico fue de 8.6 a 9.8% (Cuadro 3). Entre el Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental no fueron mayores a 3.4%; sin embargo, nuevamente las muestras de Colima fueron diferentes con distancias entre 8.5 y 9.6 % (Cuadro 4).

Las muestras de la Sierra Norte de Oaxaca mostraron valores de distancia genética de 0.4 a 1.7%, con excepción de las del Cerro Zempoaltépetl, que fue de 4-8.5 % con respecto a las demás. Los valores de las muestras de la Sierra Madre del Sur en Oaxaca en general fueron de 0.3 a 1%, entre la Sierra Norte y la Sierra Sur fue de 7.4-9.8% (Cuadro 5). Las de la Sierra del Sur en Guerrero mostraron los valores más altos respecto a cualquier otra (>12%). Finalmente, las muestras de Chiapas y las de Guatemala tuvieron valores de 0-7.3% y 1.3-12.7%, respectivamente.

Cuadro 3.- Distancias Genéticas entre las especies cuyas localidades pertenecen al Eje Neovolcánico Transversal

		<i>S. veraecrucis veraecrucis</i>				<i>S. v. altoensis</i>		<i>S. orizabae</i>			<i>S. saussurei</i>			
		Tlaxcala 29331	Veracruz Fac1	Veracruz 34214	Veracruz 172	DF1922	DF1847	Michoacán BYU96	Michoacán BYU94	Michoacán BYU95	Colima Col 7	Colima Col 26	Colima Co 124	Colima Col 9
<i>S. v. veraecrucis</i>	Veracruz Fac1	0.8												
	Veracruz 34214	0.7	0.17											
	Veracruz172	0.79	0.26	0.08										
<i>S. v. altoensis</i>	DF1922	1.8	2.0	1.8	1.9									
	DF1847	2.03	2.3	2.2	2.3	0.53								
<i>S. orizabae</i>	Michoacán BYU96	1.6	2.03	1.8	1.9	2.1	2.3							
	Michoacán BYU94	2.03	2.3	2.2	2.3	2.4	2.6	2.3						
	Michoacán BYU95	2.12	2.4	2.3	2.3	2.3	2.5	2.5	0.26					
<i>S. saussurei</i>	Colima Col7	8.9	8.8	8.8	8.9	8.7	9.2	8.6	9.2	8.9				
	Colima Col26	9.1	9.1	9.1	9.2	9.2	9.8	9.0	9.6	9.3	0.1			
	Colima Col24	8.9	8.8	8.8	8.9	8.7	9.2	8.6	9.2	8.9	0	0.1		
	Colima Col 9	8.9	8.8	8.8	8.9	8.7	9.2	8.6	9.2	8.9	0	0.1	0	
	Colima Col 21	8.9	8.8	8.8	8.9	8.7	9.2	8.6	9.2	8.9	0	0.1	0	0

Cuadro 4.- Distancias genéticas entre las muestras de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal

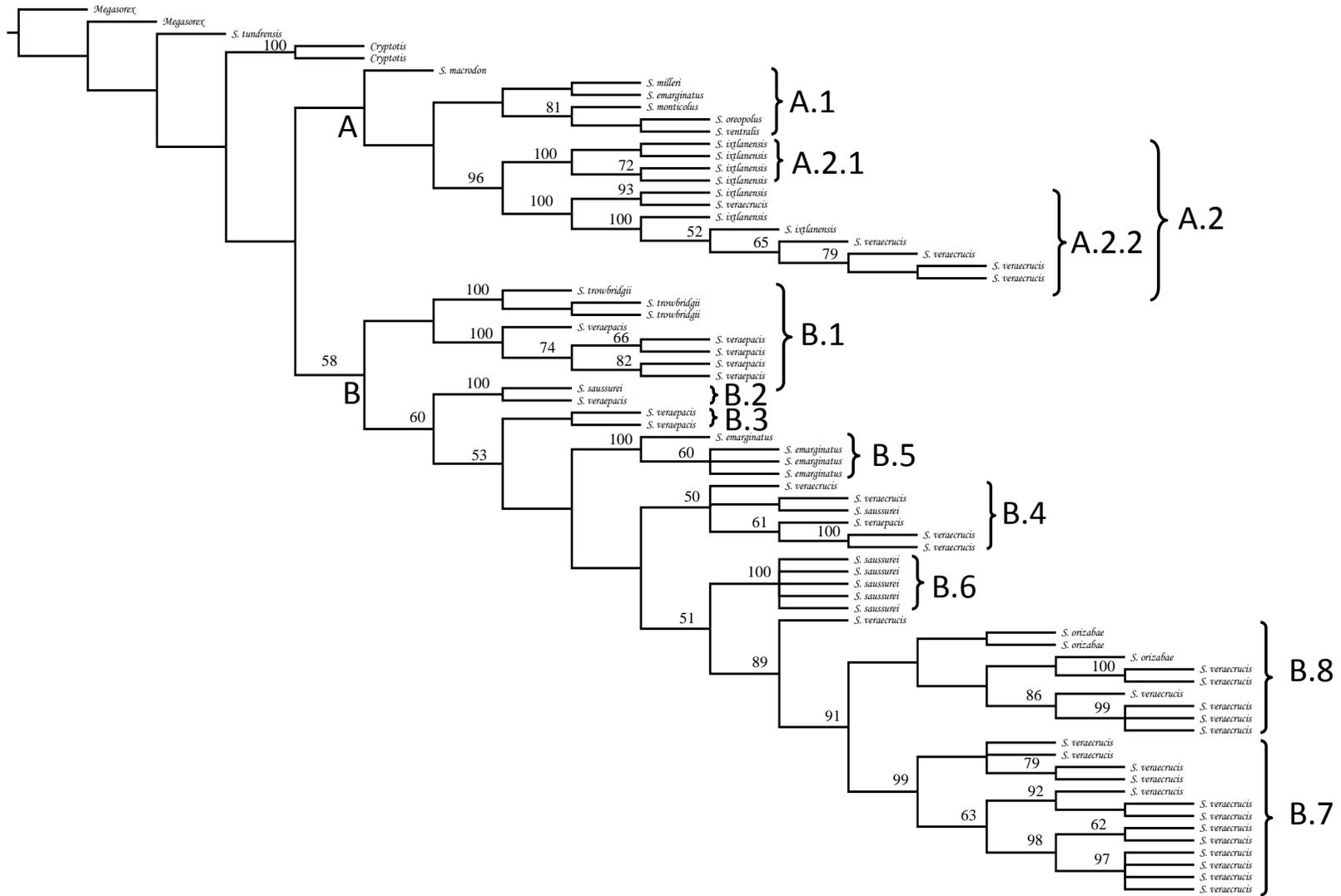
		<i>S. veraecrucis altoensis</i> Sierra Madre Oriental													
		Nuevo León POTOSI	Nuevo León TE37	Nuevo León TEI39	Nuevo León TE40	Nuevo León TEI41	Nuevo León TEC42	Nuevo León TJC43	Nuevo León TI49	Nuevo León TEI50	Nuevo León TE51	Tamaulipas Cielo74	Tamaulipas Cielo75	Tamaulipas Cielo 76	
Eje Neovolcánico Transversal	<i>S. v. veraecrucis</i>	Tlaxcala 29331	2.3	2.6	2.6	2.1	2.6	2.1	2.6	2.3	2.2	2.3	2.5	2.4	2.3
		Veracruz Fac1	2.7	3.0	3.0	2.4	3.0	2.4	3.0	2.7	2.5	2.6	2.9	2.8	2.7
		Veracruz 34214	2.5	2.8	2.8	2.3	2.8	2.3	2.8	2.5	2.3	2.4	2.7	2.6	2.5
		Veracruz172	2.6	2.9	2.9	2.3	2.9	2.3	2.9	2.6	2.4	2.5	2,8	2.7	2.6
	<i>S. v. altoensis</i>	DF1922	2.8	3.0	3.0	2.5	3.0	2.5	3.0	2.8	2.6	2.7	3.0	2.9	2.8
		DF1847	3.1	3.4	3.4	2.9	3.4	2.9	3.4	3.1	3.0	3.1	3.3	3.2	3.1
	<i>S. orizabae</i>	Michoacán BYU96	3.0	3.3	3.3	2.6	3.3	2.6	3.3	3.0	2.7	2.6	3.2	3.1	3.0
		Michoacán BYU94	2.8	2.7	2.7	2.5	2.7	2.5	2.7	2.8	2.4	2.5	3.0	2.9	2.8
		Michoacán BYU95	2.9	2.8	2.8	2.6	2.8	2.6	2.8	2.9	2.5	2.6	3.1	3.0	2.9
	<i>S. saussurei</i>	Colima Col7	8.8	9.1	9.1	8.5	9.1	8.5	9.1	8.9	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9
		Colima Col26	9.3	9.6	9.6	8.9	9.6	8.9	9.6	9.4	8.9	8.9	9.1	9.2	9.3
		Colima Col24	8.8	9.1	9.1	8.5	9.1	8.5	9.1	8.9	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9
		Colima Col 9	8.8	9.1	9.1	8.5	9.1	8.5	9.1	8.9	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9
		Colima Col 21	8.8	9.1	9.1	8.5	9.1	8.5	9.1	8.9	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9

Cuadro 5.- Distancias genéticas entre las muestras cuyas localidades pertenecen al Estado de Oaxaca

		Sierra Madre del Norte							Sierra Madre del Sur			
		<i>S. v. veraecrucis</i>					<i>S. ixtlanensis</i>		<i>S. ixtlanensis</i>			
		Sta María Pápalo 367	Sta María Pápalo 366	Sta María Pápalo 369	La Esperanza BY64	Zempoaltépetl 30010	Vista Hermosa 656	Vista Hermosa 312	Zempoaltépetl 328	Cieneguilla OAX 1	Cieneguilla OAX 6	Cieneguilla OAX 7
Sierra Madre del Norte	<i>S. v. veraecrucis</i>	Sta María Pápalo 367										
		Sta María Pápalo 366	0.8									
		Sta María Pápalo 369	0.5	0.4								
		La Esperanza BY64	0.35	0.4	0.8							
		Zempoaltépetl 30010	8.1	8.0	8.5	8.2						
	<i>S. ixtlanensis</i>	Vista Hermosa 656	0.9	0.9	1.3	0.7	8.2					
		Vista Hermosa 312	1.1	1.2	1.7	0.8	8.4	0.9				
		Zempoaltépetl 328	4.07	4.0	4.5	4.2	4.6	4.1	4.2			
Sierra Madre del Sur	<i>S. ixtlanensis</i>	Cieneguilla OAX 1	7.8	7.7	8.1	7.8	9.8	7.9	8.0	8.5		
		Cieneguilla OAX 6	7.5	7.4	7.8	7.5	9.7	7.6	7.7	8.4	0.5	
		Cieneguilla OAX 7	7.7	7.7	8.1	7.7	9.7	7.9	8.0	8.5	1.0	0.7
		Cieneguilla OAX 8	7.6	7.5	7.9	7.6	9.5	7.8	7.8	8.3	0.3	0.5

*Construcción de árboles.*- En general, los tres árboles (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano) mostraron una topología similar, con ligeras modificaciones en la posición de las muestras al interior de los clados (Figs. 9, 10, 11, 12 y 13). En general podemos observar que los árboles presentaron la misma estructuración de clados con base fundamentalmente en la localidad de los ejemplares estudiados. Lo que sugiere que las cadenas montañosas de donde proceden las muestras están relacionadas con la formación de los clados. Los valores de soporte son más bajos tanto en el árbol de parsimonia (Fig. 9), como en el de verosimilitud (Fig. 10), con respecto a los valores del árbol bayesiano (Fig. 11). Debido a la similitud en la topología de los árboles utilizaremos el árbol del análisis bayesiano para describir y discutir los resultados haciendo las precisiones necesarias en los casos en donde existió alguna discrepancia entre las topologías de los diferentes análisis.

