



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**FILOGEOGRAFÍA DE LOS RATONES DEL GRUPO *Peromyscus mexicanus* EN EL  
NORTE DE CENTROAMÉRICA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**SERGIO GUILLERMO PÉREZ CONSUEGRA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**DR. JORGE ERWIN LÓPEZ GUTIÉRREZ**

ESCUELA DE BIOLOGÍA, USAC

MÉXICO, CD. MX.

MAYO, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 29 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **PÉREZ CONSUEGRA SERGIO GUILLERMO** con número de cuenta **510452133** con la tesis titulada "**FILOGEOGRAFÍA DE LOS RATONES DEL GRUPO *Peromyscus mexicanus* EN EL NORTE DE CENTROAMERICA**", bajo la dirección de la **DRA. ELLA GLORA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**:

Presidente: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA  
Vocal: DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES  
Secretario: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI  
Suplente DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de abril de 2016

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la oportunidad de realizar los estudios de doctorado y por todo el apoyo durante los mismos.

Se agradece el apoyo proporcionado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM).

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por el apoyo económico y administrativo que me permitieron realizar los estudios de doctorado en el convenio USAC-UNAM. Las unidades que proporcionaron apoyo parcial fueron la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, la Dirección General de Docencia –DIGED- y la Dirección General de Investigación –DIGI-.

Apoyo financiero parcial fue proporcionado por los proyectos CONACyt (Grant 101861), Papiit (IN217910 y IN219707), NSF Grant DEB1026396 del "Museum of Vertebrate Zoology" (UC-Berkeley) y DIGI-USAC 2011:2-22.

A mi tutora principal, Dra. Ella Vázquez, una excelente profesora y guía, gracias por dedicarle tanto tiempo y esfuerzos a este proyecto.

A los otros miembros del comité tutor: Dr. Daniel Piñero y Dr. Jorge López, gracias por todo su apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Instituto de Ecología, especialmente al Laboratorio de Genética y Ecología por abrirme sus puertas, entrenarme y poder realizar el trabajo de laboratorio y los análisis en sus instalaciones, especialmente a Marco, Alejandro, Susette, las dos Tánias, Gualberto, Sayra, Laura, etc., amigos que me proporcionaron ayuda siempre que la necesité, les estoy muy agradecido.

Aprecio mucho la ayuda y amabilidad del personal de las colecciones de mamíferos que colaboraron con este proyecto: Suzanne McLaren, Lisa Miriello y John Wible en el “Carnegie Museum of Natural History”; Livia León y Anahí Ávila en el Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias de la UNAM; James Patton, Theodore Papenfuss, Chris Conroy y Sean Rovito en el “Museum of Vertebrate Zoology” de la Universidad de California en Berkeley; Consuelo Lorenzo y Jorge Bolaños del Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de las Casas, Chiapas.

A los miembros del jurado de tesis: Dra. Livia León Paniagua, Dr. Joaquín Arroyo Cabañales, Dr. Juan Morrone, Dr. Juan Núñez y Dr. Daniel Piñero. Todos contribuyeron en gran medida con el desarrollo de este proyecto.

Al personal de la Escuela de Biología USAC, especialmente al Museo de Historia Natural, mis compañeros y colegas de trabajo, que representan mi segunda casa; con ellos compartimos sueños colectivos de desarrollo.

A mis hermanos, Jacobo, Anabella, Lizardo y Susana, con quienes comparto experiencias de juventud, pero también ideas e ideales de vida.

Y por supuesto, un agradecimiento especial a Gladys Salazar, por estar siempre a mi lado.

**DEDICATORIA:**

A mis padres, Silverio Pérez y Matilde Consuegra, grandes ejemplos de vida.

## ÍNDICE

	Página
Resumen	9
Abstract	11
Introducción general	13
<b>Capítulo 1:</b> Pérez-Consuegra, S.G. & E. Vázquez-Domínguez. 2015. Mitochondrial diversification of the <i>Peromyscus mexicanus</i> species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications. <i>Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research</i> 53(4): 300-311. Doi:10.1111/jzs.12099.	16
<b>Capítulo 2:</b> Intricate evolutionary histories in mountain species: phylogenetic allometry and cryptic diversity within the <i>Peromyscus mexicanus</i> species group (Mammalia: Rodentia) (enviado a <i>Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research</i> )	29
<b>Capítulo 3:</b> Filogeografía de los ratones de alta y baja montaña del grupo <i>Peromyscus mexicanus</i> en el Núcleo de Centroamérica. Sergio G. Pérez-Consuegra, Susette Castañeda-Rico y Ella Vázquez-Domínguez	57
Discusión y conclusiones generales	80
Anexo 1: Material suplementario del capítulo 1	89
Anexo 2: Material suplementario del capítulo 2	93

## Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron describir la filogenia, diversidad genética e historia evolutiva del grupo de especies *Peromyscus mexicanus*, así como investigar su congruencia con la geografía y morfología. La hipótesis general fue que la diversificación del grupo ocurrió a finales del Plioceno y durante el Pleistoceno y que las fluctuaciones climáticas de este periodo fueron determinantes para su historia evolutiva reciente.

Los ratones del grupo de especies *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Neotominae) habitan en las montañas húmedas del sur de México y Centroamérica, donde suelen ser la especie dominante y responsables de roles ecológicos importantes. Durante más de un siglo el grupo ha pasado por múltiples transformaciones taxonómicas, pero en la actualidad se le considera restringido a un grupo monofilético de especies de montaña, aunque todavía existe controversia sobre la delimitación de sus especies.

El estudio de la diversidad genética incluyó a todas las especies actualmente conocidas. Para ello obtuvimos 189 secuencias del gen mitocondrial citocromo b (1113pb) de 45 localidades geográficas, desde Hidalgo en México hasta San José en Costa Rica. Los resultados corroboraron la monofilia de las especies de montaña, y en base a ello se propuso una nueva hipótesis filogenética, la que comprende 15 linajes mitocondriales cuyas distribuciones geográficas son en gran medida congruentes con las regiones fisiográficas. También trabajamos un gen nuclear (Growth Hormone Receptor, 829pb) para 18 muestras, que corroboran la monofilia del grupo, aunque con mucha menor variación interna y una estructura genética menos resuelta. Aunque los objetivos del estudio no fueron taxonómicos, consideramos importante proponer algunos cambios nomenclaturales, reviviendo tres nombres en desuso, para considerar a las especies monofiléticas. Se señala que es necesario realizar una revisión taxonómica más completa.

También abordamos el problema de la variación e incertidumbres morfológicas del grupo. Realizamos un análisis multivariado clásico con 19 medidas del cráneo de 521 ejemplares depositados en cinco colecciones mastozoológicas. Lo novedoso fue que se utilizó como base la estructura genética mitocondrial para definir las unidades taxonómicas operacionales, poniendo a prueba la hipótesis de que los 15 linajes genéticos pueden distinguirse morfométricamente. Los resultados de los análisis multivariados y de discriminantes mostraron que los linajes así definidos son distinguibles y que existe una correlación significativa entre la información genética mitocondrial y las medidas utilizadas, lo cual es indicio de señal filogenética. Sin embargo también se observó que existe cierto traslape en el espacio multivariado entre algunos linajes, (generalmente de clados distintos), lo que sugiere



fuertemente la existencia de formas crípticas dentro del grupo. Dicho patrón concuerda con los procesos de especiación en alopatría. Otro resultado interesante es que los linajes provenientes de montañas bajas tienden a ser más pequeños que aquellos de montañas más altas, lo que apoya el resultado obtenido de diferenciación genética (mitocondrial) entre éstos.

A pesar de que una distribución alopátrida es el patrón general para el grupo, describimos también un patrón secundario de distribución parapátrida para algunas montañas que comparten pares de linajes que se segregan altitudinalmente. Resultados obtenidos con una red de haplotipos mostró que probablemente hubo intercambio entre linajes distribuidos en baja y alta montaña y viceversa, lo cual pudo haber ocurrido repetidas veces durante la historia evolutiva del grupo.

Abordamos asimismo la estimación de los tiempos de divergencia. Los resultados mostraron que la separación del grupo *P. mexicanus* de otros peromiscinos del área tuvo lugar hacia finales del Plioceno, y que la diversificación de los grupos modernos ocurrió más recientemente, durante el Pleistoceno. La red de haplotipos indica que la mayoría de linajes mitocondriales se distribuyen actualmente en el Núcleo de Centroamérica. Pudimos observar también señal de cambios demográficos históricos recientes en los linajes, desde el último glacial máximo hace aproximadamente 25 mil años hasta el presente. Ello está probablemente asociado al cambio del clima y el consecuente efecto sobre la distribución de los pisos altitudinales de los bosques de montaña. Durante el Holoceno los linajes de alta montaña muestran señales de disminución poblacional, probablemente asociada a un cambio de su distribución hacia altitudes mayores (y por lo tanto más restringidas), mientras que los linajes de baja montaña muestran signo de incremento poblacional reciente (y antiguo para un linaje), probablemente favorecidos por el incremento de humedad y temperatura en las tierras bajas de Centroamérica.

Los datos genéticos también sugieren que, debido a estas variaciones climáticas y de distribución de los linajes, eventualmente puede existir contacto secundario entre algunas áreas de distribución actualmente fragmentadas. Esto puede parcialmente explicar los resultados observados de distancias genéticas menores de lo esperado a los lados de algunas barreras biogeográficas y el patrón biogeográfico "incongruente". Lo anterior es más la excepción y la mayoría de los 15 linajes en los que se ha diferenciado el grupo *Peromyscus mexicanus* funcionan como unidades evolutivas independientes.

## **Abstract**

The aims of this work were to describe the phylogeny, genetic diversity and evolutionary history of the *Peromyscus mexicanus* species group, and also to investigate their congruence with its geography and morphology. The general hypothesis was that the diversification of the group occurred during the late Pliocene and the Pleistocene and that the climatic fluctuations of this period were key for its recent evolutionary history.

Mice of the *Peromyscus mexicanus* species group inhabit the humid mountains of southern México and Central America, where they are usually the dominant species and play key ecological roles. During more than a century the group has gone through multiple taxonomic changes. At present, it is considered a monophyletic group of restricted mountain species. Nonetheless, controversy still exists regarding species delimitations within the group.

The study of the genetic diversity included all known species. We obtained 189 sequences of the mitochondrial cytochrome b gen (1113pb) from 45 localities, distributed from Hidalgo in Mexico to San José in Costa Rica. The results obtained showed that the group is monophyletic, based on which a new phylogenetic hypothesis was proposed, which encompasses 15 mitochondrial lineages with geographic distributions congruent with the physiographic regions. We also worked with a nuclear gene (Growth Hormone Receptor, 829pb) for 18 samples that corroborated the group as monophyletic, although with much lower internal variation and a less resolved genetic structure. Although the objectives of this study were not taxonomic, we considered important to propose some nomenclatural changes, reviving three unused names, to considering the species monophyletic. We indicate nonetheless that a more complete taxonomic revision is needed.

The thesis also evaluated the problem of morphological variation and uncertainty for the *P. mexicanus* group. We conducted a multivariate analysis with 19 skull measurements of 521 specimens from five scientific collections. The novelty from these analyses was that we used as a basis the mitochondrial genetic structure to define the operational taxonomic units, testing the hypothesis that the 15 lineages can be morphometrically distinguished. Results of multivariate and discriminant analyses showed that lineages defined genetically were indeed morphometrically distinguishable and with a significant correlation between the mitochondrial information and the morphometric measured used, which can be considered a phylogenetic signal. However, we also observed certain overlap in the multivariate space between some lineages (usually of distinct clades), which strongly suggests the existence of cryptic lineages within the group. Such pattern is in agreement with allopatric speciation processes. Another interesting result is that lineages from low altitude mountains tend to be smaller in comparison

with those from higher mountains, which supports the genetic (mitochondrial) differentiation observed among them.

Although an allopatric distribution is the general pattern for the group, we also describe a secondary pattern of parapatric distribution for some mountains that share two lineages that segregate in elevation. Results based on a haplotype network shows a likely interchange between lineages distributed on low to high elevation mountains and vice versa, which could have occurred more than once in the evolutionary history of the group.

We also estimated the diversification times of lineages. Results showed that the split of the group *P. mexicanus* from other peromyscines happened towards the end of the Pliocene, and that the diversification of the modern lineages occurred more recently, during the Pleistocene. The haplotype network shows that the majority of modern lineages are distributed in Nuclear Central America. We were also able to detect signals of recent historical demographic changes of lineages, since the last glacial maximum, 25 thousand years ago to the present. The latter is probably related to climate change and the consequent effect on the elevational distribution of the mountain forests inhabited by some lineages. During the Holocene, high mountain lineages show signs of population size declines, likely associated with a change in distribution towards higher elevations (and therefore more restricted), while low mountain lineages show signs of recent population expansion, more ancient in one lineage, probably favored by the increase in temperature and humidity of lowlands in Central America during the Holocene, and the potential colonization of new mountainous regions.

Genetic data suggest that, due to these climatic fluctuations and their effects on the lineages distributional areas, secondary contact can eventually happen between some of the areas currently fragmented. The latter can partially explain the results found of lower genetic distances than expected at both sides of some geographic barriers and certain incongruent biogeographic patterns observed. Such pattern is no rule and indeed the majority of the 15 lineages in which the *Peromyscus mexicanus* group has differentiated behave as independent evolutionary units.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Centroamérica y el sureste de México ocupan una delgada franja de tierra que une dos continentes, América del Norte y América del Sur. Esta región posee una geología y geografía complejas, sobre todo por la confluencia de cinco placas tectónicas: Norteamericana, Sudamericana, Nazca, Cocos y Caribe. Entre los elementos geográficos más prominentes están una serie de montañas y sierras de diferentes orígenes y distribuidas en forma discontinua más o menos al centro de este gran puente terrestre, junto con dos grandes planicies costeras paralelas (Pacífico y Atlántico). Centroamérica ha sido dividida en dos grandes regiones fisiográficas: Núcleo de Centroamérica al noroeste (Oaxaca a Nicaragua) y Conexión Ístmica (la Centroamérica meridional) al sureste (Costa Rica y Panamá) (James 2012). Las montañas del Núcleo de Centroamérica son interrumpidas y delimitadas por dos de las mayores barreras biogeográficas de la zona: el Istmo de Tehuantepec y la Depresión de Nicaragua (Daza et al., 2010). Asimismo, geológicamente la zona está conformada por montañas dentro del llamado Bloque Maya, como parte de la placa Norteamericana (norte de Chiapas, norte de Guatemala y Belice) y del Bloque Chortí, sobre la placa del Caribe (sur de Chiapas y Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua) (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez 2013).