*Diversidad haplotípica.*- Se observaron valores de diversidad haplotípica alta, de 0.98; donde prácticamente cada secuencia es un haplotipo distinto.



59 Fig. 9.- Árbol de máxima parsimonia de las musarañas del género *Sorex* con distribución en México, con los valores de bootstrap, 1000 réplicas.

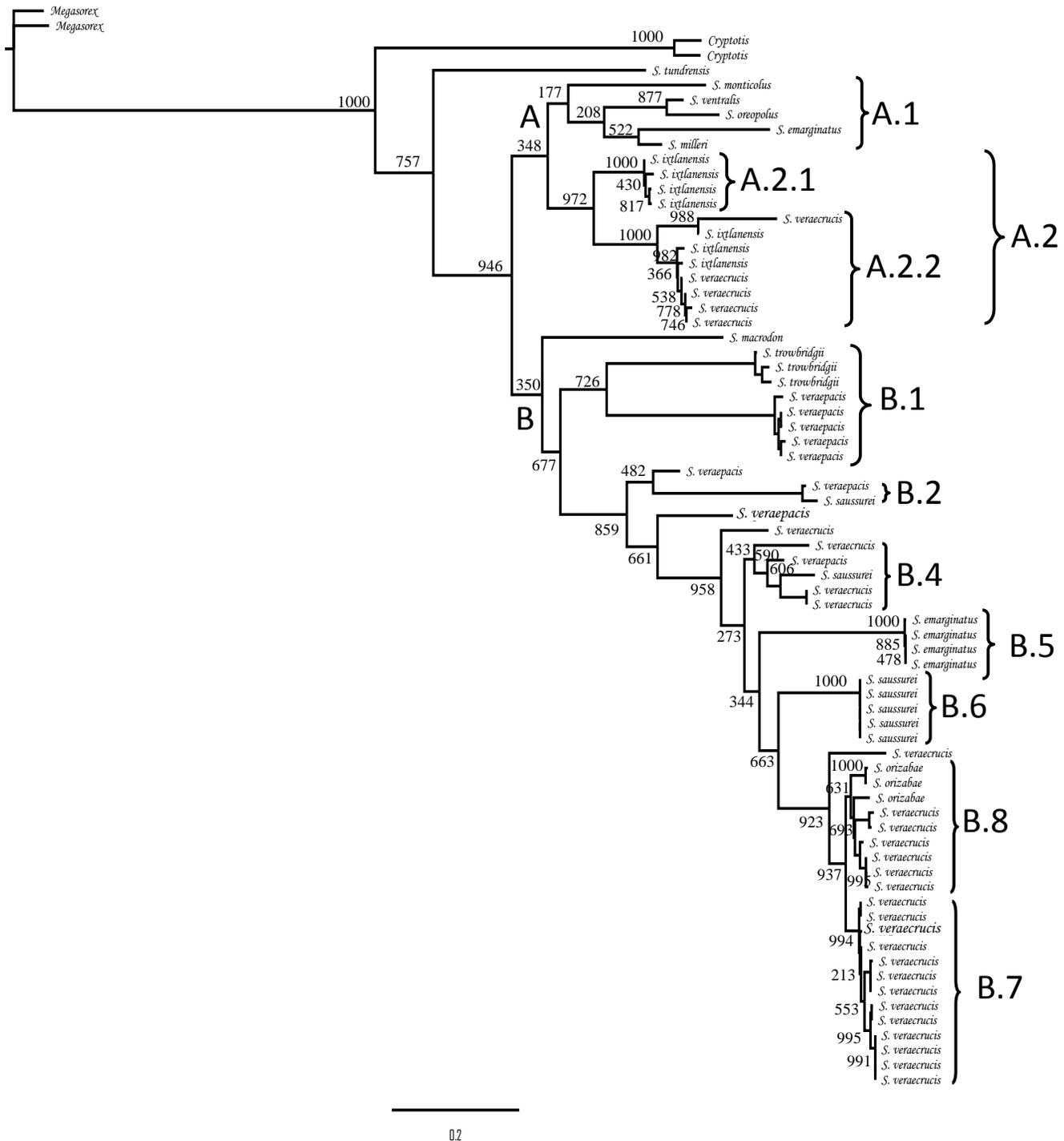


Fig. 10.- Árbol de máxima verosimilitud de las musarañas del género *Sorex* con distribución en México con los valores de bootstrap.



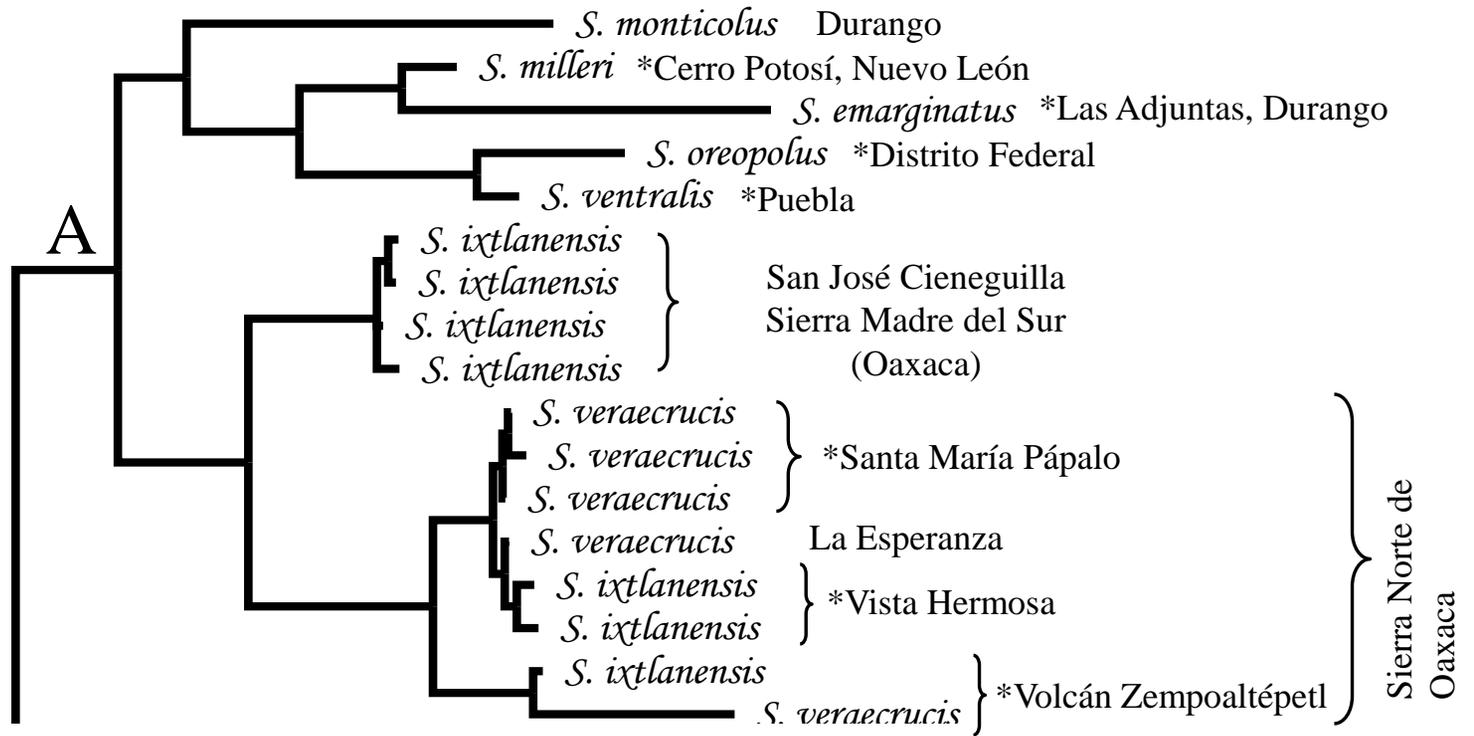


Fig. 12.- Clado A, análisis bayesiano de las especies de musarañas mexicanas del género *Sorex*.  
\*Ejemplares revisados por Carraway (2007).

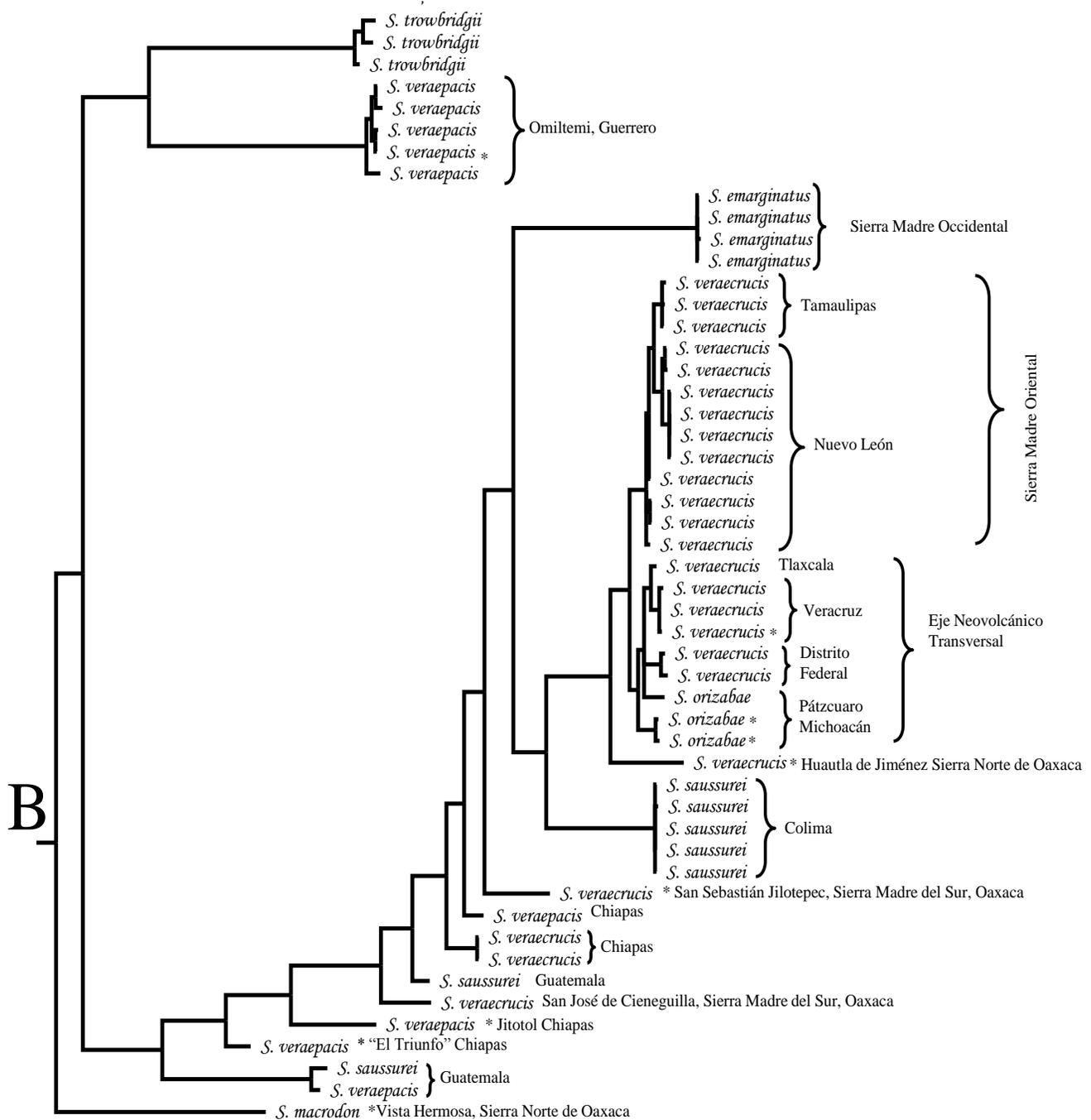


Fig. 13.- Clado B, análisis bayesiano de las especies de musarañas mexicanas del género *Sorex*.  
\*Ejemplares revisados por Carraway (2007).

*Estructura filogenética.*- Dos de los grupos externos (*Megasorex* y *Cryptotis*) ocupan posiciones basales al árbol filogenético. A partir de este punto encontramos dos cladogramas principales (Figs. 9, 10, 11, 12 y 13; Clado A y Clado B).

El clado A muestra dos subclados, el primero (Fig. 11; A.1) concentra a las especies *S. monticolus*, *S. milleri*, *S. emarginatus*, *S. oreopolus*, *S. ventralis*; mientras que el segundo (Fig. 11; A.2) agrupa casi todas las secuencias de Oaxaca tanto de la Sierra Madre del Sur (*S. ixtlanensis*; Fig. 11; A.2.1) como de la Sierra Norte del Estado (*S. veraecrucis* y *S. ixtlanensis*; Fig. 11; A.2.2).

La posición de la única muestra de *S. macrodon* es una de las diferencias que existen entre los árboles que se construyeron. En el caso del análisis de parsimonia quedó ubicado en el clado A (Fig. 9) y en los análisis de verosimilitud y bayesiano en el clado B (Figs. 10, 11), para este caso el valor de soporte de ramas en el análisis de parsimonia y el de verosimilitud es bajo y el valor de soporte en el análisis bayesiano es de 0.99.

El clado B (Fig. 11) muestra una estructura anidada en la que *S. macrodon* se coloca como el grupo hermano de todas las demás especies; seguido del clado B.1 que agrupa en dos pequeños subclados, primero, las secuencias de *S. trowbridgii* y en el segundo las secuencias de *S. veraepacis* del estado de Guerrero.

Enseguida encontramos dos subclados, el primero (Fig. 11; B.2) con dos ejemplares uno de *S. veraepacis* y otro de *S. saussurei* ambas de Guatemala. Siguen una serie de muestras que no forman propiamente un clado (B.3 y B.4) con muestras de *Sorex saussurei*, *S. veraecrucis* y *S. veraepacis* de Guatemala, Chiapas y Oaxaca. En seguida se observa el clado formado por las muestras de *S. emarginatus* procedentes del estado de Jalisco-Sierra Madre Occidental (B.5), este último clado es hermano del que incluye las muestras de

Colima identificadas como *S. saussurei* (B.6). Siguen dos clados, el primero (B.7) agrupa las muestras de *S. veraecrucis* de la Sierra Madre Oriental (Nuevo León y Tamaulipas) y el segundo (B.8) las muestras de Eje Neovolcánico Transversal (Michoacán, Distrito Federal, Tlaxcala, Veracruz ).

*Reloj Molecular.*- Los resultados del cálculo del reloj molecular (Fig. 14) mostraron que la diversificación de las distintas especies que actualmente se distribuyen en México inició en el Mioceno (6.4 – 8.63 ma), donde se da la separación entre *S. veraepacis* y *S. trowbridgii*. Durante el Plioceno (1.8 – 5 ma) hubo el mayor número de eventos de diversificación, especialmente en el caso de las poblaciones de Oaxaca, Chiapas y Guatemala. Los resultados indican que la diversificación entre las poblaciones de la Sierra Norte y la Sierra Madre del Sur de Oaxaca fue en el Pleistoceno medio (1.37 ma). La diversificación en la Sierra Madre Occidental ocurrió al final del Plioceno, lo mismo que en el extremo occidental del Eje Neovolcánico Transversal (Colima). Posteriormente, ya en el Pleistoceno, diversificaron las poblaciones de la Sierra Madre Oriental y el centro y oriente del Eje Neovolcánico Transversal.

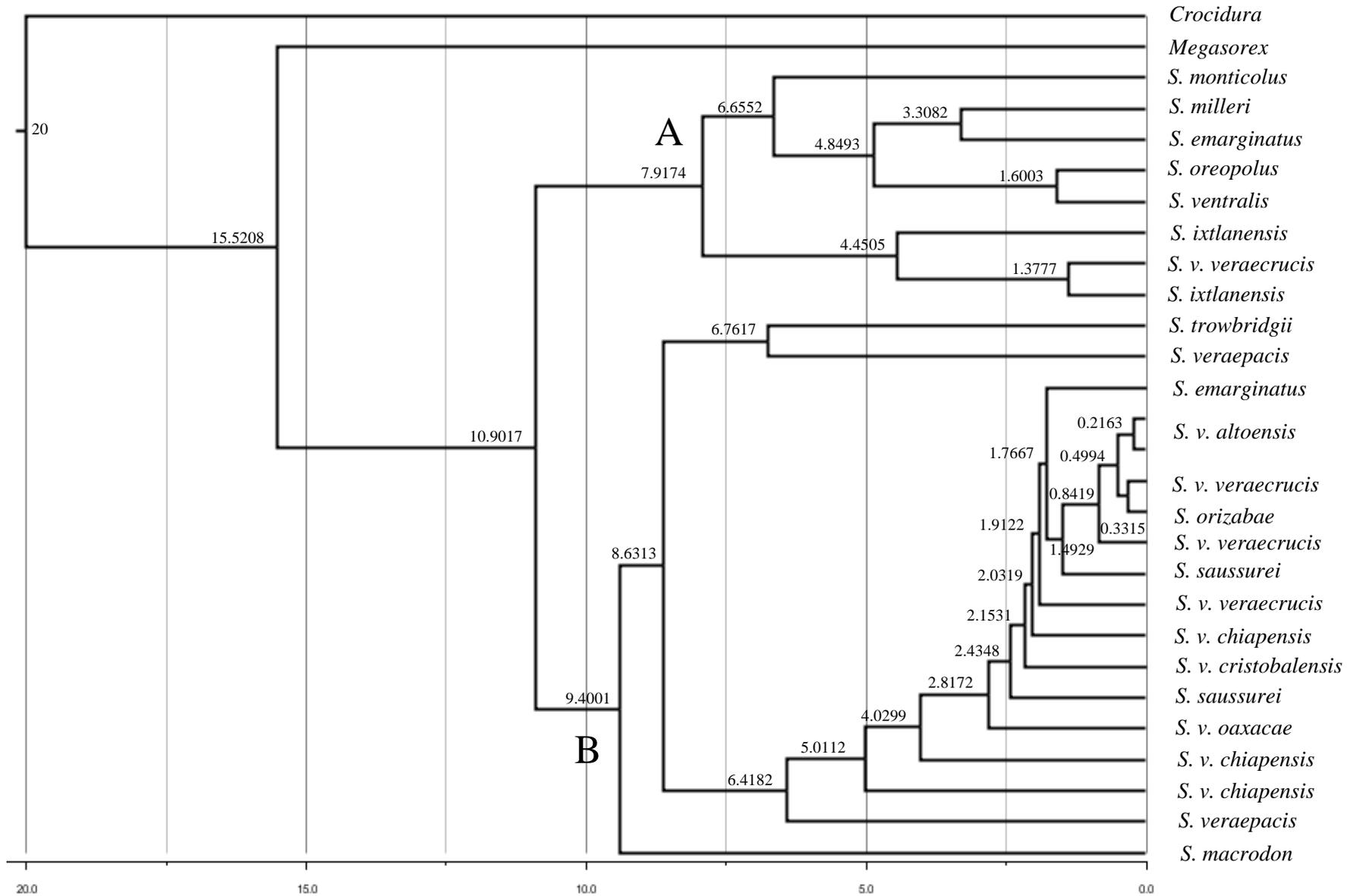


Fig. 14.- Cronograma con los tiempos de divergencia a partir de r8s (1.7; Sanderson 2003). Los números indican los millones de años.

## DISCUSIÓN

El análisis taxonómico de las musarañas mexicanas ha sido un proceso muy lento y está lejos de estar terminado. En particular el género *Sorex* ha tenido varios cambios en los últimos años, en los que a partir del trabajo basado en caracteres morfológicos de Carraway (2007) se hicieron varios cambios en el estado taxonómico de varias especies y una propuesta de clave de identificación de las diferentes especies. La aplicación de esta última herramienta ha mostrado tener inconsistencias y nuestros resultados revelan discrepancias con la propuesta realizada con datos morfológicos. Como resultado de nuestro trabajo es probable que se propongan nuevos cambios en la nomenclatura y arreglo taxonómico de las especies mexicanas del género *Sorex*.

*Análisis filogenético.-* Nuestra discusión se fundamentó en gran medida en las topologías obtenidas de nuestros árboles filogenéticos y en las distancias genéticas. Los niveles de variación en el gen citocromo *b* han sido estudiados particularmente en mamíferos para saber si es posible utilizar las distancias genéticas como un punto de referencia al hacer decisiones concernientes a la delimitación de especies (Bradley y Baker 2001). Estos autores concluyen que distancias menores de 2% indican variaciones intraespecíficas, valores entre 2 y 11 % ameritarían un estudio adicional del estado taxonómico y valores mayores del 11% un reconocimiento específico. En el caso de las musarañas se han utilizado las distancias genéticas en el citocromo *b* como una herramienta en conjunto con el análisis filogenético para esclarecer el estado taxonómico de las poblaciones en estudio (Demboski y Cook 2001, 2003; Fumagalli 1999; Maldonado et al. 2001). En el trabajo de Demboski y Cook (2001) sugieren que un valor de 5.3% de distancia genética ya obliga a cuestionar el estado taxonómico, sin embargo, consideran que

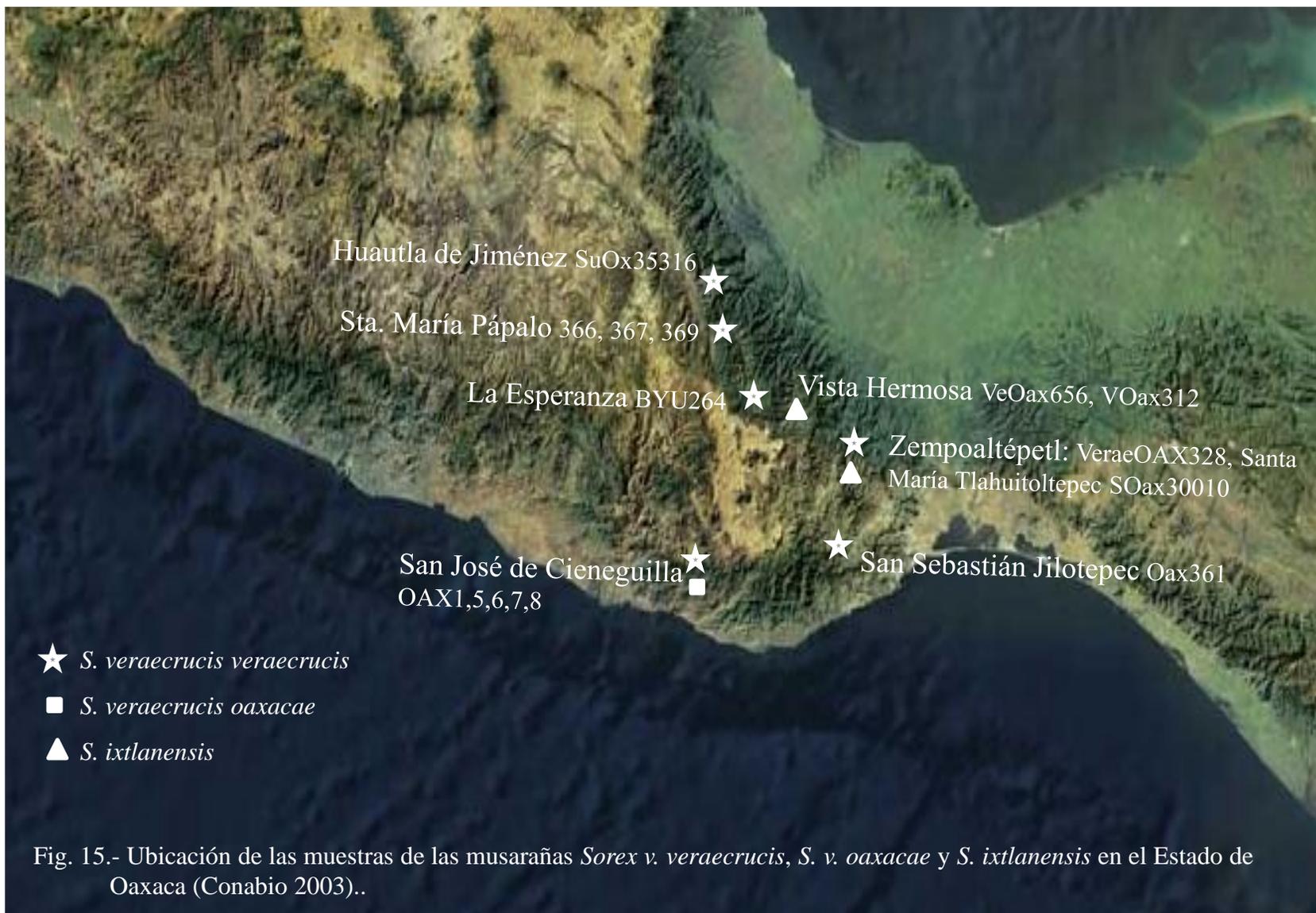
el análisis de un solo gen no es suficiente y que es necesario estudiar otros genes. En el estudio del grupo *S. cinereus* (Demboski y Cook 2003) consideran la distancia de 6% como un referente para hablar de diferenciación específica. Sin embargo, en otros estudios con musarañas los valores de distancia genética tienen intervalos más amplios (5.3-9.5%; Fumagalli et al. 1999; Maldonado et al 2001).