Esta región alberga una gran diversidad biológica, resultado del dinamismo entre la historia geológica compleja, cambios climáticos significativos, migración y dispersión entre Norte y Sudamérica, así como procesos de radiación y diversificación local. Las montañas del Núcleo de Centroamérica, al sur de México y norte de Centroamérica, forman una unidad biótica particular que conforma el área de endemismo de las tierras altas de Chiapas y Guatemala (Flores Villeda y Goyenechea 2001), en la que son frecuentes los patrones de distribución alopátrida.

Los Neotominae son una subfamilia de la familia Cricetidae que incluye varios géneros ampliamente distribuidos en Mesoamérica, (Musser y Carleton, 2005). La taxonomía del grupo es compleja y las relaciones filogenéticas entre los géneros y las especies, así como la historia evolutiva de todo el grupo, todavía no son del todo claras. El género *Peromyscus*, con más de cincuenta especies (Dawson, 2005), es probablemente el más numeroso y controversial de todos, y su taxonomía ha cambiado en varias ocasiones debido a múltiples revisiones taxonómicas. Uno de los problemas principales es que el género *Peromyscus* parece no ser monofilético (Bradley et al., 2007), ya que incluye a otros géneros anidados de peromiscinos como *Habromys* y *Megadontomys* (Bradley et al. 2007). Las más de 50 especies del género se dividen en 13 grupos, donde la mayoría se reconocen como monofiléticos, aunque el que nos interesa en este estudio, el grupo *Peromyscus mexicanus*, es monofilético sólo cuando incluye

las seis especies de montaña (*P. mexicanus*, *P. gymnotis*, *P. nudipes*, *P. zarhynchus*, *P. guatemalensis* y *P. grandis* y se excluyen las de tierras bajas (*P. yucatanicus* y *P. stirtoni*, Bradley *et al.* 2007). Las relaciones filogenéticas y la historia evolutiva dentro del grupo de montaña todavía se desconocen, pero hay fuertes indicios de que el grupo es más diverso de lo que se suponía. Este grupo presenta en su mayoría una distribución alopátrida y fragmentada (con pocos registros de parapatría y pequeñas áreas de simpatría), relativamente conservado respecto a sus cariotipos (Smith *et al.* 1986), pero muy heterogéneo en cuanto al ADN mitocondrial (Lorenzo & García 2007). La distribución de los caracteres morfológicos es a veces confusa y las especies del grupo han sido tradicionalmente separadas con base en criterios morfométricos (Huckaby 1980), aunque no están claros los límites entre las mismas y es posible que existan especies crípticas.

En especial se ha considerado que la especie que da nombre al grupo, *Peromyscus mexicanus*, es genética y morfológicamente muy variable, además de que ocupa gran diversidad de hábitats en una amplia zona de distribución geográfica, desde el centro de México hasta Panamá; sin embargo, la variación de alozimas sugiere que la especie así considerada es polifilética (Rogers & Engstrom 1992). También existe controversia sobre si la especie *P. gymnotis* está anidada dentro de *P. mexicanus* o si debe ser considerada una especie válida. Las otras cuatro especies de montaña tienen distribuciones un poco más restringidas, con la especie *P. nudipes* restringida al sur de Centroamérica y las otras tres (*P. guatemalensis*, *P. zarhynchus* y *P. grandis*) distribuidas en las montañas del Núcleo de Centroamérica. Sin embargo, la distribución geográfica de las especies del grupo aún no es totalmente clara debido a que no necesariamente ésta guarda relación con las barreras biogeográficas reconocidas en la zona. Finalmente, aún existen dudas sobre la evolución general del grupo, sus orígenes y tiempos de divergencia, ya que tradicionalmente se ha considerado que la evolución del género *Peromyscus* estuvo dominada por las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno.

Bajo este escenario, los objetivos de mi proyecto de investigación doctoral fueron 1) describir la diversidad y estructura genética del grupo, 2) resolver la filogenia de los linajes y determinar los límites de las especies, 3) realizar un análisis general de correspondencias genético-geográficas, 4) realizar un análisis genético-morfométrico y 5) realizar un análisis filogeográfico y evolutivo del grupo. La hipótesis general fue que las fluctuaciones climáticas del Plioceno-Pleistoceno tuvieron un efecto determinante en la historia evolutiva del grupo.

El primer capítulo de la tesis se enfoca en el planteamiento de una nueva hipótesis de relaciones filogenéticas del grupo *P. mexicanus* basada en información del gen mitocondrial citocromo *b*. Incluye la mayor cobertura geográfica que se tenga en comparación con trabajos

previos para este grupo. Basado también en aspectos genético-poblacionales y considerando la congruencia geográfica general, este primer capítulo resuelve la complejidad de linajes genéticos y, en parte también, algunas de las controversias sobre la taxonomía del grupo. Se propone incluso la revalidación de algunas especies (y sus nombres), durante mucho tiempo consideradas inválidas. Este primer capítulo sirve también de marco de referencia e hipótesis evolutiva general para los dos capítulos que le siguen.

En el segundo capítulo se evalúa la congruencia morfológica de las especies del grupo, con base en la propuesta filogenética planteada en el primer capítulo. En particular, a través de análisis multivariado de medidas morfométricas (principalmente del cráneo) de las 15 unidades taxonómicas operacionales (linajes) definidas con la filogenia mitocondrial (Capítulo 1), para evaluar si existen diferencias significativas entre ellas. También se determina el grado de correlación entre la divergencia filogenética y la morfométrica. En la discusión de este capítulo se tratan de dilucidar algunos de los patrones evolutivos que operan en este grupo, principalmente la alopatría, para comprender un poco mejor el fenómeno de las especies crípticas.

En el tercer capítulo se utilizó un enfoque filogeográfico para determinar patrones históricos y evolutivos de los linajes determinados tanto filogenética como morfológicamente en los dos capítulos anteriores. En particular se enfocó en las diferencias en los patrones filogeográficos para los linajes estratificados altitudinalmente, se evaluaron los tiempos de divergencia, los eventos históricos predominantes y la historia demográfica, con base en métodos de coalescencia. Incluye también un aspecto pendiente: la congruencia de los patrones observados a partir de un gen nuclear.

Finalmente, se incluye una discusión general y conclusiones del trabajo, basadas en la integración de todos los aspectos estudiados en la tesis: filogenéticos, taxonómicos, morfométricos, filogeográficos y evolutivos de las especies del grupo *Peromyscus mexicanus*. Incluye la discusión general sobre el significado que los resultados tienen sobre la evolución del grupo *Peromyscus mexicanus*, sobre el entendimiento de la evolución de la biota del Núcleo de Centroamérica y de las implicaciones biogeográficas para la región.

## CAPÍTULO 1

**Pérez-Consuegra, S.G., E. Vázquez-Domínguez. 2015. Mitochondrial diversification of the *Peromyscus mexicanus* species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 53(4): 300-311 (doi: 0.11117jzs.12099)**

# Mitochondrial diversification of the *Peromyscus mexicanus* species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications

SERGIO GUILLERMO PÉREZ CONSUEGRA<sup>1,2,3</sup> and ELLA VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ<sup>1</sup>

## Abstract

The mountain mice of the *Peromyscus mexicanus* group currently encompass six known species; however, the limits between species remain uncertain, with two considered monotypic and the other four having multiple associated subspecific names. Based on the most comprehensive sampling of the group throughout its distribution in Nuclear Central America, we used data of the mitochondrial cytochrome *b* gene to assess its genetic diversity, phylogeny, and main biogeographic and diversification patterns. Our mitochondrial phylogeny only partially reflects the current taxonomy of the group, in agreement with some of the taxonomically recognized species. Specifically, our phylogenetic results show that the group is highly structured, including four main clades with genetic distances ranging from 11 to 8.6%. A remarkable level of differentiation is found at a more local level, defined as 15 different lineages with high nucleotide and haplotype diversity ( $\pi = 0.068$ ,  $h = 0.99$ ), and with divergence and genetic distance values (p-uncorrected = 9.9–2.4%; K2P = 10.8–3.0%) similar to values observed between species within *Peromyscus*. Accordingly, we propose that the reference name *P. mexicanus* is polyphyletic and should be restricted to the mountains of central Mexico west of the Isthmus of Tehuantepec. We suggest to limit the other five recognized specific names to equal number of lineages, as monophyletic, and to revalidate three junior synonyms: *Peromyscus salvadorensis*, *P. nicaraguae* and *P. tropicalis*. The Isthmus of Tehuantepec, the Motagua-Polochic-Jocotán fault system, the Maya Highlands and the Honduras Depression are examples of geographic features that are likely associated with the differentiation of main lineages. Some other lineages may represent candidate species, hence the need to review the taxonomic status of the entire *P. mexicanus* group.

**Key words:** Cryptic species – mammals – Mesoamerica – mitochondrial DNA – peromyscines

## Introduction

Central America is an ideal region for the study of patterns of historical divergence and species formation of flora and fauna, because of its extraordinarily intricate geologic and biogeographic history, diversity of habitats, climatic changes and tectonic dynamics (Iturralde-Vinent 2006; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2013). The configuration of Central America involves four tectonic plates, and their interaction is associated with the formation of major tectonic elements and mountain ranges in this region, including the Maya, Chortis and Chorotega blocks, and the Central American Volcanic Arc, Motagua-Polochic-Jocotán fault system and Maya Highlands (for a detailed description see Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2013). The Maya (Chiapas, Belize and northern Guatemala) and Chortis (southern Chiapas, southern Guatemala, Honduras, El Salvador and Nicaragua) blocks delimit the region known as Nuclear Central America, bounded to the north by the Isthmus of Tehuantepec, Mexico, including the Yucatan peninsula, and the Nicaraguan Depression to the south (Flores and Goyenechea 2001; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2013). This region is characterized by high species diversification rates and extraordinary levels of endemism for some taxa. In particular, mountain-associated species like rodents of the genus *Peromyscus* are an appropriate system to evaluate how their distribution and speciation are associated with the biogeographic history of this region (Daza et al. 2010).

The genus *Peromyscus* belongs to the New World Family Cricetidae, Subfamily Neotominae, Tribe Reithrodontomyini (Musser and Carleton 2005). Peromyscines are distributed almost exclusively in North America (Alaska to Panama), where Mexico is considered their centre of diversity (Dawson 2005). The

phylogeny within the neotomine-peromyscine is partially resolved, based on the combined use of nuclear and mitochondrial markers (Reeder et al. 2006). There is a relatively abundant fossil record for peromyscines in North America, which suggests they evolved around the Late Miocene from the extinct genus *Copemys* (Lindsay 1972). *Peromyscus* is the most diverse genus, with 56 recognized species (Musser and Carleton 2005) that are subdivided in 13 species groups (Dawson 2005). Their phylogeny is partially known, where most groups appear to be monophyletic with the exception of *P. furvus*, *P. mexicanus* and *P. truei* (Bradley et al. 2007). The *P. mexicanus* group was named originally by Osgood in 1909, which at that time included *mexicanus*, *P. allophylus*, *P. banderanus* and *P. yucatanicus*; however, during the last decades, the group has had numerous changes (Hooper and Musser 1964; Hooper 1968; Musser 1969; Carleton 1989; Rogers and Engstrom 1992).

At present, it is considered that the *P. mexicanus* group includes eight species distributed from southern Mexico to Central America: *Peromyscus mexicanus* (Saussure 1860) as the type species for the group, considered widely distributed from central Mexico to Panama, with its type locality at Mirador, Veracruz, Mexico (Dalquest 1950) (Figs 1 and S1); *P. gymnotis* (Thomas 1894), type locality 'Guatemala' (Pacific coastal plain), distributed in the Pacific coastal plain from Chiapas to El Salvador; *P. nudipes* (Allen 1891), type from La Carpintera, Cartago, Costa Rica, endemic to the mountains of Costa Rica and Panama; *P. guatemalensis* (Merriam 1898), type from Todos Santos, Huehuetenango, Guatemala (altitude 3048 m), distributed in the mountains of Guatemala and adjacent areas of Chiapas; *P. zaryhynchus* (Merriam 1898), type from Tumbalá, Chiapas (1076 m), endemic to the highlands of central Chiapas; and *P. grandis* (Goodwin 1932), type from Finca Concepción, San Miguel Tukurú, Alta Verapaz, Guatemala (1143 m), endemic to the Alta Verapaz highlands, central Guatemala. The two other, *P. stirtoni* (Dickey 1928) and *P. yucatanicus* (Allen and Chapman 1897),



are strictly lowland species, and their inclusion into the *mexicanus* group is weakly supported by both morphological (Huckaby 1980; Carleton 1989) and molecular information (Bradley et al. 2007). The former six species form a highly supported monophyletic group, which also share a mountain habitat preference (Ordóñez-Garza et al. 2010).

This mountain group shows discrete size differences, mainly among allopatric populations and partitioned geographically among different mountains (S.G. Pérez-Consuegra and E. Vázquez-Domínguez, in preparation); they are conservative in terms of karyotypes (Smith et al. 1986) and heterogeneous regarding mitochondrial DNA (Lorenzo and García 2007). *P. grandis*, *P. guatemalensis* and *P. zarhynchus* show some size and pelage differences (Huckaby 1980; Carleton 1989), and all six differ partially or totally in their geographic and elevation distribution. Moritz et al. (2000) establish that relationships among species and historical lineages within species, particularly if sister groups can be identified in relation to geography and/or ecological attributes, can help distinguish among hypotheses of evolutionary processes that promote diversification, for instance a Refugia model (allopatric) and a Gradient model (parapatric or allopatric). In accordance, the *P. mexicanus* group is an excellent model to evaluate allopatric or parapatric patterns of diversification (Patton and Smith 1992; Moritz et al. 2000).

Attempts to resolve the phylogeny of the group include allozymic and mitochondrial information (Wade 1999; Rogers and Engstrom 2004), and morphometric and mitochondrial information supports the validity of the present known species (Ordóñez-Garza et al. 2010). Nevertheless, the limits between the species remain uncertain, where two species are considered monotypic, *P. guatemalensis* and *P. grandis*, but the other four have multiple associated subspecific names: *P. mexicanus angelensis* (Osgood 1904), *P. mexicanus putlaensis* (Goodwin 1964), *P. mexicanus saxatilis* (Merriam 1898), *P. mexicanus teapensis* (Osgood 1904), *P. mexicanus totontepecus* (Merriam 1898), *P. nudipes hesperus* (Harris 1940), *P. nudipes cacabatus* (Bangs 1902), *P. nudipes orientalis* (Goodwin 1938) and *P. zarhynchus*

*crystalensis* (Merriam 1898). Hence, based on the recognized six mountain species in the *mexicanus* group and on the most comprehensive sampling of these species, in this study, we aimed to (i) assess the genetic diversity and phylogenetic relationships of the group and (ii) elucidate the species limits taking into consideration the phylogenetic relationships and the geologic and biogeographic history along its distribution within Nuclear Central America.

## Materials and Methods

### Sampling and DNA extraction and amplification

We collected samples from natural populations with Sherman live traps, following standard field techniques for collecting terrestrial small mammals, with the appropriate protocols for management of specimens (Sikes and Gannon 2011) and with the corresponding collecting permits. Individuals were identified on the field based on morphological differences where apparent. We prepared voucher specimens from every collecting locality in the field and deposited them in scientific collections (Table 1); species identifications were verified by examination of characters by comparing with corresponding descriptions (e.g. Goodwin 1932; McClellan and Rogers 1997). Tissue samples for molecular analyses were stored in labelled Eppendorf tubes with 95% ethanol until DNA extraction. Tissue samples were also obtained from the following scientific collections (Table 1): Carnegie Museum of Natural History (Pittsburgh, Pennsylvania), El Colegio de la Frontera Sur (San Cristobal de las Casas, Chiapas), Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (Universidad Nacional Autónoma de México, México), Museum of Vertebrate Zoology (University of California, Berkeley), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (León, Nicaragua) and Museo de Historia Natural (Universidad de San Carlos de Guatemala). We gathered a total of 186 samples from 45 localities (Fig. 1, Table 1), encompassing almost the entire geographic distribution of the group, from Hidalgo in Mexico to San Jose in Costa Rica, although the different areas were not equally represented, being Guatemala the country with the majority of samples.

We performed DNA extraction with two commercial kits: the Quick-Gene DNA Tissue Kit (Fujifilm, Tokyo, Japan) or DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's instructions. DNA quantity and DNA quality were assessed with 1% aga-

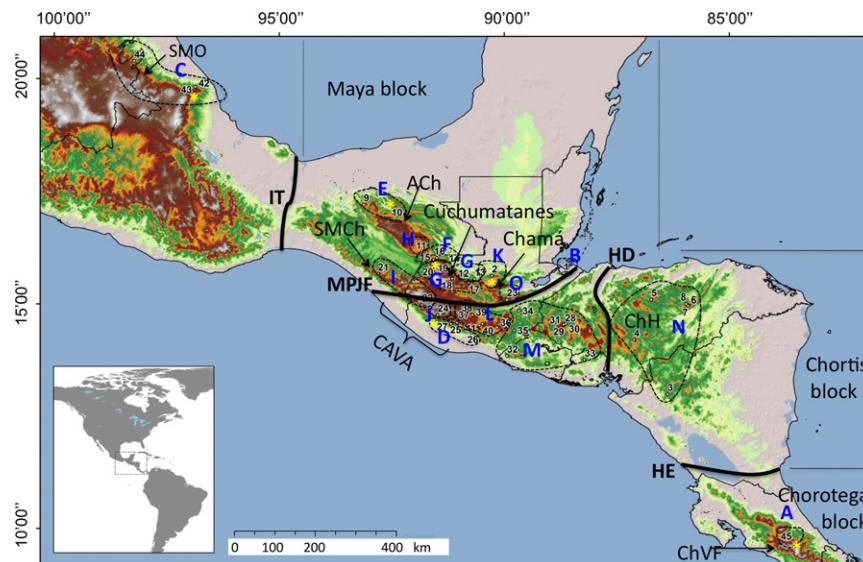


Fig. 1. Map of southern Mexico and Central America showing the sampling localities for the *Peromyscus mexicanus* species group from Nuclear Central America. Small numbers (1–45) refer to sampling localities (each one described in Table 1). The 15 lineages recovered (see Results, Table 1 and Fig. 2) are indicated with a dashed line and their corresponding code letter (A–O) in blue. A yellow asterisk (\*) indicates the type locality for the six species (see text for exact locality). The limits of the Maya, Chortis and Chorotega blocks are indicated with thin lines. Suture zones are shown in bold (thick lines): IT, Isthmus of Tehuantepec; MPJF, Motagua-Polochic-Jocotán fault system; HD, Honduras Depression; HE, Hess Escarpment. Main geographic features and mountain areas are indicated with arrows: SMO, Sierra Madre Oriental; SMCh, Sierra Madre de Chiapas; ACh, Altos de Chiapas; CAVA, Central America Volcanic Arc; ChH, Chortis Highlands; ChVF, Chorotega Volcanic front.

Table 1. List of samples of the *Peromyscus mexicanus* species group, including localities, coordinates, sample size, catalogue number of the museum scientific collections, haplotype code given to each unique haplotype (as used in figures) with their corresponding lineage name (see Fig. 2) and GenBank accession numbers. Numbers on the first column refer to sampling localities (each one shown in Fig. 1)

	Locality	Latitude	Longitude	Sample size	Catalogue number	Haplotype code	Lineage	GenBank accession number
45	COSTA RICA: 2.2 km E (by road) La Trinidad de Dota, San Jose, 2640 m	9.672	-83.855	1	MVZ164938	120SJCR	A	KP284425
1	GUATEMALA: 1.3 km NE Las Torres, Cerro San Gil, Depto. Izabal, 810 m	15.666	-88.683	2	CM117024, 117025	2SGGU 3SGGU	B	KP284307 KP284308
42	MEXICO: Manuel Gutiérrez Nájera, Misantla, Veracruz, 878 m	19.792	-96.860	3	MZFC11177, 11178, 11179	117MiVE 118MiVE	C	KP284422 KP284423
43	MEXICO: Pueblo Viejo, Misantla, Veracruz, 724 m	19.814	-96.867	1	MZFC11171	118MiVE	C	KP284423
44	MEXICO: Puente del Río Camarones, Tutotepeq, Hidalgo, 1130 m	20.391	-98.223	3	MZFC9000, 8997, 8995	119TuHG	C	KP284424
25	GUATEMALA: Comunidad Unión Victoria, 2.7 km N, 3.8 km E Pochuta, Chimaltenango, 1235 m	14.575	-91.048	4	USAC5033, 5039, 5040, 5042	80PoGU 81PoGU 82PoGU	D	KP284385 KP284386 KP284387
26	GUATEMALA: Finca Jurun [Montaña El Chilar], Palin, Escuintla, 996 m	14.356	-90.727	3	USAC5055, 5056, 5057	81PoGU 83PaGU	D	KP284386 KP284388
27	GUATEMALA: Finca Los Andes, Patulul, Suchitepequez, 1566 m	14.549	-91.181	2	USAC5333, 5334	84AtGU	D	KP284389
9	MEXICO: 3 km NW Tapalapa, Chiapas, 1960 m	17.192	-93.122	5	ECO151,152,153, 161, 159	23TaCH 24TaCH 25TaCH 26TaCH	E	KP284328 KP284329 KP284330 KP284331
10	MEXICO: Cerro Tzontehuitz, 21 km NE San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, 2725	16.823	-92.579	9	ECO1438,1439, 1818, 1819, 1820, 1816, 695, 696, 697	41TzCH 42TzCH 43TzCH 44TzCH 45TzCH	E	KP284346 KP284347 KP284348 KP284349 KP284350
11	MEXICO: Las Grutas, 3.45 km N El Vivero, Lagos de Montebello National Park, Chipas, 1513	16.135	-91.726	6	ECO1427, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219	27GrCH 28GrCH 29GrCH 30GrCH	F	KP284332 KP284333 KP284334 KP284335
12	GUATEMALA: Río Xaclbal, ca. 26.3 km N, 6.3 km W Chajul, Quiche, 656 m	15.725	-91.100	3	USAC4531,4532, 4533	31XaGU	F	KP284336
13	GUATEMALA: Río Cuatro Chorros, 19 km N, 16 km E Chicaman, Quiche, 619 m	15.536	-90.662	1	USAC4534	32ChGU	F	KP284337
14	GUATEMALA: Aldea San José Maxbal, 15.4 km N Santa Cruz Barillas, Huehuetenango, 1449 m	15.946	-91.307	8	USAC4942, 4943, 4944, 4945, 4947, 4949, 4968, 4969	33MaGU 34MaGU	G	KP284338 KP284339
15	GUATEMALA: 2.8 km S Aldea Yalambojoch, San Mateo Ixtatan, Huehuetenango, 1911 m	15.963	-91.570	5	USAC4763, 4764, 4765, 4758, 4746	35YaGU 36YaGU 37YaGU 38YaGU	G	KP284340 KP284341 KP284342 KP284343
16	GUATEMALA: Finca Ixcansán, 10.3 km E Aldea Yalambojoch, 1647 m	16.006	-91.499	5	USAC4748, 4759, 4749, 4750, 4747	39IxGu 40IxGU	G	KP284344 KP284345
17	GUATEMALA: LajChimel, 12.6 km N, 9.0 km E Uspatan, Quiche, 2490 m	15.462	-90.788	8	USAC5108,5116, 5118, 5122, 5125, 5130, 5131, 5132	46LjGU 47LjGU 48LjGU 49LjGU 50LjGU 51LjGU	H	KP284351 KP284352 KP284353 KP284354 KP284355 KP284356
18	GUATEMALA: Aldea Sumalito, ca. 19.6 km N, 12.4 km W Nebaj, Quiche, 1589	15.547	-91.154	3	USAC4970, 4971, 4972	52NeGU 53NeGU 54NeGU	H	KP284357 KP284358 KP284359
19	GUATEMALA: ca. 10.8 km NW San Mateo Ixtatan, Huehuetenango, 2871 m	15.889	-91.551	5	USAC4896, 4897, 4870, 4898, 4899	55XtGU 56XtGU	H	KP284360 KP284361

Table 1. (continued)

	Locality	Latitude	Longitude	Sample size	Catalogue number	Haplotype code	Lineage	GenBank accession number
20	GUATEMALA: Cerro Bobi, 2.5 km S, 2.75 km W San Mateo Ixtatan, Huehuetenango, 3079 m	15.805	-91.506	2	USAC4760, 4752	57BoGU 58BoGU	H	KP284362 KP284363
21	MEXICO: Poligono I, El Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas, 2000 m	15.655	-92.805	3	ECO1183, 1185, 1188	59TrCH 60TrCH 61TrCH	I	KP284364 KP284365 KP284366
22	GUATEMALA: Parque Regional Municipal de San Marcos, ca. 0.8 km N, 4.2 km W San Marcos, 2712	14.973	-91.826	12	USAC4995, 4998, 4999, 5001, 5002, 5004, 5011, 5012, 5013, 5014, 5015, 5023	62SMGU 63SMGU 64SMGU 65SMGU 66SMGU 67SMGU 68SMGU	I	KP284367 KP284368 KP284369 KP284370 KP284371 KP284372 KP284373
24	GUATEMALA: Fuentes Georginas, 3.8 km S, 0.3 km E Zunil, Quetzaltenango, 2433 m	14.749	-91.480	8	USAC4685, 4684, 4683, 4682, 4643, 4656, 4644, 4645	73GUGe 74GeGU 75GeGU 76GeGU 77GeGU 78GeGU 79GeGU	J	KP284378 KP284379 KP284380 KP284381 KP284382 KP284383 KP284384
2	GUATEMALA: Finca Bethel, San Pedro Carcha, Depto. Alta Verapaz, 1430 m	15.612	-90.273	1	USAC5151	1CaGU	K	KP284306
36	GUATEMALA: Aldea El Escobal, 0.6 km S, 2.7 km E San Rafael Las Flores, Santa Rosa, 1420 m	14.470	-90.156	6	USAC4927, 4928, 4929, 4933, 4936, 4937	104EsGU 105EsGU 106EsGU	L	KP284409 KP284410 KP284411
37	GUATEMALA: Río Pachum, San Antonio Las Trojes, San Juan Sacatepequez, Guatemala, 1507 m	14.754	-90.702	4	USAC5412, 5413	107PaGU	L	KP284412
38	GUATEMALA: Río Pachum, Finca San Gabriel, San Juan Sacatepequez, Guatemala, 1506 m	14.755	-90.702	1	USAC5414	108PaGU	L	KP284413
39	GUATEMALA: Finca Concepción, 3.5 km N, 6.4 km W San Juan Sacatepequez, Guatemala, 1609 m	14.752	-90.704	1	USAC5050	108PaGU	L	KP284413
40	GUATEMALA: Finca Los Angeles, Aldea El Pueblito, Santa Catarina Pinula, Guatemala, 1700 m	14.550	-90.483	7	CM117007, 117008, 117009, 117010, 117003, 117005, 117006	109PnGU 110PnGU 111PnGU 112PnGU 113PnGU 114PnGU	L	KP284414 KP284415 KP284416 KP284417 KP284418 KP284419
41	GUATEMALA: El Frutal, Guatemala City, ca. 7.3 km S, 2.8 km W, 1260 m	14.516	-90.550	2	CM117021, 117022	115FrGU 116FrGU	L	KP284420 KP284421
28	HONDURAS: Don Tomas camping station, Celaque National Park, Lempira, 2075 m	14.533	-88.650	5	CM113090, 113091, 113093, 113094, 113095	85CeHO 86CeHO 87CeHO 88CeHO	M	KP284390 KP284391 KP284392 KP284393
29	HONDURAS: Naranjo camping station, Celaque National Park, Lempira, 2560 m	14.533	-88.666	2	CM113086, 113077	86CeHO	M	KP284391
30	HONDURAS: Visitors Center, Celaque National Park, Lempira, 1430 m	14.550	-88.630	3	CM113096, 113103, 113105	86CeHO 89CeHO	M	KP284391 KP284394
31	HONDURAS: El Mojon (summit), Celaque National Park, Lempira, 2850 m	14.533	-88.680	1	CM113071	89CeHO	M	KP284394
32	EL SALVADOR: El Imposible National Park, Sonsonate, 806 m	13.836	-89.937	3	USAC5058, 5059, 5060	90ImES 91ImES 92ImES	M	KP284395 KP284396 KP284397