La topología y los valores de distancia genética entre las secuencias indican que existe una estructura genética en las poblaciones de *Sorex veraecrucis* y sus especies afines. A partir de la topología que resultó de los diferentes análisis, observamos que *S. veraecrucis*, *S. ixtlanensis* y *S. veraepacis* no son especies monofiléticas. Las muestras de *S. veraecrucis* (Fig. 11; Clados A y B) están ubicadas en dos clados distintos.

En general el clado A delinea una historia en común independiente de la del clado B, las especies *S. ventralis*, *S. oreopolus*, *S. emarginatus*, *S. milleri* y *S. monticolus* (Figs. 11; A.1 y 12) están abarcando en su distribución desde el norte del país (Durango y Nuevo León) hasta el Eje Neovolcánico Transversal, mientras que las muestras del sur (Oaxaca) agrupadas en el Clado A.2 son el grupo hermano. *Sorex ventralis* y *S. oreopolus* son simpátricas, están muy relacionadas entre sí, son consideradas especies distintas (Carraway 2007), sin embargo, la distancia genética entre las dos es de menos de 5%.

Las muestras de *S. veraecrucis* que se ubican en el clado A forman un subclado junto con *S. ixtlanensis* (Figs. 11; Clado A.2 y 12), todas las muestras del clado proceden del Estado de Oaxaca. El taxón *S. ixtlanensis* fue creado por Carraway (2007), quien a partir de un análisis morfológico exhaustivo, detectó un morfotipo distinto dentro de *S. veraepacis* con distribución en Oaxaca y Guerrero y lo nombró *S. ixtlanensis*. Nuestros resultados confirman la cercanía filogenética de esta especie con *S. veraecrucis*, la distancia

genética entre las muestras tanto de *S. veraecrucis* como de *S. ixtlanensis* que se encuentran al noroeste del volcán Zempoaltépetl en la Sierra Norte de Oaxaca (Sta. María Pápalo, La Esperanza y Vista Hermosa; Figs 11; Clado A.2.2 y 15), va de 0.4 a 1.7% (Fig. 12); sin embargo, las distancias con respecto a las muestras también de *S. veraecrucis* y *S. ixtlanensis* ubicadas en el Zempoaltépetl son de entre 4 y 8.4%. Estos resultados indican que los ejemplares al noroeste del volcán Zempoaltépetl son más cercanos entre sí y que las muestras de este pico montañoso son ejemplares de especies ya diferenciadas. Esta topología es prácticamente la misma que otros investigadores encontraron en las especies de *Habromys* que se localizan, justo en la misma ubicación geográfica: una de ellas en la Sierra Norte (Sierra de Juárez) y otra especie en el Zempoaltépetl (León-Paniagua et al. 2007). Es importante resaltar el hecho de que las dos muestras de musarañas del Zempoaltépetl tienen una distancia del 4%, lo que podría sugerir que están en proceso de diferenciación *in situ*. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de muestra para asegurarlo.



*Sorex ixtlanensis* está presente en los dos subclados del clado A que agrupan por un lado las muestras de la Sierra Norte de Oaxaca (Figs. 11; Clado A.2.2 y 12) y, por otro, las muestras de la Sierra Madre del Sur (Figs. 11; Clado A.2.1 y 12). Al interior del clado de la Sierra Norte encontramos una distancia genética de 4% entre la muestra de *S. ixtlanensis* que procede del noroeste del cerro Zempoaltépetl y la que se encuentra en el Zempoaltépetl, mientras que la distancia entre las poblaciones de la Sierra Norte y la Sierra Madre del Sur es de 7.4% a 9.8%. Las distancias genéticas y la ubicación de las diferentes muestras de la especie *S. ixtlanensis* en el clado A, así como su agrupamiento con *S. veraecrucis*, sugieren la necesidad de revisar la nomenclatura y el arreglo taxonómico actual de *S. ixtlanensis*, sobre todo en el caso de las muestras de la Sierra Norte (Figs. 11; Clado A.2.2 y 12) dado que los ejemplares que se utilizaron son ejemplares revisados e identificados por Carraway (2007). En el caso de las muestras de *S. ixtlanensis* de la Sierra Madre del Sur (Figs. 11; Clado A.2.1 y 12) podría caber la duda al respecto de la identificación de los ejemplares, sin embargo, considerando los valores de distancia genética (7.4% a 9.8%) es válido sugerir que se trata de una especie distinta.

La estructuración de los clados y las distancias genéticas de las poblaciones de la Sierra Norte de Oaxaca y la Sierra Madre del Sur sugieren que el paisaje montañoso jugó un papel importante en el aislamiento de las mismas. Esta situación se ve acentuada por la escasa vagilidad de las musarañas, y lo cual tiene como consecuencia una profunda diferenciación intraespecífica. Este fenómeno se ha observado en especies de roedores pequeños que se distribuyen en México (Conroy et al. 2001; Edwards y Bradley 2002; Harris et al. 2000; Sullivan et al. 1997, 2000). Sin embargo, al contrario de lo que encontraron estos últimos autores, nuestros resultados indican que no existe flujo génico

entre las poblaciones de musarañas de la Sierra Norte de Oaxaca y la Sierra Madre del Sur.

El resto de los ejemplares de *S. veraecrucis* se encuentran en el clado B (Figs. 11 y 13), que proceden de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal, así como de Oaxaca y Chiapas. La topología resultante evidencia la parafilia de *S. veraecrucis* y un complejo proceso de diversificación. Nuestros resultados muestran una estructuración de las poblaciones que van de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal hasta el extremo occidental limitado por Pátzcuaro; las distancias genéticas indican que estas poblaciones no han tenido una diferenciación notable. Valores de diferenciación genética bajos entre poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal también se han observado en otros mamíferos como es el caso de *Habromys delicatulus* y *H. schmidlyi* (León-Paniagua et al. 2007), lo que podría atribuirse a que existe flujo génico entre ellas. Esta suposición se apoya en la propuesta que sugiere la existencia en el pasado de un hábitat de bosque continuo (Luna y Alcántara 2001). Las muestras que Carraway (2007) clasificó como *S. orizabae* mostraron valores bajos de distancia genética con respecto a las del resto del Eje Neovolcánico identificadas como *S. veraecrucis* (1.68-2.65%) y, un poco más altos respecto a las de la Sierra Madre Oriental (3.36%). Podríamos considerar una diferenciación incipiente que sí es posible detectar morfológicamente (Carraway 2007). Sin embargo, con base en las distancias genéticas que han utilizado otros autores (Demboski y Cook 2001, 2003), *S. orizabae* no podría considerarse como una especie distinta.

El que hayamos encontrado una secuencia de *S. veraecrucis* que procede de Huautla de Jiménez al noroeste de Oaxaca agrupada con las muestras que forman el clado del Eje Neovolcánico Transversal hasta el Lago de Pátzcuaro, nos permite sugerir que en las montañas de Oaxaca existen al menos dos linajes distintos: el primero que relaciona a la

mayoría de nuestras muestras de Oaxaca con las especies del norte de Norteamérica (Fig. 11) y, otro linaje que está cercanamente relacionado con las poblaciones que cruzaron el Istmo de Tehuantepec hasta llegar a Guatemala. Asimismo nos permite sugerir, como ya ha sido propuesto por otros autores (Escalante et al. 2007), una conexión entre las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Norte de Oaxaca, este vínculo puede estar relacionado con la existencia de un corredor que permitió el desplazamiento y diversificación de poblaciones de diferentes organismos desde el este del Eje Neovolcánico hacia la Sierra Madre del Sur, que tiene como ruta el sur de Puebla y el norte de Oaxaca (Ferrusquía y Villafranca et al. 2010). Sin embargo, es necesario tener un mayor número de muestras de la zona.

El clado que forman las muestras de Colima está claramente diferenciado del de las muestras del resto del Eje Neovolcánico Transversal (8.5-9.6%). Estas musarañas fueron designadas por Carraway (2007) como *S. saussurei* y nuestros resultados muestran que la diferenciación morfológica que esta autora encontró también es evidente con los datos moleculares.

Parte de los resultados de nuestro estudio no coinciden con la hipótesis que planteamos al inicio del trabajo. Al contrario de nuestra propuesta basada en los trabajos filogenéticos y filogeográficos de mamíferos pequeños con distribución en nuestro país (Conroy et al. 2001; Edwards y Bradley 2002; Harris et al. 2000; Sullivan et al. 1997, 2000), el clado de la Sierra Madre Oriental es el clado hermano del Eje Neovolcánico Transversal y no, la Sierra Madre Occidental como habíamos supuesto que ocurriría. Sin embargo, la relación entre el clado de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal se ha reportado en trabajos biogeográficos de áreas de endemismo, modelos de

nicho ecológico y distribución potencial y, en trabajos biogeográficos con insectos (Corona et al. 2007; Escalante et al. 2007; Marshall y Liebherr 2000). Por otra parte, en nuestra hipótesis sí se planteó que las poblaciones del oeste del Eje Neovolcánico estarían separadas del resto de las muestras del Eje (Fig 7).

Después del agrupamiento de las muestras de *S. saussurei* de Colima (Figs. 11; Clado B.6 y 13), encontramos el clado de los ejemplares que se colectaron en el estado de Jalisco en la Sierra Madre Occidental (Figs. 11; Clado B.5 y 13). Utilizando las claves diseñadas por Carraway (2007), este material lo identificamos como *S. emarginatus*. Contrario a lo que hubieramos esperado, estas muestras no se ubicaron en el clado A.1 donde se situó la muestra de esta especie que procede de Durango, sino en el clado B, lo que nos indica que existen dos linajes independientes para ejemplares que son muy semejantes morfológicamente, pero que difieren molecularmente (distancia genética 10.9-11.2%). Es necesario incrementar el tamaño de la muestra de ambas poblaciones y revisar el estado taxonómico de la especie.