Table 1. (continued)

	Locality	Latitude	Longitude	Sample size	Catalogue number	Haplotype code	Lineage	GenBank accession number
33	EL SALVADOR: Cerro Cacahuatique Natural Protected Area, Morazán, 1500 m	13.750	-88.216	11	USAC5061, 5062, 5063, 5064, 5065, 5066, 5069, 5072, 5073, 5074, 5075	93MoES 94MoES 95MoES 96MoES 97MoES 98MoES	M	KP284398 KP284399 KP284400 KP284401 KP284402 KP284403
34	GUATEMALA: Aldea El Durazno, 4.7 km N, 13.6 km E Chiquimula, 1593 m	14.841	-89.672	2	USAC5415, 5416	99CqGU 100CqGU	M	KP284404 KP284405
35	GUATEMALA: Volcan Suchitan, 4.8 km S, 4 km W Sta. Catarina Mita, Jutiapa, 1891 m	14.404	-89.781	6	USAC5368, 5383, 5384, 5385, 5391, 5345	101SuGU 102SuGU 103SuGU	M	KP284406 KP284407 KP284408
3	NICARAGUA: Posada Tisey, Área Protegida Tisey-Estanzuela, Depto. Estelí, 1580 m	12.985	-86.370	1	UNAN001	8EsNI	N	KP284313
4	HONDURAS: Sendero Esperanza, La Tigra National Park, Distrito Central, 1900 m	14.200	-87.116	4	CM118680, 118681, 118682, 118683	4TgHO 5TgHO 6TgHO 7TgHO	N	KP284309 KP284310 KP284311 KP284312
5	HONDURAS: Senderos Los Cuatro Pavos and Pizote, La Muralla National Park, Depto. Olancho, 1480 m	15.083	-86.733	11	CM118722, 118723, 118725, 118726, 118727, 118728, 118729, 118732, 118733, 118735, 118736	9MuHO 10MuHO 11MuHO 12MuHO 13MuHO 14MuHO 15MuHO	N	KP284314 KP284315 KP284316 KP284317 KP284318 KP284319 KP284320
6	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 1750 m	14.974	-85.917	6	CM113133, 113142, 113150, 113158, 113161, 113162	16AgHO 18AgHO 19AgHO 20AgHO	N	KP284321 KP284323 KP284324 KP284325
7	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 2030 m	14.957	-85.918	2	CM113172, 113173	17AgHO 21AgHO	N	KP284322 KP284326
8	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 1380 m	14.993	-85.956	1	CM113129, 113115	17AgHO 22AgHO	N	KP284322 KP284327
23	GUATEMALA: La Cabaña, 3 km O Cerro Pinalon, Las Minas Biosphere Reserve, El Progreso, 2558 m	15.081	-89.942	6	USAC4409, 4410, 4411, 4419, 4431, 4434	69PiGU 70PiGU 71PiGU 72PiGU	O	KP284374 KP284375 KP284376 KP284377

Acronyms of institutions are as follows: CM: Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, PA; MZFC: Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias UNAM, Mexico City; MVZ: Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, CA; ECO: El Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de las Casas, Chiapas, México; UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua; USAC: Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala City

rose gels stained with 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ethidium bromide and visualized with UV light. We amplified the mitochondrial gene for cytochrome *b* (*cyt b*) using the following primer pairs (Smith and Patton 1993): MVZ 05M-04M, 45M-16M, 47M-14M, 05M-16M and 45M-14M, covering the complete 1143 bp. Amplifications were performed in 25  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 20–25 ng template DNA, 3.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5  $\mu\text{l}$  of reaction buffer (10 $\times$ ), 1 mM dNTP, 1  $\mu\text{M}$  of each primer and 0.5 Unit per 25  $\mu\text{l}$  of Taq DNA polymerase. The PCR cycling protocol was 4 min initial denaturation at 94°C, followed by 34 cycles involving 94°C denaturing for 60 s, annealing at 50°C for 60 s, an extension at 72°C for 60 s and a final extension of 72°C for 4 min, with a PTC-100 thermocycler (M.J. Research, Quebec, Canada). We included negative controls in all amplifications to check for potential contamination and conducted multiple independent PCR amplifications with random samples to ensure reproducibility and correct readings. Purification and sequencing of samples were performed by the UW High Throughput Genomics Center, Seattle, WA. To ensure correct identification, we performed independent searches for all the sequence fragments obtained, using the Basic Local

Alignment Search Tool (BLAST) (Zhang et al. 2000; Morgulis et al. 2008). Forward and reverse sequences for each individual were aligned and edited manually using BIOEDIT 7.1.3 (Hall 1999) for a final fragment of 1113 bp.

### Phylogenetic analyses

We selected the best model of sequence evolution for our data with the program JMODELTEST 2.1.3 (Guindon and Gascuel 2003; Durraba et al. 2012) and the Akaike information criterion (AIC). Phylogenetic analyses were performed with maximum-likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. We included five species as outgroup, their *cyt b* sequences obtained from GenBank: *Calomyscus hotsoni* (EU135583, Norris et al. 2008), *Neotoma albigula* (AF108704, Smith and Patton 1999), *Isthmomyris pirrensis* (DQ836298, Miller and Engstrom 2008), *Reithrodontomys sumichrasti* (AF108709, Smith and Patton 1999) and *Habromys lophurus* (DQ861398, Rogers et al. 2007).

We implemented the ML analysis using PHYLML 3.0 (Guindon et al. 2010), including 120 unique sequences (haplotypes) and the best-fit model obtained for our data. Considering the uncertainty regarding limits between species and to ascertain the taxonomic identity of our haplotypes by means of comparisons with taxonomic information, we included in the phylogenetic analyses one known sequence for each of the six recognized species, selected on the basis of not only on previous identifications, but specially targeting those from as close as possible to the type localities. The selected sequences were *Peromyscus mexicanus* from Veracruz (GenBank accession number EF028174.1), *P. nudipes* from Costa Rica (EF989992.1), *P. gymnotis* from Chiapas (EF028169.1), *P. zarhynchus* from Chiapas (EF028167.1), *P. guatemalensis* from Guatemala (GQ461926.1) and *P. grandis* from Guatemala (GQ461925.1), all of which were part of previous phylogenetic analyses (Durish et al. 2004; Bradley et al. 2007; Miller and Engstrom 2008; Ordóñez-Garza et al. 2010).

We used a starting neighbour-joining tree, with a tree searching option of nearest neighbour interchange (NNI), and a nonparametric branch support of approximate likelihood ratio test based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure (aLRT SH-like). For the BI analysis, implemented in MRBAYES 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001), we used default settings and a GTR-I-G nucleotide model of substitution, allowing the program to estimate specific parameters, with four chains sampled every 1000 generations for 10 million generations, and a burnin of 3000. Convergence and stationarity within chains were visualized with TRACER v.1.4 (Rambaut and Drummond 2007), and 30% of generations were discarded as burnin. Topologies were visualized and edited in FIGTREE v.1.4.0 (Rambaut 2013).

We used the topologies obtained with ML and BI to explore whether allopatric or parapatric patterns of diversification were evident for the Sierra de los Cuchumatanes in north-western Guatemala, which is the only area with enough data to explore this. We based this analysis on the hypothesis that, in a parapatric topology, it is expected that nearby localities and haplotypes located in the same mountain share a common ancestor relative to other mountains. On the contrary, in an allopatric topology, localities will have their closest relatives not in the same mountain but in a different nearby mountain. These patterns have been described for mice that show altitudinal segregation in the Andes (Patton and Smith 1992; Moritz et al. 2000).

### Genetic diversity and differentiation

We performed Tajima's *D* (Tajima 1989), Fu and Li *D* and *F* (Fu and Li 1993) and Fu's *F<sub>S</sub>* (Fu 1997) tests to evaluate whether sequences conformed to a neutral model of evolution; statistical significance was determined using the coalescent simulator in DNASP 5.10 (Librado and Rozas

2009). Genetic diversity was estimated with DNASP as the number of haplotypes, number of segregating sites (*S*), haplotype (*h*) and nucleotide ( $\pi$ ) diversity values and mean number of pairwise differences (*k*), for the complete data set and also for the different lineages obtained (see Results). To evaluate levels of differentiation between lineages and with respect to outgroup species, we estimated the uncorrected p-distance. In order to be able to compare with other studies of peromyscines in which Kimura 2-parameter (K2P) (Kimura 1980) has been the common distance measure used, we also estimated K2P; all distances were calculated using MEGA v5.2 (Tamura et al. 2011). Genetic structure between the different lineages was evaluated with an analysis of molecular variance (AMOVA), which characterizes patterns of genetic variation at different hierarchical levels; significance level was set at  $\alpha = 0.05$  and 10 000 random permutations as implemented in ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010). This hierarchical approach considers the genetic structuring among lineages ( $\Phi_{CT}$ ), among sampling localities within lineages ( $\Phi_{SC}$ ), and within sampling localities ( $\Phi_{ST}$ ) and takes into account the molecular distance between haplotypes (number of pairwise differences).

## Results

### Molecular diversity and phylogenetic lineages

We amplified a 1113-bp fragment of *cyt b* from 186 individuals from 45 localities, which includes 339 polymorphic sites, 254 parsimony informative sites and 120 unique haplotypes. Molecular variability was high for haplotype ( $h = 0.993 \pm 0.001$ ) and nucleotide ( $\pi = 0.0681 \pm 0.0017$ ) diversity values (Table 2), with an average number of nucleotide differences among haplotypes (*k*) of 71. Tajima's ( $D = 0.171$ ,  $P > 0.1$ ), Fu and Li's ( $D = 0.455$ ,  $F = 0.701$ ,  $P > 0.1$ ) and Fu's tests ( $F_s = -11.851$ ,  $P > 0.1$ ) indicated no departures from neutrality in molecular variation (Table 2). The best-fit model obtained was GTR-I-G (p-inv = 0.53, gamma shape = 1.4); base frequencies were A = 0.336, C = 0.329, G = 0.096 and T = 0.238; and rates of substitution were: [AC] = 2.869, [AG] = 17.294, [AT] = 1.940, [CG] = 0.628, [CT] = 27.340 and [GT] = 1.0.

Maximum-likelihood (Fig. S2) and Bayesian (Fig. 2) analyses showed similar topologies, with a marked mitochondrial structure and high posterior probability support (PP = 1.0–0.78). Convergence of the BI analysis was assessed after 100 million generations, obtaining a final average standard deviation of split sequences = 0.00082 and potential scale reduction factors (PSRF) for all model parameters = 0.999–1.000. The phyloge-

Table 2. Genetic diversity values for the 15 lineages (A–O) of the *Peromyscus mexicanus* group from Nuclear Central America. Number of sequences and of different haplotypes (Seqs/hap), haplotype diversity (*h*), nucleotide diversity ( $\pi$ , Jukes and Cantor), number of polymorphic sites (*S*) and average number of nucleotide differences (*k*) are indicated. Neutrality tests: Tajima's *D* (Tajima 1989), Fu and Li *D* and *F* (Fu and Li 1993) and Fu's *F<sub>S</sub>* (Fu 1997)

	Seqs/hap	<i>h</i>	$\pi$	<i>S</i>	<i>k</i>	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F<sub>S</sub></i>	Fu and Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>
A	1/1	–	–	–	–	–	–	–	–
B	2/2	–	–	–	–	–	–	–	–
C	7/3	–	–	–	–	–	–	–	–
D	9/5	0.720	0.0017	8	1.9	–1.540	–0.910	–1.596	–1.766
E	14/9	0.930	0.0151	48	16.6	0.441	2.044	0.127	0.245
F	10/6	0.867	0.0046	12	5.1	0.902	0.430	0.225	0.441
G	18/8	0.850	0.0095	26	10.5	1.536	3.090	1.213	1.515
H	18/13	0.940	0.0090	29	9.9	0.730	–1.626	0.352	0.535
I	15/10	0.857	0.0050	21	5.6	–0.546	–1.743	–0.471	0.565
J	8/7	0.964	0.0025	7	2.8	0.151	–3.468*	0.039	0.072
K	1/1	–	–	–	–	–	–	–	–
L	19/13	0.970	0.0058	23	6.4	–0.066	–2.932	1.142	0.916
M	33/19	0.955	0.0072	32	7.9	0.026	–3.652	–0.188	–0.138
N	25/19	0.973	0.0141	65	15.4	–0.405	–2.589	0.396	0.167
O	6/4	0.870	0.0031	8	3.4	–0.174	0.462	–0.302	–0.296
All	186/120	0.990	0.0680	339	71.7	0.729	–11.857	0.455	0.701

\*  $P < 0.05$ .

netic results based on the BI tree recovered four main clades (I–IV), which are subdivided into 15 lineages (A–O, Fig. 2, Table 1). Clades I, II and III are not well represented in our analysis (low sample size) and their phylogenetic relationship with respect to the remaining clade is not well resolved, although clades III and IV show high support values in all of the topologies recovered (PP = 0.96–0.98). Lineage A (Clade I) belongs to a unique sample from the highlands of San Jose, Costa Rica (Chorotega block; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2013; Fig. 1); lineage B (Clade II) corresponds to two samples from the low elevation mountains in north-eastern Guatemala (Caribbean slope of the Maya block). Lineage C includes samples from mid-elevations in Hidalgo and Veracruz, Mexico, and lineage D from mid-elevations from the Pacific slope in Guatemala; both lineages are grouped in Clade III.

Clade IV shows a high diversity and includes most of the haplotypes from Nuclear Central America (mountains from Chiapas to Nicaragua, Maya and Chortis blocks; Fig. 2, lineages E–O). The geographic distribution of some of the identified lineages is in accordance with a Gradient model (Moritz et al. 2000), where an allopatric pattern of diversification associated with elevation is consistently observed: lineage E is endemic to Altos de Chiapas (Fig. 1), whereas three different lineages coexist (F, G and H) at the Sierra de los Cuchumatanes in north-western Guatemala and Altos de Chiapas. Lineages F and G are closely related but allopatrically distributed at mid-elevation cloud forests, while lineage H is phylogenetically distinct from F–G, found on the same mountains but also with an allopatric distribution at higher elevations (Fig. 1). Moreover, lineages G and H can be found as close as 8.5 km but without signs of mixture of haplotypes for the populations involved (Fig. 1; localities 15 and 19). Lineages I and J are closely related and distributed at high elevations, being an example of a Gradient model with a parapatric pattern of diversification, with a distribution on the Sierra Madre de Chiapas (Triunfo: lineage I) and Guatemala (San Marcos: lineage I and Quetzaltenango: lineage J). Along the Chortis block, there are two sister lineages: L found at mid-elevations in the mountains of central Guatemala and M located eastwards covering a wide geographic area from eastern Guatemala, El Salvador and southern Honduras. Lastly, lineage N from Chortis Highlands (Honduras and Nicaragua) and lineage O from the Motagua-Polochic-Jocotán fault zone (central Guatemala) are well differentiated.

### Genetic differentiation and taxonomic implications

Based on the phylogenetic results, we classified haplotypes in 15 different mitochondrial lineages (A–O; Fig. 2), which showed high-haplotype ( $h = 0.720–0.970$ ) and low-nucleotide ( $\pi = 0.0017–0.0151$ ) diversity values (Table 2). Regarding genetic differentiation, divergence results between clades based on p-uncorrected and Kimura 2-parameter distance measures were highest in comparisons between clades I, II and III and lower in those with Clade IV; *Calomyscus* showed the highest and *Habromys* the lowest genetic distance when compared with the four clades (Table S1). Divergence results within the *P. mexicanus* group showed that the basal lineages differ greatly from each other (Tables S2, S3): A and B are highly divergent from any other lineage (p-uncorrected = 0.074–0.096 and 0.088–0.099; K2P = 0.081–0.105 and 0.095–0.108, respectively); other comparisons with high differentiation include those between lineages C (Sierra Madre Oriental, Mexico), D (Central America Volcanic Arc, southern Chiapas and Guatemala) and G (Maya Highlands in Chiapas and Guatemala) in comparison with the rest, while the lowest were between lineage I and lineages H and

J and between L and M (p-uncorrected = 0.024–0.034; K2 = 0.030–0.034; Tables S2, S3). The observed genetic structure for the *P. mexicanus* group is supported by the AMOVA analysis: genetic variability is significantly distributed predominantly among lineages (84.11%), followed by that among sampling localities within lineages (11.05%) and with a smaller proportion for that within sampling localities (4.84%) (Table S4). We performed the AMOVA analysis without the four populations that had only one sequence, and the results were significant and practically identical (84.32%, 10.82% and 4.86%, respectively).

The mitochondrial phylogeny obtained is not consistent with the current identification of species in museum collections: if we consider those identifications and our phylogenetic results (see Fig. 2), only one species would result monophyletic (*P. nudipes*), three polyphyletic (*P. mexicanus*, *P. grandis* and *P. gymnotis*) and two paraphyletic (*P. guatemalensis* and *P. zarhynchus*) (Fig. 2). On the contrary, the inclusion of the six reference species in the phylogenetic analyses showed that each one is grouped with a lineage that coincides in terms of taxonomic identification (Fig. 2): the *P. mexicanus* sequence is associated with lineage C (identified in our data as *P. mexicanus*), *P. nudipes* with lineage A, *P. gymnotis* with D and *P. grandis* with K. The clade including *P. zarhynchus* corresponds with lineage E (*sensu stricto*), but could include F and G (*sensu lato*), whereas *P. guatemalensis* is grouped with H (*sensu stricto*), but could include I, J and K (*sensu lato*), although nesting *P. grandis* within it. Finally, lineages B, L, M, N and O were not grouped with any of the reference sequences (Fig. 2).

The main diversification patterns for the entire *P. mexicanus* group can be described based on the topology of the phylogenetic tree: a first split between the basal clades (I, II and III) and the most diversified one, Clade IV. Two split events occurred separating lineages from the Motagua-Polochic-Jocotán fault system in Guatemala (Clade II) from clades I/III and later splitting Clade I from Clade III. Within Clade IV, the diversification occurred mainly along the Maya Highlands and Cuchumatanes region in Chiapas and Guatemala, separating lineages E, F and G from the rest. An additional split event included lineages from central Guatemala, Honduras and Nicaragua (lineages N and O), followed by the differentiation of highlands lineages (H, I, J, K) along the Maya Highlands and the Central America Volcanic Arc (Guatemala and Chiapas), separating them from lineages located on the Chortis Highlands west of the Honduras Depression.

### Discussion

The present is, to our knowledge, the most complete study of the *Peromyscus mexicanus* species group in terms of number of species, samples, populations and geographic coverage. Our results provide evidence of the remarkable level of differentiation and of the complex phylogenetic relationships of this rodent group, and allow for the proposal of taxonomic identities and the description of key geologic and historic events likely responsible for its current distribution and diversity within Nuclear Central America. We are aware that some localities and geographic areas were not well covered (e.g. Oaxaca, Nicaragua and Panama) and that analyses are based on one mitochondrial gene. Nonetheless, we consider that the lineages identified and taxonomic delimitations are well supported. Moreover, the congruence between genetic and geographic differentiation, as shown by the distribution of lineages in association with some key biogeographic barriers on the region and with some taxonomically recognized species, strongly support our findings.

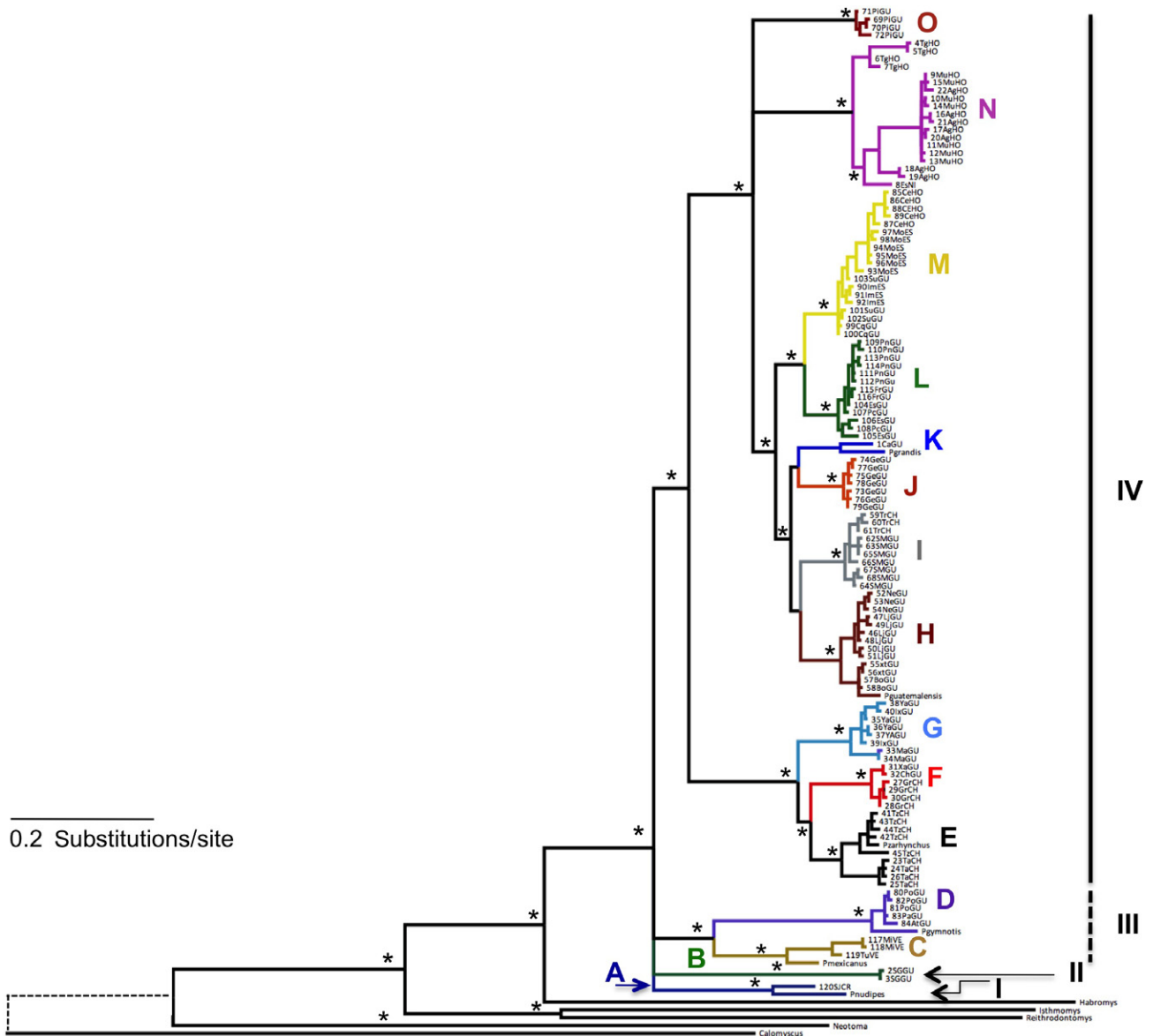


Fig. 2. Bayesian inference tree based on cytochrome *b* sequences of the *Peromyscus mexicanus* species group from Nuclear Central America, showing four main clades (I-IV). The 15 lineages recovered are shown with coloured (in the electronic version) lines and letters: A–O (see also Table 1). \* above branches indicate Bayesian posterior probabilities (>0.9). Outgroup species used in the phylogenetic analyses were *Calomyscus hotsoni*, *Neotoma albigula*, *Isthomys pirrensis*, *Reithrodontomys sumichrasti* and *Habromys lophurus*; the phylogenetic tree was rooted with *Calomyscus*, the placement of which is indicated by the dashed line and the branch length is not in scale. Previous taxonomic identifications for some lineages correspond to *P. mexicanus sensu stricto* (C), *P. mexicanus* (lineages A, B, D, F, M, N), *P. gymnotis* (D, M), *P. guatemalensis sensu stricto* (H), *P. guatemalensis* (I, J, L) and *P. grandis sensu stricto* (K, O).

### Genetic diversity and phylogenetic relationships

Phylogenetic results (ML and BI) showed that the *P. mexicanus* species group is genetically structured at different levels. There are four main clades, with genetic distances that range from 8.6% to 11%, which are considered within the limits reported between different species in *Peromyscus* (2.8–10.2%; Baker and Bradley 2006). In addition, the genetic distances observed between the clades and the outgroup species used (14–24%) support a *P. mexicanus* group that is monophyletic and encompasses these four clades.

Our extensive sampling allowed us to determine more clearly the phylogenetic patterns within the group. Our results show, at a more local level, a highly structured relationship defined as 15 different lineages (A–O; Fig. 2). The first evident outcome is that

some lineages are in agreement with the patterns reported by Ordóñez-Garza et al. (2010), corroborating that *P. grandis* and *P. guatemalensis* are closely related to each other, followed by *P. zarhynchus* and *P. nudipes* as successively more basal species, and also that *P. nudipes* and *P. mexicanus* are separate species (Hooper 1968). Differentiation between lineages based on genetic distance measures (p-uncorrected = 2.4–9.9%; K2P = 3.0–10.8%) is similar to values observed for species within the *Peromyscus melanophrys* (Castañeda-Rico et al. 2014), *P. boylii*, *P. aztecus* and *P. truei* groups (Tiemann-Boege et al. 2000; Durish et al. 2004). Genetic distance measures may be useful for the determination of species boundaries and, in accordance with the hypothesis of cryptic species in small mammals (Bradley and Baker 2001; Baker and Bradley 2006), levels of mitochondrial differentiation as those found in this study have

been used as criteria for the description of new forms of *Peromyscus* (Bradley et al. 2004, 2014).

### Biogeographic patterns and the mountains of Nuclear Central America

Differentiation of lineages and the potential taxonomic implications are supported by the main biogeographic patterns apparent from our results. As it has been revealed by other studies with peromyscines (Sullivan et al. 1997; Dawson 2005; Ordóñez-Garza et al. 2010; Castañeda-Rico et al. 2014), our results evidence that the intricate geologic and topographic history of Mesoamerica in general and Nuclear Central America in particular have had a great impact on the present day distribution of these rodents. Peromyscines, since their first diversification in the Mid Pliocene to Early Pleistocene (Dawson 2005), have experienced numerous speciation, dispersal and expansion events in concert with climate, orogenic and volcanic processes, fragmentation and habitat changes that characterize the history of this region (Woodburne 2010; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2013, and references therein).

Phylogenetic results show that the diversification of the entire *P. mexicanus* group was followed by a markedly rapid radiation that continued intermittently, with a series of diversification events and numerous recent splits during the Pleistocene (Dawson 2005) and onwards (Fig. 2). Notably, genetic diversity was high for the entire group ( $h = 0.993$ ;  $\pi = 0.0681$ ) and also within lineages, which is most likely related to the high recent diversification experienced by all lineages as seen with other rodents in the region (*Otodylomys phyllotis*; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2012; *P. melanophrys*, Castañeda-Rico et al. 2014).

The biogeographic barriers that characterize Nuclear Central America (e.g. volcanoes, mountain ridges, extended valleys) are recognized as key factors that have promoted high levels of diversification and endemism for different taxa (Strecker et al. 2004; Crawford and Smith 2005; Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2012; Suárez-Atilano et al. 2014). In addition, mountains represent a source for diversification, especially between lowlands and highlands species, which exhibit strong intraspecific differentiation and genetic variation, as shown particularly in species of *Peromyscus* (Zimmerman et al. 1978; Ordóñez-Garza et al. 2010; Castañeda-Rico et al. 2014).

Our results show an altitudinal segregation of lineages mainly in an allopatric distribution pattern, while a parapatric pattern is also observed. It is worth noting the split of two lineages (C and D; Clade III), likely associated with the presence of the Isthmus of Tehuantepec, lineages that indeed belong to different subspecies as shown by the taxonomic analysis, lineage C is associated with *P. mexicanus* and lineage D with *P. gymnotis* (Fig. 2). The separation of lineage N (eastern Honduras and western Nicaragua) and lineage O (Sierra de las Minas) from the majority of Nuclear Central American lineages can be associated with biogeographic barriers like the Motagua-Polochic-Jocotán fault system and the Honduras Depression (Fig. 1), a pattern observed for other rodent species (Gutiérrez-García and Vázquez-Domínguez 2012).