A continuación en el clado B, se agregan una serie de muestras entre ellas una de *S. veraecrucis* que proviene de San Sebastián Jilotepec y la otra de Cieneguilla, ambas en la Sierra Madre del Sur (Figs. 13). Nuevamente encontramos que al menos existen dos linajes de musarañas muy parecidas en su morfología, pero con historias filogenéticas distintas. Los resultados permitieron detectar que esta situación ocurre tanto en la Sierra Norte (muestra de Huautla de Jiménez) como en la Sierra Madre del Sur (distancia genética de 10%). Evidentemente se requiere de un tamaño de muestra mayor para poder tener un panorama más claro de la historia evolutiva de estos linajes. Por sus características morfológicas estos ejemplares de Oaxaca pertenecen a la especie *S. veraecrucis* (una de

ellas corresponde al material que revisó Carraway 2007), sin embargo, muestran distancias genéticas altas.

Este anidamiento se completa con muestras de *S. veraecrucis*, *S. veraepacis* y *S. saussurei* que proceden de Chiapas y Guatemala, es decir poblaciones que cruzaron el Istmo de Tehuantepec hacia el este (Figs. 11; B.2, B.3, B.4 y 13). En este caso las distancias van de 0 a 14%; distancias de cero y de 1.3% se presentan en las muestras de *S. veraecrucis* que proceden de Chiapas (Fig. 11; B.4 y 13) y de Guatemala (Fig. 11; Clado B.2 y 13) respectivamente, sin embargo, entre ellos la distancia es de 14%. El resto de las muestras mantienen distancias que van de 4.3 a 11.4%. Por lo tanto, encontramos una serie de poblaciones que lograron cruzar el Istmo de Tehuantepec y que se establecieron en Chiapas y Guatemala. Sin embargo, no podemos decir que pertenezcan a la misma especie porque no comparten la misma historia evolutiva y presentan altos valores de distancias genéticas. Es indispensable un muestreo más amplio para tratar de entender cuántas especies en realidad están distribuidas al este del Istmo.

Los clados antes mencionados B.2, B.3 y B.4 (Fig. 11) del análisis bayesiano no se formaron ni se ubicaron exactamente en la misma posición en los árboles de máxima verosimilitud (Fig. 10) y parsimonia (Fig. 9), de tal manera que el proceso de diversificación de estas poblaciones es poco claro.

El clado hermano del complejo grupo de especies que se mencionaron es B.1 (Figs. 11 y 13), que agrupa en un subclado a *S. trowbridgii* y, en el otro a las muestras de *S. veraepacis* procedentes del Estado de Guerrero. Por lo tanto, en este trabajo al incluir un mayor número de ejemplares observamos que *S. veraepacis* es la especie hermana de *S. trowbridgii* y no de *S. veraecrucis*.

Las posiciones completamente distintas de *Sorex macrodon* en el árbol de parsimonia con respecto al bayesiano y de verosimilitud no nos permite hacer una hipótesis al respecto y no ayuda el hecho de tener sólo un ejemplar.

Muchos de los ejemplares secuenciados fueron revisados por Carraway para la elaboración de su trabajo publicado en 2007 (Figs. 12 y 13). Estas muestras quedan ubicadas en los diferentes clados mencionados anteriormente, con lo que podemos observar que la propuesta para el arreglo taxonómico de las musarañas del género *Sorex* basado en las características morfológicas, no corresponde del todo con los resultados del análisis filogenético utilizando el gen citocromo *b* del ADN mitocondrial. En resumen siete de las especies con distribución en México que se incluyeron en el análisis: *S. monticolus*, *S. milleri*, *S. oreopolus*, *S. ventralis*, *S. macrodon*, *S. orizabae* y *S. saussurei*, corresponden con la propuesta taxonómica de Carraway (2007), con la reserva del caso en *S. orizabae* que muestra una distancia genética pequeña con respecto a las demás muestras del Eje Neovolcánico Transversal. Mientras que *S. veraecrucis*, *S. ixtlanensis*, *S. veraepacis* y *S. emarginatus* no son monofiléticas.

Falta mucho por trabajar para entender mejor cuáles son las relaciones filogenéticas entre los diferentes linajes que colonizaron el territorio y, es muy probable que la definición del número de especies del género se incremente a raíz de nuevos análisis.

*Sorex macrodon*, *S. milleri*, *S. monticolus*, *S. oreopolus*, *S. orizabae*, *S. ornatus* y *S. veraepacis* están clasificadas en el subgénero *Otisorex*, mientras que *S. emarginatus*, *S. saussurei*, *S. trowbridgii*, *S. ventralis* y *S. veraecrucis* no tienen una clasificación definida (Hutterer 2005). A partir de los resultados de este trabajo, es posible sugerir que todas las especies hasta el momento reconocidas para el género *Sorex* que se distribuyen en México

y Guatemala y *S. trowbridgii*, deben ser ubicadas en el subgénero *Otisorex*.

Diversidad haplotípica.- El valor de diversidad haplotípica indica que es necesario un muestreo más amplio y un mayor número de muestras por población.

*Filogeografía y Reloj molecular*.- La filogeografía enfatiza los aspectos históricos de la distribución espacial contemporánea de los linajes de los genes. En otras palabras el tiempo y el espacio son considerados los ejes de esta disciplina (Avice 2000). El espacio en el que se disponen los linajes de las especies de musarañas *Sorex saussurei*, *S. veraecrucis*, *S. orizabae*, *S. veraepacis* y *S. emarginatus* abarcan las principales cadenas montañosas del país, en hábitats con vegetación sobre todo de bosques de pino-encino, encino y mesófilo de montaña (González-Medrano 1998; Hutterer 2005; Ortíz Pérez et al. 2004; Villa y Cervantes 2003). Estos resultados sustentan la propuesta de que en general la especiación corresponde con la geografía (Peterson et al. 1999) y, que las poblaciones aisladas en las principales montañas, frecuentemente se diferencian genética y morfológicamente (García-Moreno et al. 2004; León-Paniagua et al. 2007).

Varios autores sugieren la posibilidad de que la vegetación que cubre actualmente el territorio haya tenido cambios en extensión y cobertura en el pasado, incluso se ha propuesto la existencia de un bosque continuo (González-Medrano 1998; Luna y Alcántara 2001; Toledo 1982). La expansión y la contracción en la extensión de estos tipos de vegetación (Toledo 1982) favorecerían la posibilidad de que las poblaciones que habitan estos ambientes quedaran aisladas o que, por el contrario, establecieran contacto. Si a esta circunstancia se agrega que las musarañas son mamíferos de tamaño pequeño y escasa capacidad para dispersarse (Villa y Cervantes 2003), puede explicarse la alta diversidad de haplotipos y las distancias genéticas entre la mayoría de las diferentes poblaciones.

La disposición de los dos principales linajes Clado A y B (Figs. 11, 12 y 13) está relacionada primero con la temporalidad de los mismos; sabemos que los separa al menos un millón de años, que los eventos de diversificación comenzaron en el principio del Mioceno y que corresponde al tiempo en el que las principales cadenas montañosas comienzan a conformarse (Ferrusquía-Villafranca 1993). Es en esa época geológica que ocurre la división de los dos clados principales. El Clado B, el más antiguo, es la historia de la invasión de poblaciones de musarañas que logran cruzar el Istmo de Tehuantepec hasta las montañas de Chiapas y Guatemala. El Clado A agrupa especies que también recorren el territorio del país, pero que no atraviesan el Istmo.

Tanto el Clado A como el Clado B (Figs. 11, 12 y 13) abarcan el territorio del país del norte al sur con diferentes especies del género *Sorex*. Sin embargo, es en el clado B en donde encontramos la distribución más amplia de ejemplares de *S. saussurei* y especies afines. *S. ixtlanensis* es exclusiva del clado A. *S. saussurei*, *S. orizabae*, *S. veraepacis* son exclusivas del Clado B. En ambos clados encontramos para el Estado de Oaxaca ejemplares de *S. veraecrucis veraecrucis*, pero es en el clado B en donde se encuentran ubicadas todas las subespecies de esta especie, lo que nos da una aproximación de cómo fue el arribo, establecimiento y diversificación de este linaje en casi todo el territorio del país. En el clado B, *Sorex macrodon* es el linaje más antiguo (Mioceno 9.4 ma) de la primera colonización de musarañas y, de la que tenemos registro en el norte del estado de Oaxaca.

La estructuración del clado que abarca una gran parte del territorio del país (Clado B), indica que la diversificación más reciente se da en las poblaciones de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal durante el Pleistoceno. Mientras que las poblaciones del sur (Oaxaca, Chiapas y Guatemala) diversificaron prácticamente durante el

Plioceno, este resultado coincide en gran medida con los resultados obtenidos por Marshall y Liebherr (2000).

*Oaxaca.*- La historia geológica de las cadenas montañosas de Oaxaca puede ayudar a entender la gran diversidad biológica de la región. La dinámica tectónica del estado de Oaxaca se remonta al Precámbrico hace unos 700 millones de años; y es el resultado del movimiento de los continentes, los procesos de orogenia, avance y retroceso del mar y su reacomodo (Centeno-García 2004). Durante el Cretácico la mayor parte del estado se encontraba cubierto por un mar somero, a finales de este periodo hace aproximadamente 70 millones de años, comenzó la Orogenia Laramide y fue durante el Terciario (65-2.6ma) cuando el paisaje del estado cambió mucho y, por lo tanto, sus condiciones climáticas. Se comenzaron a formar la Sierra Madre del Sur y la Sierra de Juárez. Se sabe que la Sierra de Juárez se formó en los últimos 14 millones de años a partir del Mioceno medio al reciente y que se sigue elevando (Centeno-García 2004), lo que resultó en una topografía muy compleja. Todos estos fenómenos ocurren en una temporalidad que coincide de manera general con el tiempo en el que las musarañas del género *Sorex* arriban al continente (George 1988) y, posterior a lo cual se da la mayor diversificación de especies del género *Sorex* en México (Plioceno-Pleistoceno). Las cañadas que constituyen la separación entre las cadenas montañosas son una barrera geográfica que impide la comunicación entre las poblaciones y esta circunstancia, podría ser la explicación a la topología de los árboles filogenéticos que obtuvimos.

La permanencia y la diversificación de las diferentes especies de musarañas del género *Sorex* en el estado de Oaxaca pueden entenderse si se considera que en los últimos 65 millones de años se moldeó el paisaje del estado como lo conocemos hoy, se formaron

la Sierra Madre del Sur de Oaxaca y Chiapas (Región de los Chimalapas), las montañas y valles del occidente de Oaxaca (Sierra de Tlaxiaco, Sierra de Nochixtlán), la Sierra Madre de Oaxaca y la Sierra Madre del Sur (Sierra de Miahuatlán); en todas estas cadenas montañosas entre otros tipos de vegetación se encuentran el bosque mesófilo de montaña, el bosque de encino y el bosque de pino-encino, hábitats propicios para las poblaciones de estos pequeños mamíferos (Centeno-García 2004; Ortíz Pérez et al. 2004; Villa y Cervantes 2003). Por otra parte, las variaciones climáticas ocurridas en el Pleistoceno (González-Medrano 1998) y, las hipótesis de contracción y expansión de los bosques (Toledo 1982) o incluso, la existencia de un bosque de distribución continua como consecuencia de estos cambios de temperatura y humedad (Luna y Alcántara 2001), pueden explicar que este grupo haya podido permanecer y diversificarse en el área.

Nuestros resultados indican que probablemente como consecuencia de las dos invasiones al estado de Oaxaca, con la topografía y vegetación mencionadas, resultaron dos linajes de musarañas morfológicamente semejantes y temporalmente distintos, que por el momento han sido nombradas como *Sorex veraecrucis veraecrucis*. Por otra parte, ello permitió la diferenciación de *S. ixtlanensis*, con un morfotipo que inicialmente estaba clasificado como *S. veraepacis* (Carraway 2007).

El estado de Oaxaca es un escenario de diversificación muy interesante debido a su topografía tan compleja, por lo que resultará de gran utilidad en el futuro el análisis de un número de muestras mayor para tratar de conocer mejor la historia de los linajes que colonizaron este territorio.