In addition, separation of lowland and highland lineages occurred repeatedly, with a more recent split of lineages L (predominantly highland) and M (predominantly lowland) at the Chortis Highlands, westwards of the Honduras Depression. Altitudinal segregation is congruent with the hypothesis that genetic divergence is stronger in topographically more complex regions (Guarnizo and Cannatella 2013), a phenomenon that might be more common than previously recognized. Differentiation was

also observed for lineages that have no apparent barrier to gene flow, like G and H, which are as close as 8.5 km. Diversification between highland lineages also occurred, as shown by the separation of lineage H (mountains at the Cuchumatanes) from lineages I, J and K (mountains along the Chortis Highlands in Guatemala and Sierra de Chamá). These results support the allopatric differentiation of lineages as a result of isolation on separate mountain systems both within the highlands and between lowlands and highlands in the region, as shown in other species (e.g. *Peromyscus furvus*, Harris et al. 2000; *P. melanophrys*, Castañeda-Rico et al. 2014).

Notably, the phylogenetic results also showed that the six taxonomically recognized species, some located close to type localities, are grouped with our identified different lineages. Lineage C (from the *P. mexicanus* type locality near Mirador, Veracruz) coincides with the *P. mexicanus* sequence included in the analysis (Fig. 2). Accordingly, we consider that lineage C is an adequate reference for the *mexicanus* group and species. Similarly, the association observed between *P. gymnotis* and lineage D, *P. zarhynchus* with E and *P. guatemalensis* with H, support the differentiation among these lineages. *P. nudipes* and *P. grandis* coincide with A and K, respectively, although these lineages are represented by a single sequence in our data. Nonetheless, there are five different and distinctive lineages that were not grouped with any of the reference sequences included in the analysis (B, L, M, N and O).

The phylogenetic results and their association with key geographic features strongly suggest that most lineages may represent independent evolutionary units or distinct species under a lineage species concept (de Queiroz 2007). The current taxonomy of the group only partially reflects the different lineages and distributions. It is important to emphasize that, despite many populations of *Peromyscus* in Central America have been traditionally considered as part of a morphologically variable and widespread species, altogether named as *P. mexicanus*, none of the Central American lineages identified in this study fit with lineage C of the species *P. mexicanus*, highlighting the need to taxonomically rearrange some lineages. On the other hand, our data support the validity as species (de Queiroz 2007) of lineages B, L, M and N, which can be associated with three species names and descriptions established nearly one hundred years ago, but which are considered invalid names. We are cautious about proposing rearrangements; instead, we have the following taxonomic suggestions:

*Peromyscus nicaraguae* (Allen 1908), *stat nov*, to be resurrected from synonymy with *Peromyscus mexicanus saxatilis*. Mice from lineage N have been traditionally assigned to *P. mexicanus saxatilis*, but our results clearly distinguish it from *P. mexicanus* of central Mexico or any other lineage in Nuclear Central America. Also, there are no signs of sympatry with populations within that distribution. Although lineage N shows some genetic structure within, we suggest to group the haplotypes distributed both in Honduras and Nicaragua into the only available name for the area.

*Peromyscus salvadorensis* (Dickey 1928), *stat nov*, to be resurrected and upgraded from synonymy with *Peromyscus mexicanus saxatilis*. Lineages L and M are restricted to the Chortis Highlands from eastern Guatemala (Chiquimula, Volcán Suchitán, Trifinio), El Salvador (El Imposible and Cerro Cacahuatique) and southern Honduras (Celaque National Park). It has also been previously identified as *P. mexicanus saxatilis* or confused with *P. gymnotis*; however, the phylogenetic and geographic information indicates high levels of differentiation within isolated mountains in the region, clearly differentiating these lineages from any other in Nuclear Central America. Until we have



more detailed information, we suggest to assign the other available name in the area, *P. mexicanus phylombrius* (Dickey 1928) as a synonym, supported by the fact that we included samples from the *P. salvadorensis* type locality at Cerro Cacahuatique in El Salvador.

*Peromyscus tropicalis* (Goodwin 1932), *stat nov.*, to be resurrected and upgraded from synonymy with *Peromyscus mexicanus saxatilis*. Lineage B from the Caribbean slope in northern Guatemala has been traditionally assigned to *P. mexicanus*, but our data show that it is one of the four basal clades (II) of the entire *P. mexicanus* group, which merits recognition as a distinct species.

In conclusion, our information highlights the need to review the taxonomic status within the entire *Peromyscus mexicanus* group. We must emphasize that we evidence a group of lineages – candidate species – that have no available names to assign to them, although we recognize we need a more detailed analysis to help decipher the validity of these lineages, with a more intense sampling within specific localities, and including morphological and distribution information and phylogeographic analyses (S.G. Pérez-Consuegra, E. Vázquez-Domínguez, L. Sánchez-Tovar, G. Rodríguez-Tapia, S. Castañeda-Rico in preparation). We believe our results can inspire new questions and hypotheses regarding not only this evolutionary outstanding rodent group but also other taxa distributed in Nuclear Central America.

## Acknowledgements

Field permits were granted by Consejo Nacional de Áreas Protegidas in Guatemala City (Franklin Herrera and Edson Flores) and by Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales in San Salvador (Néstor Herrera). Suzane McLaren facilitated fresh tissues from the Carnegie Museum of Natural History (National Geographic Society Grant 6508-98 to Timothy J. McCarthy). We acknowledge the assistance of Gustavo Cruz and students from the Natural History Museum, Universidad Nacional Autónoma de Honduras. In Guatemala, field assistance and guidance was received from Sean Rovito, James Patton and Theodore Papenfuss from the Museum of Vertebrate Zoology (National Science Foundation Grant DEB1026396). We greatly acknowledge tissue sample donations from Livia León Paniagua and Anahí Ávila (Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM); Consuelo Lorenzo (El Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de las Casas, Chiapas); James L. Patton (Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley); and Arnulfo Medina (Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León). We thank Laura Sánchez for the potential distribution maps. The entire molecular work was conducted at Instituto de Ecología, UNAM, with special thanks to the guidance of Daniel Piñero, Marco Suárez-Atilano, Tania Gutiérrez-García, Susette Castañeda-Rico and Alejandro Flores-Manzanero. Daunno Chew assisted with the elaboration of maps (Centro de Estudios Conservacionistas, Universidad de San Carlos, Guatemala). We deeply thank two anonymous reviewers for helpful comments on an earlier version. This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). This research was part of the doctoral thesis of SGPC in the UNAM-USAC cooperation programme, with special thanks to Eunice Enríquez in Guatemala and Lilia Espinosa in México. EVD received financial support from CONACyT (Grant 101861) and Papiit (IN217910 and IN219707). SGPC acknowledges the financial support provided by the Program for Postgraduate Studies (PAEP), UNAM and Dirección General de Investigación USAC. We dedicate this manuscript to Timothy John McCarthy, from the Carnegie Museum of Natural History, a dear friend who assembled important scientific collections of small mammals from Central America.

## Resumen

*Filogenia del grupo Peromyscus mexicanus de América Central Nuclear*

El grupo de ratones de montaña *Peromyscus mexicanus* está actualmente compuesto por seis especies, sin embargo los límites

entre especies no están bien resueltos, que incluyen dos especies consideradas monotípicas y las otras cuatro con múltiples nombres a nivel de subespecie. Con base en el muestreo más extenso del grupo a lo largo de su distribución en América Central Nuclear, utilizamos datos del gen mitocondrial citocromo b para evaluar su diversidad genética, filogenia y principales patrones biogeográficos y de diversificación. Nuestra filogenia mitocondrial refleja sólo parcialmente la taxonomía actual del grupo, coincidiendo con algunas de las especies taxonómicamente reconocidas. Específicamente, nuestros resultados filogenéticos muestran que el grupo está fuertemente estructurado, compuesto por cuatro clados con distancias genéticas entre 11 y 8.6%. Se observa una diferenciación notable a escala más local, incluyendo 15 linajes diferentes con una alta diversidad nucleotídica y haplotípica ( $\pi = 0.068$ ,  $h = 0.99$ ) y con valores de divergencia y distancia genética ( $p$ -no corregida = 9.9–2.4%;  $K2P = 10.8$ –3.0%) similares a los observados entre especies dentro de *Peromyscus*. Por lo tanto, proponemos que el nombre de referencia *Peromyscus mexicanus* es polifilético y debería restringirse a las montañas del centro de México al oeste del Istmo de Tehuantepec. Sugerimos limitar las otras cinco especies actualmente reconocidas a igual número de linajes, como monofiléticas, así como revalidar tres sinonimias: *Peromyscus salvadorensis*, *P. nicaraguae* y *P. tropicalis*. El Istmo de Tehuantepec, el sistema de fallas Motagua-Polochic-Jocotán, las montañas Mayas y la Depresión de Honduras son ejemplos de elementos geográficos que pueden asociarse con la diferenciación de algunos linajes. Otros linajes son candidatos adecuados para ser especies, por ello la necesidad de revisar en su totalidad el estatus taxonómico del grupo *P. mexicanus*.

## References

- Allen JA (1891) *Hesperomys (Vesperimus?) nudipes*. Bull Am Mus Nat Hist 3:213.
- Allen JA (1908) Mammals from Nicaragua. Bull Am Mus Nat Hist 24:647–670.
- Allen JA, Chapman FM (1897) On mammals from Yucatán, with description of new species. Bull Am Mus Nat Hist 9:1–12.
- Baker RJ, Bradley RD (2006) Speciation in mammals and the genetic species concept. J Mammal 87:643–662.
- Bangs O (1902) Chiriqui mammals. Bull Mus Comp Zool Harv 39:15–51.
- Bradley RD, Baker RJ (2001) A test of the genetic species concept: cytochrome b sequences and mammals. J Mammal 82:960–973.
- Bradley RD, Carroll DS, Hayne ML, Martinez RM, Hamilton MJ, Kilpatrick CW (2004) A new species of *Peromyscus* from western México. J Mammal 85:1184–1193.
- Bradley RD, Durish ND, Rogers DS, Miller JR, Engstrom MD, Kilpatrick CW (2007) Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome b sequences. J Mammal 88:1146–1159.
- Bradley RD, Ordóñez-Garza N, Sotero-Caio CG, Huynh HM, Kilpatrick CW, Iñiguez-Dávalos LI, Schmidly DJ (2014) Morphometric, karyotypic, and molecular evidence for a new species of *Peromyscus* (Cricetidae: Neotominae) from Nayarit, Mexico. J Mammal 95:176–186.
- Carleton MD (1989) Systematics and evolution. In: Kirkland GL, Layne JN (eds), Advances in the Study of *Peromyscus* (Rodentia). Texas Tech University Press, Lubbock, pp 7–141.
- Castañeda-Rico S, León-Paniagua L, Vázquez-Domínguez E, Navarro-Sigüenza AG (2014) Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: the *Peromyscus melanophrys* species group. Mol Phylogenet Evol 70:454–463.
- Crawford AJ, Smith EN (2005) Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. Mol Phylogenet Evol 35:536–555.

- Dalquest W (1950) Records of mammals from the Mexican state of San Luis Potosi. *Occ Papers Mus Papers Mus La State Univ* **23**:1–15.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* **9**:772.
- Dawson WD (2005) Peromyscine biogeography, Mexican topography and Pleistocene climatology. In: Sanchez-Cordero V, Medellín RA (eds), *Contribuciones Mastozoológicas en Homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología-Instituto de Ecología, UNAM, CONABIO, México, pp 145–156.
- Daza J, Castoe T, Parkinson C (2010) Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* **33**:343–354.
- Dickey DR (1928) Five new mammals of the genus *Peromyscus* from El Salvador. *Proc Biol Soc Wash* **41**:1–6.
- Durish ND, Halcomb KE, Kilpatrick CW, Bradley RD (2004) Molecular systematics of the *Peromyscus truei* species group. *J Mammal* **85**:1160–1169.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Notes* **10**:564–567.
- Flores O, Goyenechea I (2001) A comparison of hypotheses of historical biogeography for Mexico and Central America, or in search of the lost pattern. In: Johnson J, Webb R, Flores-Villela O (eds), *Mesoamerican Herpetology: Systematic, Zoogeography, and Conservation*. The University of Texas, El Paso, Texas, pp 171–181.
- Fu Y (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**:915–925.
- Fu Y, Li W (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**:693–709.
- Goodwin GG (1932) Three new *Reithrodontomys* and two new *Peromyscus* from Guatemala. *Am Mus Novit* **506**:1–5.
- Goodwin GG (1938) Three new mammals from Costa Rica. *Am Mus Novit* **560**:1–5.
- Goodwin GG (1964) A new species and a new subspecies of *Peromyscus* from Oaxaca, Mexico. *Am Mus Novit* **2183**:1–8.
- Guarnizo CE, Cannatella DC (2013) Genetic divergence within frog species is greater in topographically more complex regions. *J Zool Syst Evol Res* **51**:333–340.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**:696–704.
- Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**:307–321.
- Gutiérrez-García TA, Vázquez-Domínguez E (2012) Biogeographically dynamic genetic structure bridging two continents in the monotypic Central American rodent, *Ototylomys phyllotis*. *Biol J Linn Soc* **107**:593–610.
- Gutiérrez-García TA, Vázquez-Domínguez E (2013) Concensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quat Res* **79**:311–324.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**:95–98.
- Harris D, Rogers DS, Sullivan J (2000) Phylogeography of *Peromyscus fulvus* (Rodentia: Muridae) based on cytochrome *b* sequence data. *Mol Ecol* **9**:2129–2135.
- Harris WP Jr (1940) A new subspecies of *Peromyscus* from Costa Rica. *Occ Pap Mus Zool Univ Mich* **423**:1–2.
- Hooper ET (1968) Classification. In: King JA (ed.), *Biology of Peromyscus* (Rodentia). *Spec Publ Am Soc Mammal*, Stillwater, Oklahoma **2**:27–74.
- Hooper ET, Musser GG (1964) The glans penis in Neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of muroid rodents. *Misc Publ Mus Zool Univ Mich* **635**:1–13.
- Huckaby DG (1980) Species limits in the *Peromyscus mexicanus* group (Mammalia: Rodentia: Muroidea). *Nat Hist Mus Los Ang* **326**:1–24.
- Huelsensbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754–755.
- Iturralde-Vinent MA (2006) El origen paleogeográfico de la biota de Guatemala. In: Cano EB (ed), *Biodiversidad de Guatemala*, Vol. **I**. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, pp 1–6.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**:111–120.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451–1452.
- Lindsay EH (1972) Small mammal fossils from the Barstow Formation, California. *U Calif Publ Geol* **93**:1–104.
- Lorenzo C, García M (2007) Sistemática y conservación de mamíferos de Chiapas. In: Sánchez-Rojas G, Rojas-Martínez A (eds), *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México, pp 47–57.
- McClellan DA, Rogers DS (1997) *Peromyscus zarhynchus*. *Mammal Spec* **562**:1–3.
- Merriam CH (1898) Descriptions of twenty new species and a new subgenus of *Peromyscus* from Mexico and Guatemala. *Proc Biol Soc Wash* **12**:115–125.
- Miller JR, Engstrom MD (2008) The relationships of major lineages within peromyscine rodents: a molecular phylogenetic hypothesis and systematic reappraisal. *J Mammal* **89**:1279–1295.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* **24**:1757–1764.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu Rev Ecol Syst* **31**:533–563.
- Musser GG (1969) Notes on *Peromyscus* (Muridae) of Mexico and Central America. *Am Mus Novit* **2357**:1–23.
- Musser GG, Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (eds), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 894–1534.
- Norris RW, Woods CA, Kilpatrick CW (2008) Morphological and molecular definition of *Calomyscus hotsoni* (Rodentia: Muroidea: Calomyscidae). *J Mammal* **89**:306–315.
- Ordóñez-Garza N, Matson JO, Strauss RE, Bradley RD, Salazar-Bravo J (2010) Patterns of phenotypic and genetic variation in three species of endemic Mesoamerican *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *J Mammal* **91**:848–859.
- Osgood WH (1904) Thirty new mice of the genus *Peromyscus* from Mexico and Guatemala. *Proc Biol Soc Wash* **17**:55–77.
- Osgood WH (1909) Revision of the mice of the American genus *Peromyscus*. *N Am Fauna* **28**:1–285.
- Patton JL, Smith MF (1992) MtDNA phylogeny of Andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* **46**:174–183.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* **56**:879–886.
- Rambaut A (2013) FigTree [Online]. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reeder SA, Carroll DS, Edwards CW, Kilpatrick CW, Bradley RD (2006) Neotomine-peromyscine rodent systematic based on combined analyses of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol Phyl Evol* **40**:251–258.
- Rogers DS, Engstrom MD (1992) Evolutionary implications of allozymic variation in tropical *Peromyscus* of the mexicanus species group. *J Mammal* **73**:55–69.
- Rogers DS, Engstrom MD (2004) Phylogenetic relationships among peromyscine rodents: allozyme evidence. In: Sánchez-Cordero V, Medellín RA (eds), *Contribuciones Mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología, Instituto de Ecología, México, pp 427–440.
- Rogers D, Funk C, Miller J, Engstrom M (2007) Molecular phylogenetic relationships among crested-tailed mice (genus *Habromys*). *J Mamm Evol* **14**:37–55.

- Sánchez-Tovar L (2014) Distribución geográfica del complejo de ratones *Peromyscus mexicanus* y cambios potenciales resultado del cambio climático. Undergraduate Thesis, FFyL, UNAM, México.
- Saussure MH (1860) Note sur quelques mamíferes du Mexique. Rev Mag Zool Ser 2 **12**:103–105.
- Sikes RS, Gannon WL (2011) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. J Mammal **92**:235–253.
- Smith MF, Patton JL (1993) The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. Biol J Linn Soc **50**:149–177.
- Smith MF, Patton JL (1999) Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. J Mamm Evol **6**:89–128.
- Smith SA, Bradley RD, Greenbaum IF (1986) Karyotypic conservatism in the *Peromyscus mexicanus* group. J Mammal **67**:584–586.
- Strecker U, Faúndez VH, Wilkens H (2004) Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. Mol Phylogenet Evol **33**:469–481.
- Suárez-Atilano M, Burbrink FT, Vázquez-Domínguez E (2014) Phylogeographic structure of *Boa constrictor imperator* with emphasis of diversification across the lowlands and mountains of Central America and Mexico. J Biogeogr, Online **41**:2371–2384. doi:10.1111/jbi.12372.
- Sullivan J, Markert JA, Kilpatrick CW (1997) Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. Syst Biol **46**:426–440.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics **123**:585–595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol **28**:2731–2739.
- Thomas O (1894) Descriptions of some new Neotropical Muridae. Ann Mag Nat Hist **6**:346–366.
- Tiemann-Boege I, Kilpatrick CW, Schmidly DJ, Bradley RD (2000) Molecular phylogenetics of the *Peromyscus boylii* species group (Rodentia: Muridae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. Mol Phylogenet Evol **16**:366–378.
- Wade NL (1999) Molecular systematic of Neotropical deer mice of the *Peromyscus mexicanus* species group. Thesis dissertation, Graduate Department of Zoology, University of Toronto, Canada.
- Woodburne MO (2010) The Great American Biotic Interchange: dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. J Mammal **17**:245–264.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol **7**:203–214.
- Zimmerman EG, Kilpatrick CW, Hart BJ (1978) The genetics of speciation in the rodent genus *Peromyscus*. Evolution **32**:565–579.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Tables S1–S4:** Genetic differentiation results.

**Table S1.** Genetic distance values, p-uncorrected (above diagonal) and K2P (above diagonal), between the *Peromyscus mexicanus* group clades (I–IV; see Fig. 2) and outgroup species from Nuclear Central America.

**Table S2.** Genetic distance values (p-uncorrected) between the *Peromyscus mexicanus* group lineages (A–O, following Table 1) and outgroup species from Nuclear Central America. Lineages are described in Table 1.

**Table S3.** Genetic distance values (K2P) between the *Peromyscus mexicanus* group lineages (A–O, following Table 1) and outgroup species from Nuclear Central America.

**Table S4.** Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for the *Peromyscus mexicanus* group from Nuclear Central America (\* $P < 0.01$ ).

**Figure S1.** Maps of the potential current distribution of *Peromyscus mexicanus*, *P. gymnotis*, *P. guatemalensis* and *P. zarhynchus*, obtained with MaxEnt and based on capture localities and museum records.

**Figure S2.** Maximum-likelihood tree based on cytochrome b sequences of the *Peromyscus mexicanus* species group from Nuclear Central America, showing four main clades (I–IV).

## **CAPÍTULO 2**

**Intricate evolutionary histories in mountain species: phylogenetic allometry and cryptic diversity within the *Peromyscus mexicanus* species group (Mammalia: Rodentia)**

**Sometido a: Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research**

**Sergio G. Pérez-Consuegra y Ella Vázquez-Domínguez**

Submitted to: *Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research*

Running head: *Peromyscus mexicanus* group genetics and morphometrics

**Intricate evolutionary histories in mountain species: phylogenetic allometry and cryptic diversity within the *Peromyscus mexicanus* species group (Mammalia: Rodentia)**

SERGIO G. PÉREZ-CONSUEGRA & ELLA VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ\*

Sergio G. Pérez-Consuegra, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, México DF, 04510, México. Present address: Museo de Historia Natural, Universidad de San Carlos de Guatemala, Calle Mariscal Cruz 1-56 z.10, Ciudad de Guatemala, Guatemala, Centroamérica. Tel. (502) 23346065, email: [sergiogperezc@gmail.com](mailto:sergiogperezc@gmail.com)

Ella Vázquez-Domínguez, Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México. Tel. +5255 56229015, email: [evazquez@ecologia.unam.mx](mailto:evazquez@ecologia.unam.mx)

\*Corresponding author:

Ella Vázquez-Domínguez

Departamento de Ecología de la Biodiversidad

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México

Ap. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

Email: [evazquez@ecologia.unam.mx](mailto:evazquez@ecologia.unam.mx)

Keywords: cryptic species, mammals, Mesoamerica, mountain habitats, peromyscines

## **Abstract**

Mountain associated species, which exhibit allopatric distributions associated with elevation, endemisms and complex evolutionary histories, pose challenging evolutionary scenarios in which to discern the diversification of species. The *Peromyscus mexicanus* mice group, distributed along mountains in southern Mexico and Central America, is morphometrically variable, a key rationale for the ongoing controversy regarding its species delimitation. Based on the previously recognized 15 mitochondrial lineages for *the group*, we conducted skull morphometric analyses to test that lineages are differentiated morphometrically and that the mitochondrial phylogeny and skull morphometry allow for the delimitation of species. Based on 19 skull measurements from 521 specimens, multivariate and discriminant analyses showed that lineages are morphometrically discernible, representing distinct phenotypes, and that overall size and mandible measurements are significant features that discriminate lineages, supporting hypotheses about differences in feeding habits between species. An overlap of multivariate morphometrics between some lineages was evidenced, supporting the distinction of cryptic lineages within the group. Our results demonstrate that *P. mexicanus* is both genetically and morphometrically variable, where most highland mountain species are differentiated from lowland species; also, a significant correlation between mitochondrial and morphometric information suggests a phylogenetic signal, altogether in agreement with a recent taxonomic proposal for the group. The group's intricate diversification responds to adaptations to a variety of mountain habitats and Pleistocene biogeographic climatic dynamics.

## **Introduction**

Mountain associated species, in particular small mammal faunas in tropical regions, consistently show high diversification rates and intricate evolutionary histories, rendering the unravelling of their taxonomic relationships markedly difficult (Ordóñez-Garza *et al.* 2010; Woodman 2011; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015; Stanley *et al.* 2015). In such instances, a successful approach to infer taxonomic relationships and delimit species has been the combined use of morphological and genetic information (Sergis *et al.* 2014; Stanley *et al.* 2015; Ali *et al.* 2016). The mountain regions of southern Mexico and Central America, which are characterized by high species diversification rates and extraordinary levels of endemism (Daza *et al.* 2010; Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez 2013), pose challenging evolutionary scenarios in which to discern the diversification of species.

The mice of the genus *Peromyscus* belong to the New World Family Cricetidae, Subfamily Neotominae, Tribe Reithrodontomyini (Musser & Carleton 2005). There is a relatively

abundant fossil record for the Neotominae-peromyscine in North America, which suggests they evolved around the Late Miocene from the extinct genus *Copemys* (Lindsay 1972); nonetheless, their general evolutionary history remains unclear. *Peromyscus* is a rather diverse genus that experienced high diversification during the Pleistocene (Dawson 2005). It includes 56 recognized species (Musser and Carleton 2005) subdivided in 13 species groups (Dawson 2005), from which most have been considered monophyletic with the exception of *P. furvus*, *P. mexicanus* and *P. truei* groups (Bradley *et al.* 2007).

In particular, the *Peromyscus mexicanus* group is morphometrically variable (Huckaby 1980), heterogeneous regarding mitochondrial DNA (Lorenzo & García 2007) and conservative in terms of karyotypes (Smith, Bradley & Greenbaum 1986). It was first named by Osgood (1909) but has since had numerous taxonomic changes (for example: Hooper & Musser, 1964; Hooper 1968; Musser 1969; Huckaby 1980; Carleton 1989; Rogers & Engstrom 1992). Attempts to resolve the phylogeny of the group include allozymic and mitochondrial information (Wade 1999; Rogers & Engstrom 2004); however, despite that the validity of some of the present known species is supported by morphometric and mitochondrial information (Ordóñez-Garza *et al.* 2010), and that the exclusion of the lowland species *P. yucatanicus* and *P. stirtoni* from the *P. mexicanus* group is supported by genetics and morphology, their limits remain uncertain. Moreover, recent mitochondrial information has shown the existence of potential cryptic species (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). Importantly, closely related groups of other mountain *Peromyscus* species like *P. megalops* from central Mexico, or *P. furvus* from central Mexico and western Guatemala, are morphologically and genetically distinguishable from the *mexicanus* group (Huckaby 1980).

Osgood (1980) described the cranial morphometric variations among the *P. mexicanus* group, including at that time other species groups like *furvus*, *megalops* and *melanophrys*. He was able to distinguish a set of mountainous species that encompass the core of the *mexicanus* group, highlighting that they showed more local variations than expected. He also observed some overlap regarding morphometric measurements of species and populations, making the definition of species limits difficult. His morphometric analyses supported a widespread *P. mexicanus* species from Central Mexico to Panama, for which some Central American taxonomic names like *P. nudipes*, *P. tropicalis*, *P. salvadorensis* and *P. nicaraguae* were considered conspecific (one species considered the same as another) with *P. mexicanus*, and thus were often considered synonyms. Later, Rogers and Engstrom (1992), Van Coeverden de Groot (1995) and Wade (1999) showed, based on molecular data (allozymes, RFLPs and mitochondrial DNA sequences), that *P. mexicanus* was not monophyletic but segregated into at

least three phylogenetically distinct groups. These authors found evidence that some of the *P. mexicanus* populations distributed along northern and central highlands in Chiapas were likely conspecific with *P. gymnotis*. Also, Wade (1999) found a well-supported basal and differentiated lineage (from El Petén, Guatemala), although traditionally identified as *P. mexicanus*.

The widespread species *P. mexicanus* is also morphometrically quite variable (Zaragoza 2005), with seven subspecific forms, six distributed in central and southern Mexico (*P. m. mexicanus*, *totontepecus*, *angelensis*, *putlaensis*, *teapensis*, *tehuantepecus*) and one widely distributed (and also variable) from Central America (*P. m. saxatilis*). Zaragoza (2005), using cranial morphometry, found two groups from southern Mexico: subspecies *mexicanus* and *totontepecus* encompassing one group in central Mexico and *teapensis* as a second group from highlands in northern Chiapas, Tabasco and Veracruz. Recently, Ordóñez-Garza *et al.* (2010) found congruence between mitochondrial and morphometric data for three of the highland species, *P. zarhynchus*, *P. guatemalensis* and *P. grandis*, from Chiapas, Mexico and Guatemala. However, they did not find concordance between the morphometric data and geographic distances. The lack of a comprehensive geographic cover and of a reasonable phylogenetic hypothesis that includes morphometric and genetic information has precluded disentangling the group's taxonomic relationships.