*Eje Neovolcánico Transversal (ENT) y Sierra Madre Oriental.*- Otra de las cadenas montañosas importantes de México es el Eje Neovolcánico Transversal (ENT). Durante el

Paleogeno medio (40 ma) no existió una barrera que impidiera el paso de los organismos del centro al sur del país, sin embargo, en el Eoceno Medio y Tardío comienza la formación del ENT, razón por la cual este corredor se comenzó a reducir desde el oeste hacia el este (Ferrusquía-Villafranca et al. 2010). Se sabe que su origen no fue simultáneo y que existen corredores que permiten el paso de las poblaciones de norte a sur y viceversa, pero que también ha significado una barrera geográfica importante para otros organismos (Ferrusquía-Villafranca 1993; Mulcahy y Mendelson 2000; Zaldivar Riverón et al. 2004). Se han escrito varios artículos acerca del origen y evolución geológica del ENT (Demant 1978; Ferrusquía-Villafranca et al. 2010; Gómez-Tuena et al. 2005), en ellos se señala que la individualización como entidad geológica distintiva ocurrió durante el Mioceno Medio y Tardío y que, durante el Cuaternario se construyeron los principales estratovolcanes con fechamientos que van desde el Plioceno, Plioceno-Pleistoceno hasta el Pleistoceno (1 millón de años; Gómez-Tuena et al. 2005). Nuestras muestras fueron colectadas en diferentes partes del ENT: Fosa tectónica de Colima (Nevado de Colima y el Volcán de Colima); Michoacán, México y Puebla donde se encuentran cuatro de los siete estratovolcanes principales (Popocatepetl, Iztaccihuatl, Nevado de Toluca y Malinche) y la Sierra Chichinautzin; por último, más allá de Puebla se encuentra la cadena Pico de Orizaba-Cofre de Perote. El vulcanismo en el Eje Neovolcánico Transversal es únicamente Plio-Cuaternario, durante el Oligoceno-Mioceno no existía todavía el Eje Neovolcánico (Demant 1978); esta circunstancia podría haber favorecido un rápido desplazamiento de las musarañas *Sorex* durante la primera migración, ya que no existía la barrera biogeográfica que constituyó después el Eje Neovolcánico. Se sabe que existió actividad volcánica en la parte norte del área de Colima durante el Plioceno (Demant 1978), lo que nos marca una

referencia geológica que podría explicar el por qué las poblaciones que se establecieron en esa región (*S. saussurei*) muestran actualmente una diferenciación morfológica y molecular clara con respecto al resto de las especies que colonizaron el Eje Neovolcánico Transversal (*S. veraecrucis* y *S. orizabae*). La parte occidental del ENT, particularmente la región del Nevado de Colima ha sido propuesta como un área compleja geológica y biológicamente, que sustenta el mayor número de endemismos de especies de mamíferos a México (Torres Miranda y Luna 2007).

El Eje Neovolcánico Transversal es ya una entidad geológica individual durante el Mioceno Medio y Tardío y, se tiene el registro de que durante el Cuaternario existió una gran actividad volcánica tanto en la región central, como occidental y oriental del ENT (Gómez-Tuena et al. 2005). Nuestros resultados indican que los arribos de las poblaciones del género *Sorex* ocurrieron durante el Mioceno, es entonces posible relacionar la estructura del clado que agrupa a las muestras del ENT con la historia geológica del lugar. El que a partir del Plioceno la actividad volcánica se haya generalizado en el ENT y el que el efecto de la construcción de los principales estratovolcanes esté en cierta forma individualizada (Gómez-Tuena et al. 2005), explica el pico de diversificación en la región (Torres Miranda y Luna 2007). La región oriente del ENT que incluye el bloque Pico de Orizaba-Cofre de Perote, Tlaxcala y el Distrito Federal forman un subclado, mientras que las muestras que proceden de Michoacán están cercanamente relacionadas con ellas; pero pertenecen a la región centro del ENT, en otros trabajos biogeográficos se han detectado estas áreas como zonas de convergencia que coinciden con el arreglo topológico de nuestros resultados (Torres Miranda y Luna 2007). Por último, la región occidental que abarca la región de Colima se muestra como un clado relacionado pero más alejado de los clados del centro y

oriente, explicado por la gran actividad volcánica de la zona, y que por otra parte ha tenido como consecuencia un gran número de endemismos, situación que también se ha estudiado en plantas (Alcántara y Paniagua 2007; Torres Miranda y Luna 2007). Las muestras de musarañas colectadas en el Eje Neovolcánico Transversal reflejan claramente la influencia de la historia geológica del área. Los mismos estratovolcanes y demás montañas conforman barreras geográficas que limitan el flujo genético. Por otra parte, las fluctuaciones climáticas que se produjeron durante el Pleistoceno, son otro factor que puede haber influido en la diversificación de las especies en esta área (Ferrusquía-Villafranca et al. 2010)

La Sierra Madre Oriental se constituyó a finales del Cretácico y principios del Terciario (Ferrusquía-Villafranca 1993; González-Medrano 1998) y posteriormente, hace aproximadamente 15 millones de años, el Eje Neovolcánico Transversal (Demant 1978). Las muestras que provienen de estas cadenas montañosas forman un clado monofilético. Entre estas poblaciones existe una distancia menor de 3.5%, un valor bajo considerando que entre los clados principales existen distancias de por lo menos 9%. Estos valores sugieren la existencia de flujo génico entre las poblaciones. Estos resultados contrastan con el número de endemismos y diversidad que se han reportado tanto en la Sierra Madre Oriental como en el ENT tanto en reptiles como en mamíferos, en este último grupo incluso con la definición de tres subregiones en la Sierra Madre Oriental (Canseco-Márquez et al. 2004; León-Paniagua et al. 2004). Sin embargo, la vinculación entre estas dos cadenas montañosas ha quedado de manifiesto en trabajos biogeográficos de mamíferos e insectos (Corona et al. 2007; Escalante et al. 2007). En nuestros resultados observamos apenas una relación entre la Sierra Madre Oriental, la región este del ENT y la parte norte de Oaxaca,

que curiosamente también se ha llegado a detectar en un estudio biogeográfico con aves (Navarro-Sigüenza et al. 2007).

*Istmo de Tehuantepec.*- Entre las dos migraciones detectadas en nuestro estudio existen diferencias más allá de que son linajes distintos y que en el sentido estricto son taxa distintos. Las dos colonizan el país, pero sólo la primera y más antigua llega hasta Guatemala logrando atravesar el Istmo de Tehuantepec, un millón de años después se produce una segunda migración que sólo llega hasta el estado de Oaxaca. No podemos excluir que nuestro muestreo es incompleto, pero tampoco podemos ignorar que las condiciones fisiográficas del Istmo de Tehuantepec han cambiado a través del tiempo geológico y que estos cambios han repercutido en la distribución de los organismos a ambos lados del mismo (Huidobro et al. 2006). Los estudios acerca de las variaciones climáticas del Istmo son escasos, sin embargo, sabemos que hace menos de 5 millones de años el territorio del país tenía la apariencia actual (Plioceno; Ceballos-Ferriz y Ramírez 2004); en consecuencia el Istmo ya estaba constituido, emergido, y por lo tanto sujeto a variaciones en temperatura y humedad durante el Pleistoceno al igual que el resto del país (González-Medrano 1998; Toledo 1982). Estos cambios tanto en temperatura y humedad y por lo tanto en vegetación pudieron representar una barrera que no permitió el paso de la segunda migración más allá del estado de Oaxaca.

Tenemos un escenario poco claro para lo que ocurre con el linaje que logra cruzar el Istmo de Tehuantepec, no existe una estructuración condicionada por las características topográficas y, observamos una mezcla que incluye muestras de la Sierra Madre de Oaxaca, la Sierra Madre del Sur, la Sierra Madre de Chiapas y la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala. Para entender lo que sucede con estas poblaciones es necesario tener un

muestreo más amplio de toda esta área geográfica. Sin embargo, la posición basal que tienen estas muestras dentro del clado B (Figs. 11 y 13) con respecto a las muestras de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal sí pone en evidencia la importancia del Istmo de Tehuantepec como un elemento que genera eventos de vicarianza, lo cual ya ha sido propuesto en otros estudios (Carleton et al. 2002; Peterson et al. 1999).

*Sierra Madre Occidental.*- Otra de las cadenas montañosas que caracterizan a nuestro país es la Sierra Madre Occidental, ésta se comenzó a formar hace aproximadamente 54 millones de años y completó su levantamiento en el Mioceno hace unos 15 millones de años con diferentes fechamientos a lo largo de ella (32, 28, 23 y 10 ma; Becerra 2005; Demant 1978; Ferrusquía-Villafranca 1993). Cuando se dan el primer y el segundo arribo de las musarañas *Sorex*, esta cadena montañosa ya estaba constituida, y favoreció el establecimiento de estas poblaciones y su diversificación. Nuestros resultados indican que *Sorex emarginatus*, una especie con distribución en la Sierra Madre Occidental (Carraway 2007), tiene también una historia compleja con al menos también dos invasiones que se ubican en linajes distintos (Figs. 11; Clado A y B y 12 y 13). Aparentemente la morfología de estas musarañas no permite distinguirlas (Carraway 2007); sin embargo, nuestros resultados indican que provienen de momentos temporales diferentes y que, probablemente presentan ya una diferenciación a nivel molecular. Las muestras provienen de localidades distintas (Durango y Jalisco), ambas pertenecen a la Sierra Madre Occidental, sin embargo, el tipo de vegetación y el hábitat no es un continuo a lo largo de sus montañas. Los bosques de pino y encino de las zonas más altas están separados por selva caducifolia (SEMARNAT 2006), lo que puede estar influyendo también en el

aislamiento de las poblaciones, situación que también se ha documentado en otros trabajos filobiogeográficos con mamíferos pequeños (*Neotoma*; Edwards y Bradley 2002).

*Últimas consideraciones y conclusiones.*- Nuestros resultados son comparables con los resultados obtenidos por otros autores que han estudiado las relaciones filogenéticas y biogeográficas de otros mamíferos pequeños que se distribuyen en México. El estudio realizado por Edwards y Bradley (2002) con especies del género *Neotoma* indica que la mayor divergencia sucedió durante el Plioceno medio y tardío; lo que coincide con nuestros resultados. Los autores detectan también la importancia del Istmo de Tehuantepec en el aislamiento de las poblaciones a partir del Pleistoceno temprano (1.8 millones de años). En el trabajo filogeográfico del grupo de especies de *Peromyscus aztecus* (Sullivan et al. 1997) se reporta también el aislamiento de las poblaciones de la Sierra Madre Occidental, un caso similar al de *S. emarginatus*. Por otra parte, el efecto del aislamiento que generan los diferentes picos montañosos en la Sierra Norte de Oaxaca en los procesos de diversificación de las especies del género *Habromys* (León-Paniagua et al. 2007), es prácticamente idéntico al que nosotros observamos en nuestros resultados. Sin embargo, existen diferencias también; en particular nosotros no encontramos una relación tan cercana entre las muestras de la Sierra Madre del Sur y la Sierra Madre Oriental, lo cual sí se ha encontrado en el caso de *Peromyscus aztecus* y en trabajos biogeográficos con otros grupos taxonómicos (Liebherr 1991; Morrone et al. 1999; Morrone y Márquez 2001). Nuestros resultados coinciden con los estudios realizados con roedores por Sullivan y colaboradores (1997) en los que las muestras de la Sierra Madre de Oaxaca y la Sierra Madre del Sur en Oaxaca se agrupan en un clado. Sin embargo, la distancia genética entre ellas es baja mientras que nuestros resultados muestran valores altos. Finalmente, en el estudio de

*Peromyscus aztecus* (Sullivan et al. 1997), las poblaciones del Eje Neovolcánico Transversal quedan aisladas mientras que nosotros encontramos una relación estrecha con las muestras de la Sierra Madre Oriental.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en estudios de otros organismos que presentan una distribución semejante, a pesar de las diferencias en las consideraciones, coincidimos en la conclusión de que los procesos de colonización sí se producen más de una vez (Conroy et al. 2001; Sullivan et al. 1997, 2000; Toledo 1982) y que las cadenas montañosas no se pueden considerar unidades continuas permanentes, sino que en muchos casos permiten la conexión entre poblaciones para después separarlas y dar paso a eventos de vicarianza (Carleton et al. 2002). Este trabajo con las musarañas *Sorex saussurei* y especies afines, ilustra la importancia del área que abarca nuestro país y sus cadenas montañosas, aunado al endemismo de varias de las especies. Ello reafirma el concepto propuesto por diversos autores de que parte del territorio del país es una zona de transición (Escalante et al. 2004; Marshall y Liebherr 2000). Sin embargo, es necesario continuar con la recolección de datos, colecta de muestras y procesamiento de la información que nos permitan tener una idea más completa de la historia filogenética y filogeográfica de estos pequeños mamíferos.

En conclusión, las relaciones filogenéticas entre *Sorex saussurei* y sus especies afines nos muestran un complejo panorama evolutivo en el que, a diferencia de la hipótesis planteada, los taxa involucrados no son monofiléticos. Nuestros resultados confirman la profunda diferenciación filogeográfica característica en mamíferos pequeños con escasa capacidad de dispersión y ponen en evidencia la existencia de procesos de colonización que ocurrieron en diferentes temporalidades así como la importancia de las cadenas montañosas

y el Istmo de Tehuantepec como barreras biogeográficas que favorecieron los procesos de vicarianza. Por último, nuestros resultados apoyan las evidencias biológicas que ilustran la relevancia de la zona biogeográfica mexicana de transición.

#### LITERATURA CITADA

- ALCÁNTARA, O. Y, M. PANIAGUA. 2007. Patrones de distribución y conservación de plantas endémicas. Pp. 421-435 in Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- AVISE, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, London, England.
- AVISE, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
- BECERRA, J. X. 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *PNAS* 31:10919-10923.
- BERMINGHAM, E., AND C. MORITZ. 1998. Comparative phylogeography: concepts and aplicaciones. *Molecular Ecology* 7:367-369.
- BRADLEY, R. D., AND R. J. BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82:960-973
- CAMPBELL, J. A. 1984. A new species of *Abronia* (Sauria: Anguidae) with comments on the herpetogeography of the highlands of southern Mexico. *Herpetologica* 40:373-381.
- CAMPBELL, J. A. 1999. Distribution patterns of amphibians in Middle America. Pp. 111-210 in *Patterns of distribution of amphibians. A Global Perspective* (W. E. Duellman, ed.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- CANSECO-MÁRQUEZ, L., F. MENDOZA-QUIJANO, Y M. G. GUTIÉRREZ-MAYÉN. 2004. Análisis de la distribución de la herpetofauna. Pp. 417-437 in *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental* (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Las Prensas de Ciencias, México, D.F.
- CARLETON, M. D., O. SÁNCHEZ, AND G. URBANO VIDALES. 2002. A new species of *Habromys* (Muroidea: Neotominae) from México, with generic review of species definitions and remarks on diversity patterns among Mesoamerican small mammals restricted to humid montane forests. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115:488-533.
- CARRAWAY, L.N. 2007. Shrews (Eulypotyphla: Soricidae) of Mexico. *Monographs of the Western North American Naturalist* 3:1-91.
- CEBALLOS-FERRIZ, S. R. S., Y J. L. RAMÍREZ. 2004. Bosquejo de la evolución florística. Pp. 87-104 in *Biodiversidad de Oaxaca* (A. J. García-Mendoza, M. de J. Ordoñez y M. Briones-Salas, eds.). Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund.

- CENTENO-GARCÍA, E. 2004. Configuración geológica del Estado. Pp. 29-42 in Biodiversidad de Oaxaca (A. J. García-Mendoza, M. de J. Ordoñez y M. Briones-Salas, eds.). Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund.
- CHURCHFIELD, S. 1990. The natural history of shrews. Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press, Cornell, USA.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2003. México. Imagen desde el espacio. Conabio, México. Mosaico 2002 de imágenes Modis sin nubes del satélite Terra, bandas 1, 4, 3 (RGB), resolución espacial 250 metros, sobre un modelo digital de terreno.
- CONROY, V. C. J., Y. HORTELANO, AND F. A. CERVANTES. 2001. The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus* (Muridae: Rodentia) in North America. *Mammalian Biology* 66:332-334.
- CORONA, A. M., V. H. TOLEDO Y J. J. MORRONE. 2007. Análisis panbiogeográfico de especies de Buprestidae y Cerambycidae (Insecta: Coleoptera). Pp. 439-447 in Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- DARBRE, P. D. 1999. Basic molecular biology: essential techniques. Wiley, New York.
- DEMANT, A. 1978. Características del Eje Neovolcánico Transmexicano y sus problemas de interpretación. *Revista Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México* 2:172-187.
- DEMBOSKI, J. R., AND J. A. COOK. 2001. Phylogeography of the dusky shrew, *Sorex monticolus* (Insectivora, Soricidae): insight into deep and shallow history in northwestern North America. *Molecular Ecology* 10:1227-1240.
- DEMBOSKI, J. R., AND J. A. COOK. 2003. Phylogenetic Diversification within the *Sorex cinereus* group (Soricidae). *Journal of Mammalogy* 84:144-158.
- DIERSING, V. E., AND D. F. HOFFMEISTER. 1977. Revision of the shrews *Sorex merriami* and a description of a new species of the subgenus *Sorex*. *Journal of Mammalogy* 58:321-333.
- DODSON, J.J., F. COLOMBANI, AND P. K. L. NG. 1995. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of a South-east Asian freshwater fish, *Hemibragus nemurus* (Siluroidei; Bagridae) and Pleistocene sea-level changes on the Sunda shelf. *Molecular Ecology* 4:331-346.
- EDWARDS, C. W., AND R. D. BRADLEY. 2002. Molecular systematics and historical phylobiogeography of the *Neotoma mexicana* species group. *Journal of Mammalogy* 83:20-30.
- ESCALANTE, T., G. RODRÍGUEZ, AND J.J. MORRONE. 2004 The diversification of Neartic mammals in the Mexican transition zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:327-339.
- ESCALANTE, T., G. RODRÍGUEZ, N. GÁMEZ, L. LEÓN-PANIAGUA, O. BARRERA, Y V. SÁNCHEZ-CORDERO. 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos. Pp. 485-502 in Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- ESTEVA, M., F. A. CERVANTES, S. V. BRANT, AND J. A. COOK. 2010. Molecular

- phylogeny of long-tailed shrews (genus *Sorex*) from Mexico and Guatemala. *Zootaxa* 2615:47-65.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FERRUSQUÍA-VILLAFRANCA, I. 1993. 1. Geology of Mexico: a synopsis. Pp. 3-107 in *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, eds.). Oxford University Press, New York.
- FERRUSQUÍA-VILLAFRANCA, I., J. ARROYO-CABRALES, E. MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, J. GAMA-CASTRO, J. RUIZ-GONZÁLEZ, O. J. POLACO, AND E. JOHNSON. 2010. Pleistocene mammals of Mexico: A critical review of regional chronofaunas, climate change response and biogeographic provinciality. *Quaternary International* 217:53-104.
- FINDLEY, J. S. 1955. Taxonomy and distribution of some American shrews. University of Kansas Publications Museum of Natural History 7:613-618.
- FLORES-VILLELA, O. 1993. Herpetofauna of México: Distribution and endemism. Pp. 253-280 in *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, eds.). Oxford University Press, New York.
- FUMAGALLI, L., P. TABERLET, D. T. STEWART, L. GIELLY, J. HAUSSER, AND P. VOGEL. 1999. Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* shrews (Soricidae:Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11:222-235.
- GARCÍA-MORENO, J., A. G. NAVARRO-SIGÜENZA, A. T. PETERSON, L. A. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the Common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular phylogenetic and evolution* 33:186-196.
- GEORGE, S. B. 1988. Systematics, historical biogeography, and evolution of the genus *Sorex*. *Journal of Mammalogy* 69:443-461.
- GONZÁLEZ-MEDRANO, F. 1998. La vegetación de México y su historia. *Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM* 52:58-65.
- GOLOBOFF, P., F. FARRIS, AND K. NIXON. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24:774-786.
- GÓMEZ-TUENA, A., M. T. OROZCO-ESQUIVEL, Y L. FERRARI. 2005. Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. Volumen Conmemorativo del Centenario. Temas Selectos de la Geología Mexicana* 3:227-283.
- GÜBITZ, T., R. S. THORPE, AND A. MALHOTRA. 2000. Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko *Tarentola delalandii*: testing historical and adaptive hypotheses. *Molecular Ecology* 9:1213-1221.
- GUINDON, S., AND O. GASCUEL. 2003. A fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- HALFFTER, G. 1987. Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual Review of Entomology* 32:95-114.
- HALL, E. R. 1981. *The mammals of North America*. John Wiley & Sons. New York 1:1-600+90.
- 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. Wójcik and M. Wolsan, eds.). Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences.
- HARRIS, D., D. S. ROGERS, AND J. SULLIVAN. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology* 9:2129-2135.
- HENNINGS, D., AND R. S. HOFFMANN. 1977. A Review of the taxonomy of the *Sorex vagrans* species complex from Western North America. *Occasional Papers of Museum of Natural History of the University of Kansas* 68:1-35.
- HEWITT, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10:537-549.
- HILLIS, D. M., C. MORITZ, AND B. K. MABLE. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates.
- HUELSENBECK, J. P., AND F. RONQUIST. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- HUELSENBECK, J. P., AND N. S. IMENNOV. 2002. Geographic origin of human mitochondrial DNA: accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. *Systematic Biology* 51:155–165.
- HUTTERER, R. 1993. Order Insectivora. Pp. 69-130 in *Mammal Species of the World* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- HUTTERER, R. 2005. Order Soricomorpha. Pp. 282–300 in *Mammal Species of the World* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- HUIDOBRO, L., J.S. MORRONE, J.L. VILLALOBOS, AND F. ÁLVAREZ. 2006. Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography* 33:731-741.
- JACKSON, H. T. 1925. Preliminary descriptions of seven shrews of the genus *Sorex*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 38:127-130.
- JUNGE, J. A., AND R. S. HOFFMANN. 1981. An annotated key to the long-tailed shrews (genus *Sorex*) of the United States and Canada, with notes on Middle American *Sorex*. *Occasional Papers of Museum of Natural History of the University of Kansas* 94:1-48.
- LEÓN-PANIAGUA, L., E. GARCÍA TREJO, J. ARROYO-CABRALES, Y S. CASTAÑEDA-RICO. 2004. Patrones biogeográficos de la mastofauna. Pp. 469-486 in *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental* (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Las Prensas de Ciencias, México, D.F.
- LEÓN-PANIAGUA, L., A. G. NVARRO-SIGÜENZA, B. E. HERNÁNDEZ-BAÑOS AND J. C. MORALES. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular phylogenetics and evolution* 42:653-664.
- LESSA, E. P., AND J. A. COOK. 1998. The molecular phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation.

- Molecular Phylogenetics and Evolution 9:88-99.
- LIBRADO, P., AND J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- LIEBHERR, J. 1991. A general area cladogram for montane Mexico based on distributions in the Platynine genera *Elliptoleus* and *Calathus* (Coleoptera: Carabidae). *Proceedings Entomological Society of Washington* 93:390-406.
- LUNA VEGA, I., Y O. ALCÁNTARA AYALA. 2001. Análisis de simplicidad de endemismos (PAE) para establecer un modelo de vicarianza preliminar del bosque mesófilo de montaña mexicano. Pp. 273-277 in *Introducción a la Biogeografía en Latinoamérica: Teorías, Conceptos, Métodos y Aplicaciones*. (J. Llorente Bousquets y J. J. Morrone, eds.). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MARSHALL, C. J. AND J. K. LIEBHERR. 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography* 27:203-216.
- MALDONADO-KOERDELL, M. 1964. Geohistory and paleogeography of Middle America. Pp. 3-32 in *Handbook of Middle American Indians*. Vol. 1. (R. C. West ed.). University of Texas Press Austin.
- MALDONADO, J. E., C. VILÀ, AND R. K. WAYNE. 2001. Tripartite genetic subdivisions in the ornate shrew (*Sorex ornatus*). *Molecular Ecology* 10:127-147.
- MERRIAM, C. H. 1892. Descriptions of nine new mammals collected by E. W. Nelson in the States of Colima and Jalisco, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 7:164-174.
- MERRIAM, C. H. 1895. Synopsis of the American shrews of the genus *Sorex*. *North American Fauna* 10:57-98.
- MERRIAM, C. H. 1897. Descriptions of five new shrews from Mexico, Guatemala, and Colombia. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 11:227-230.
- MORRONE, J. J., AND J. MÁRQUEZ. 2001. Halffter's Mexican Transition Zone, beetle generalized tracks, and geographical homology. *Journal of Biogeography* 28:635-650.
- MORRONE, J. J., D. ESPINOSA ORGANISTA, C. AGUILAR ZÚÑIGA, AND J. LLORENTE BOUSQUETS. 1999. Preliminary classification of the Mexican Biogeographic Provinces: A parsimony analysis of endemism based on plant, insect, and bird taxa. *The Southwestern Naturalist* 44:507-544.
- MULCAHY, D. G., AND R. MENDELSON III. 2000. Phylogeography and speciation of the morphologically variable, widespread species *Bufo valliceps*, based on molecular evidence from mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2:173-189.
- NAVARRO-SIGÜENZA, A. G., A. LIRA-NORIEGA, A.T. PETERSON, A. OLIVERAS DE ITA, Y A. GORDILLO-MARTÍNEZ. 2007. Diversidad, endemismo y conservación de las aves. Pp. 461-483 in *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (I. Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- OHDACHI, S., N. E. DOKUCHAEV, M. HASEGAWA, AND R. MASUDA. 2001. Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences.

- Molecular Ecology 10:2199-2213.
- OHDACHI, S. D., M. HASEGAWA, M. A. IWASA, P. VOGEL, T. OSHIDA, L. K. LIN AN, AND 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.
- ORTÍZ PÉREZ, M. A., J. R. HERNÁNDEZ SANTANA, Y J. M. FIGUEROA MAH-ENG. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. Pp. 43-54 in *Biodiversidad de Oaxaca* (A. J. García-Mendoza, M. de J. Ordoñez y M. Briones-Salas, eds.). Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fund.
- PETERSON, A. T., J. SOBERON, AND V. SÁNCHEZ-CORDERO. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285:1265.
- POSADA, D., AND K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1:817-818.
- REUMER, J. W. F. 1994. Phylogeny and distribution of the Crocidossoricinae (Mammalia: Soricidae). In *Advances in the Biology of Shrews* (J.F. Merritt, G. L. Kirkland, Jr. and R.K. Rose, eds.). Carnegie Mus. Nat. Hist. Spec. Publ. 18:345-356.
- SANDERSON, M. J. 2003. r8s; inferring absolute rates of evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19:301-302.
- SEMARNAT. 2006. Atlas geográfico del medio ambiente y recursos naturales. Dirección General de Estadística e Información Ambiental. México, D.F.
- SMITH, M. F., AND J. L. PATTON. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149-177.
- SULLIVAN, J., E. ARELLANO, AND D. S. ROGERS. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: Concerted versus independent response to past climatic Fluctuations. *The American Naturalist* 155:755-768.
- SULLIVAN, J., J. A. MARKERT, AND C. W. KILPATRICK. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46:426-440.
- SURZYCKI, S. 2000. *Basic techniques in molecular biology*. Springer, Berlin.
- SWOFFORD, D. L. 1999. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods) PAUP\* 4.0*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- TOLEDO, V. M. 1982. Pleistocene changes in vegetation in tropical Mexico. Pp. 93-111 in *Biological diversification in the tropics* (G. T. Prance, ed.). Columbia University Press, New York.
- TORRES MIRANDA, A., E I. LUNA. 2007. Hacia una síntesis panbiogeográfica .Pp. 503-514 in *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (I., Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- VILLA, B., Y F. CERVANTES 2003. *Los mamíferos de México*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- WUETHRICH, B. 1999. Mexican pairs show geography's role. *Science* 285:1190.
- ZALDIVAR- RIVERÓN, A., V. LEÓN-REGAGNON, AND, 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-

## DISCUSIÓN FINAL

El estudio de la historia evolutiva de las musarañas permite conocer el proceso de colonización de nuestro país por parte de estos mamíferos pequeños. No son muchos los trabajos de este tipo con especies mexicanas de mamíferos considerando la enorme cantidad de taxa que alberga nuestro territorio (Carraway 2007; Villa y Cervantes 2003) y, que las musarañas son organismos de difícil captura.

Además de llevar a cabo salidas de colecta, en este trabajo también se recurrió a utilizar las pieles depositadas en colecciones científicas tanto en México como en Estados Unidos y Guatemala. La existencia de estas colecciones fue esencial para llevar a cabo este estudio, pues en algunos casos será muy difícil que se vuelvan a coleccionar ejemplares de determinadas especies en los sitios que alguna vez se caracterizaron por ser su hábitat natural, lo cual reivindica la importancia de la existencia y el mantenimiento de las colecciones científicas en el conocimiento evolutivo de los organismos (Patterson 2002; Suarez y Tsutsui 2004).

Al realizar el estudio filogenético de las musarañas, incluyendo a las especies mexicanas del género *Sorex* (Capítulo I), comenzamos a contestar la interrogante que se planteó George (1988), cuando en la topología resultante de su trabajo con aloenzimas, la rama de *S. trowbridgii* quedaba aislada sugiriendo que probablemente existía un linaje independiente de las musarañas de los subgéneros *Sorex* y *Otisorex*. Nuestro estudio mostró que *S. trowbridgii* comparte la ancestría común con un grupo de especies distribuidas en México que, por otra parte, resultaron ser el linaje más antiguo. Adicionalmente,

encontramos que otro grupo de especies con distribución en México tenían una relación estrecha con las especies más norteadas del continente Americano. Por lo tanto, el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre las musarañas del continente americano se complementó enormemente con la inclusión de las especies mexicanas. Evidentemente, este enfoque ayudó a resolver algunas preguntas pero también contribuyó a plantear otras. Aunque es altamente probable que el panorama general ya no cambie, la inclusión de las pocas especies restantes permitirá tener una idea más precisa de las relaciones y la historia de estos linajes.

En el Capítulo II al incluir todas las muestras que había sido posible secuenciar, ampliamos el tamaño de muestra y también ampliamos el área de cobertura, lo que nos permitió hacer un acercamiento de lo que evolutivamente ocurrió con las especies mexicanas y comprender un poco más de qué manera las cadenas montañosas más importantes de nuestro país y el Istmo de Tehuantepec jugaron un papel importante como barrera geográfica y como elementos que favorecieron la diversificación de las especies. En este sentido, la comparación con los trabajos realizados sobre todo con otros mamíferos pequeños de distribución semejante (Conroy et al. 2001; Edwards y Bradley 2002; Harris et al. 2000; Sullivan et al. 1997, 2000), nos permitió encontrar coincidencias y diferencias con las historias evolutivas de los roedores mexicanos. Por ejemplo, se puede apreciar que las barreras geográficas actúan no siempre de la misma manera para todos los organismos, aunque como en el caso de los roedores pequeños y las musarañas compartan las características de ser de tamaño pequeño, la escasa capacidad de dispersión y los tiempos geológicos de arribo y diversificación muy semejantes.

Asimismo, los análisis filogenéticos de este estudio fueron una herramienta

importante para corroborar la monofilia de los taxa examinados y nos permitió identificar la necesidad de la revisión del estado taxonómico de algunos de ellos. Por ejemplo, nuestros resultados complementan la información de Carraway (2007) y coinciden en ubicar a *S. milleri*, *S. oreopolus*, *S. ventralis*, *S. macrodon*, *S. veraepacis mutabilis*, *S. orizabae* y *S. saussurei* como especies claramente identificadas. Sin embargo, surgen cuestionamientos respecto a la validez taxonómica de las especies *S. veraecrucis*, *S. veraepacis chiapensis* y *S. ixtlanensis*. Nuestro estudio encontró que no son taxa monofiléticos y que, en el caso de *S. veraecrucis*, se encontraron especímenes ubicados en linajes de temporalidad distinta. Otro caso muy interesante es el de *S. emarginatus*. Nuestros resultados indican que los ejemplares examinados son morfológicamente iguales y que, según Carraway (2007), corresponden a la distribución conocida para la especie. Sin embargo, las muestras corresponden a linajes evolutivos distintos.

Falta mucho por investigar acerca de la Sistemática de este grupo taxonómico, dada lo complicada que es la topografía de nuestro país y, las consecuencias en cuanto a la diferenciación genética entre las poblaciones de los organismos terrestres, pequeños y de limitada dispersión, se hace necesario ampliar el área de muestreo y obtener un número mayor de muestras por población, sobre todo a lo largo de todas las cadenas montañosas del país. En el futuro, será interesante tratar de integrar los datos morfológicos con los moleculares, la codificación de los caracteres morfológicos del trabajo de Carraway (2007) pudiera permitirnos concentrar en una sola matriz de datos, tanto la información morfológica como los datos moleculares para su análisis, amén de secuenciar por lo menos un par de genes más, uno nuclear y otro mitocondrial que nos proporcionarán diferentes grados de resolución: el nuclear con una tasa de mutación más lenta nos ayudará a

complementar la información del capítulo I y el mitocondrial, con una resolución más fina, nos permitirá comparar resultados con los ya obtenidos en el capítulo II (Dubey et al. 2007; Moore 1995).

#### LITERATURA CITADA

- CARRAWAY, L. 2007. Shrews (Eulypotyphla: Soricidae) of Mexico. Monographs of the Western North American Naturalist 3:1-91.
- CONROY, V. C. J., Y. HORTELANO, AND F. A. CERVANTES. 2001. The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus* (Muridae: Rodentia) in North America. Mammalian Biology 66:332-334.
- DUBEY, S., N. SALAMIN, S.D. OHDACHI, P. BARRIERRE, AND P. VOGEL 2007. Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia:Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. Molecular Phylogenetics and Evolution 44:126-137.
- EDWARDS, C. W., AND R. D. BRADLEY. 2002. Molecular systematics and historical phylogeography of the *Neotoma mexicana* species group. Journal of Mammalogy 83:20-30.
- GEORGE, S. B. 1988. Systematics, historical biogeography, and evolution of the genus *Sorex*. Journal of Mammalogy 69:443-461.
- HARRIS, D., D. S. ROGERS, AND J. SULLIVAN. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. Molecular Ecology 9:2129-2135.
- MOORE, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. Evolution 49:718-726.
- PATTERSON, B.D. 2002. On the continuing need for scientific collecting of mammals. Sobre la continua necesidad de efectuar recolección científica de mamíferos. Mastozoología Neotropical, Journal of Neotropical Mammalogy 2: 253-262.
- SUAREZ, A. V., AND N. D. TSUTSUI. 2004. The value of museum collections for research and society. Bioscience 54:66-74.
- SULLIVAN, J., E. ARELLANO, AND D. S. ROGERS. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: Concerted versus independent response to past climatic Fluctuations. The American Naturalist 155:755-768.
- SULLIVAN, J., J. A. MARKERT, AND C. W. KILPATRICK. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. Systematic Biology 46:426-440.
- VILLA, B., Y F. CERVANTES. 2003. Los mamíferos de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.