It was not until recently that a more comprehensive, both genetically and geographically, mitochondrial phylogenetic hypothesis of the *P. mexicanus* group emerged (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015), which was in general agreement with that of Wade (1999), but showing a higher diversification of the group than originally established. They found that *P. mexicanus* is clearly polyphyletic and recognized 15 distinctive lineages based on molecular phylogenetic information. Their results also show nine mountainous species that form a monophyletic group, with a general pattern of allopatric distributions along the mountains from southern Mexico to Panama, with only scatter sympatric or parapatric records. These exhibit significant genetic splits associated with biogeographic barriers, with a few exceptions of parapatric and altitudinally segregated lineages coexisting in one mountain. The 15 lineages were recognized based on mitochondrial and geographic information, however no nuclear markers or morphological information were included in their study. Hence, in the present study we evaluate new morphological data regarding cranial morphometric variations of the *P. mexicanus* group, in order to evaluate the mitochondrial phylogenetic hypothesis and physiographic distribution of Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). We aimed to (1) test the prediction that the molecular lineages are morphometrically discernible and (2) test if the

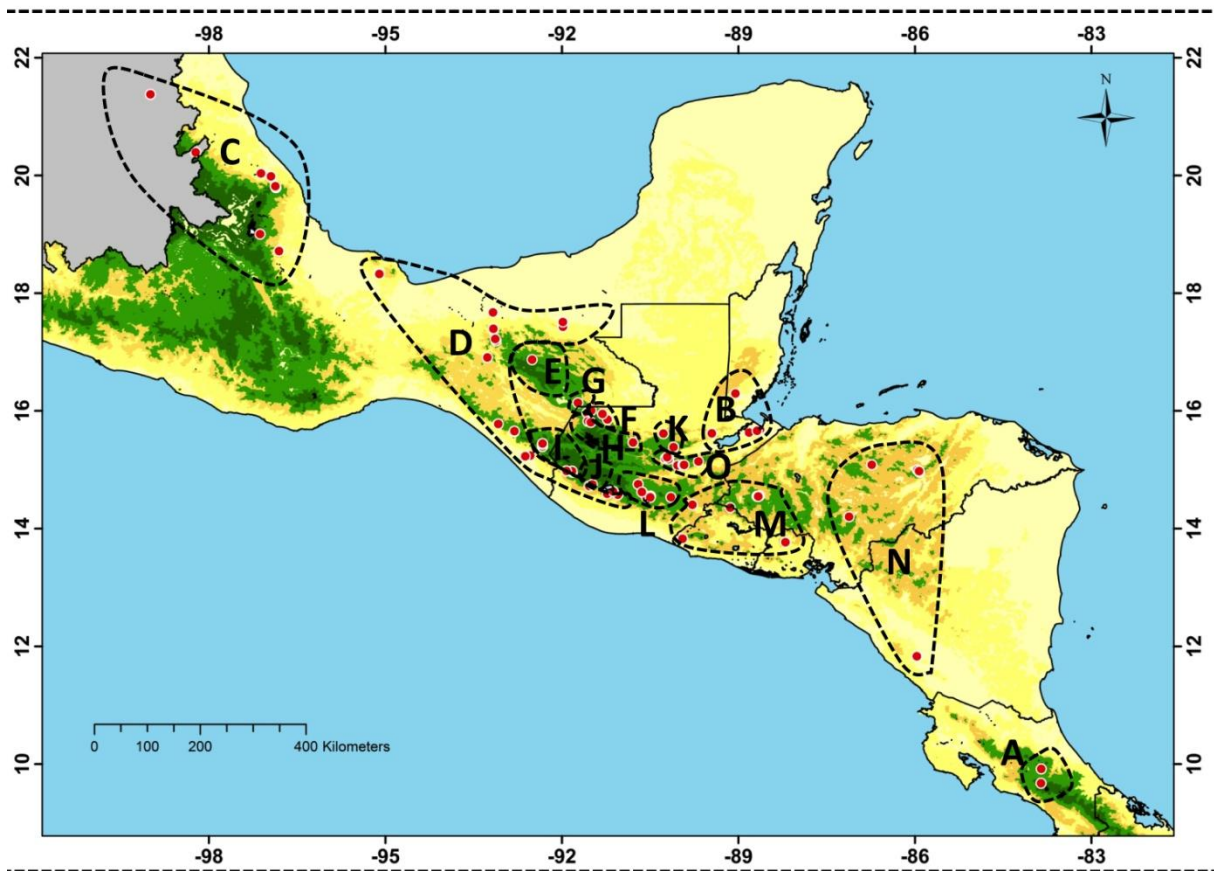


mitochondrial phylogeny and the skull morphometric data are correlated and allow for the delimitation of species.

## Material and Methods

### *Operational taxonomic units and morphometric analyses*

We examined skins and skulls of 521 specimens from five mammal collections: Carnegie Museum of Natural History and Museum of Vertebrate Zoology (EUA), Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias and El Colegio de la Frontera Sur (Mexico) and Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos (Guatemala) (see Table 1).



**Figure 1.** Map of Central America and southeast México showing the sampling localities for the specimens with morphometric and molecular data for the *Peromyscus mexicanus* species group used in the study. Red dots are sampling localities. Letters A-O and the corresponding dashed line refer to 15 lineages as described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), which correspond to the taxonomic operational units defined for this work. Here we use the same colors and lineage order to facilitate reference and comparisons.

**Table 1.** List of skins and skulls from 521 specimens used for the morphometric analysis of the *Peromyscus mexicanus* group. Letters A to O refer to 15 different lineages described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015) (see also the phylogenetic analysis section for further details). GenBank accession numbers of the 67 haplotypes of 90 different specimens and their respective haplotype code used for phylogenetic analysis are indicated in parenthesis next to the catalogue number. Acronyms of institutions are as follows: CM: Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, PA; MZFC: Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias UNAM, Mexico City; MVZ: Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, CA; ECO: El Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de las Casas, Chiapas, México; USAC: Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala City.

Lineage	Locality	Latitude	Longitude	Sample size	Catalogue numbers (GenBank accession number: haplotype code in bold)
A	COSTA RICA: 2.2 km E (by road) La Trinidad de Dota, San Jose, 2640m	9.6721	-83.8551	5♀5♂	MVZ164931, 164933, 164939, 164940, 164945;154935, 164936, 164937, 164941, 164944
A	COSTA RICA: 1 km W (by road) Santa Rosa, Cartago, 2250m	9.9167	-83.8500	5♀1♂	MVZ164915, 164916, 164917, 164919 <b>(GB#pending: 121CaCR)</b> , 164920; 164918
B	BELIZE: Columbia Forest Reserve, near Jimmy Cut, 2.4km NNW Salamanca, Toledo District	16.2944	-89.0497	2♀5♂	CM92040, 92041; 92042, 92043, 92037, 92038, 92039
B	GUATEMALA: Las Torres, Cerro San Gil, Depto. Izabal, 810m	15.6770	-88.6833	6♀7♂	CM119639, 119640, 119641, 119643, 119544, 119633; 119637, 119638, 119642, 119646, 119634, 119635, 119636
B	GUATEMALA: Las Escobas, ca.1.3 km NE Las Torres, Cerro San Gil Reserve, Depto. Izabal, 124m	15.6852	-88.6454	2♀1♂	CM117024 ( <b>KP284307: 2SGGU</b> ), 117025 ( <b>KP284308: 3SGGU</b> ); 119632
B	GUATEMALA: Estación Carboneras, Reserva Cerro San Gil, 4.5 kmN, 2.95kmE Los Angeles, 500m., Livingston, Depto. Izabal,	15.6300	-88.8167	5♀4♂	CM119627, 119629, 119630, 119622M 119623; 119628, 119631, 119624, 119626
B	GUATEMALA: Finca Seyamch, 12.15 km N, 10.75km W El Estor, Izabal, 680m	15.6167	-89.4500	2♀2♂	CM119618, 119620; 119619, 119621
C	VERACRUZ: Manuel Gutiérrez Nájera, Misantla, 878m	19.792	-96.8606	2♀	MZFC11177 ( <b>KP284422: 118MiVE</b> ), 11169
C	VERACRUZ: Pueblo Viejo, Misantla, 724m	19.81439	-96.8679	3♀1♂	MZFC11171 ( <b>KP284422: 118MiVE</b> ), 11182, 11170; 11175
C	VERACRUZ: Villa Nueva, Mpo. Misantla, 130m	20.0328	-97.1128	2♀3♂	MZFC11181, 11187; 11180, 11184, 11183
C	HIDALGO: Puente del Río Camarones, Tutotepec, Hidalgo, 1130m	20.3911	-98.2233	4♂	MZFC9815, 9816, 8995( <b>KP284424: 119TuHG</b> ), 8997( <b>KP284424: 119TuHG</b> )
C	HIDALGO: San Pedro Huazalingo, 797m	21.3750	-98.9928	1♀1♂	MZFC8542, 8528
C	VERACRUZ: Ignacio Zaragoza, Mpio. Martínez de la Torre, 129m	19.9822	-96.9436	1♀	MZFC11164
C	VERACRUZ: Ojo de Agua, ca. 500m	18.7131	-96.8067	11♀18♂	MVZ163046, 161288, 159716, 159713, 159687, 159679, 159677, 159712, 159710, 159704, 159697;163047, 161289, 161287, 159715, 159714, 159696, 159695, 159694, 159693, 159692, 159682, 159681, 159705, 159706, 59707, 159708,159709, 159711,
C	VERACRUZ: Ojo de Agua, Rio de Atoyac, ca. 14 km N, 22km E Córdoba, 2042m	19.0028	-97.1281	4♀2♂	CM56690, 56691, 79667, 79668; 56689, 79669

D	CHIAPAS: 15.5 mi SE (by road) Mapastepec, 50m	15.2269	-92.6210	1♀3♂	MVZ161260; 159578, 161262, 161261
D	CHIAPAS: Finca Santa Cruz, 18.8km NE Pijiapan, Polígono V, RB El Triunfo, Mpio. La Concordia, 1345m	15.7767	-93.0792	1♂	ECO912
D	CHIAPAS: Rancho Las Bugambilias, 5 km NE Villa Comaltitlan, Mpio. Villa Comaltitlan, 120m	15.2381	-92.5364	1♀	ECO2136
D	CHIAPAS: 6.6 Km S Palenque arqueological site, 139m	17.4522	-91.9794	1♂	CM92813
D	CHIAPAS: 9 Km S Palenque arqueological site, 501m	17.4286	-91.9803	1♂	CM92814
D	CHIAPAS: Palenque arqueological site, 74m	17.5083	-91.9817	1♀1♂	CM92815; 92818
D	CHIAPAS: Rancho San Juan, 8km NW Chapultenango, 700m	17.3934	-93.1639	2♀	ECO346, 347
D	CHIAPAS: 12 km N Berriozabal, 885m	16.9060	-93.2658	2♀2♂	CM92807, 92811; 92810, 92812
D	VERACRUZ: 8.8mi SE (by road) Catemaco, 500m	18.3333	-95.1083	1♀2♂	MVZ159666; 159661, 159663
	VERACRUZ: 9.5 mi SE (by road) Catemaco, 500m	18.3250	-95.1011	2♀2♂	MVZ159654 (GB#pending: 122CaVE), 159657; 159655, 159659
D	GUATEMALA: Comunidad Unión Victoria, 2.7 km N, 3.8 km E Pochuta, Chimaltenango, 1235m	14.57502	-91.0485	1♀1♂	USAC5039(KP284386: 81PoGU); 5040(KP284387: 82PoGU)
D	GUATEMALA: Fca. El Porvenir, ladera sur V. Tajumulco, San Pablo, San Marcos, 1500	14.9778	-91.9208	1♀1♂	USAC1770; 868
D	GUATEMALA: Mirador Rey Tepepul, Santiago Atitlán, Sololá, 1775m	14.5908	-91.2289	1♀	USAC1702
E	CHIAPAS: 3 km NW Tapalapa, Chiapas, 1960m	17.1928	-93.1228	3♂	ECO151 (KP284328: 23TaCH),152 (KP284329: 24TaCH),153 (KP284330: 25TaCH)
E	CHIAPAS: Cerro La Ventana, 2 km W Tapalapa, Mpio. Tapalapa, 2225 m	17.1898	-93.1197	4♂	ECO1444, 1446, 1447, 1450
E	CHIAPAS: Cerro Tzontehuitz, 11 km NE San Cristóbal de Las Casas, San Juan Chamula, 2890	16.8231	-92.5793	4♀3♂	ECO1839,1847, 1848, 1849; 1820(KP284347: 42TzCH), 1850, 1851
E	CHIAPAS: Río Coaché, 2.5km NW Tapalapa, 1231m	17.2218	-93.1315	1♀1♂	ECO161(KP284331: 26TaCH), 159 (KP284331: 26TaCH)
F	GUATEMALA: Aldea San José Maxbal, 15.4 km N Santa Cruz Barillas, Huehuetenango, 1449m	15.94613	-91.3071	5♀8♂	USAC 4945 (KP284339: 34MaGU), 4949 (KP284339: 34MaGU), 4951, 4968 (KP284339: 34MaGU), 4969 (KP284339: 34MaGU); 4942 (KP284338: 33MaGU), 4948, 4952, 4955, 4961, 4963, 4964,4967
F	GUATEMALA: 2.8 km S Aldea Yalambojoch, San Mateo Ixtatan, Huehuetenango, 1911m	15.9631	-91.5706	5♀6♂	USAC4761, 4768, 4785, 4787, 4790; 4762, 4763 (MVZ223286, KP284340: 35YaGU), 4764(MVZ223287, KP284341: 36YaGU), 4766, 4788, 4791
F	GUATEMALA: Finca Ixcansán, 10.3 km E Aldea Yalambojoch, 1647m	16.0061	-91.4999	5♀5♂	USAC4756, 4747 (MVZ223297, KP284344: 39IxGU), 4748 (MVZ223291, KP284344: 39IxGU), 4750 (MVZ223296,

						<b>KP284344 39IxGU</b> ), 4765 (MVZ223288, <b>KP284342: 37YaGU</b> ); 4749 (MVZ223295, <b>KP284346: 40IxGU</b> ), 4759 (MVZ223293, <b>KP284344: 39IxGU</b> ), 4769, 4771 USAC1735, 1778, 2787, 1777
F	GUATEMALA: Aldea Malpais, Santa Elena Barillas, Huehuetenango, 1100m	15.8519	-91.2242	3♀1♂		
G	CHIAPAS: Las Grutas, 3.45 km N El Vivero, Lagos de Montebello National Park, Chipas, 1513	16.135	-91.7269	3♀7♂	ECO1216 ( <b>KP284334: 29GrCH</b> ), 1219 ( <b>KP284335: 30GrCH</b> ), 1425; 1427 ( <b>KP284332: 27GrCH</b> ), 1215 ( <b>KP284333: 28GrCH</b> ), 1217( <b>KP284334: 29GrCH</b> ), 1218 ( <b>KP284334: 29GrCH</b> ), 1221, 1426, 1428	
H	GUATEMALA: LajChimel, 12.6 km N, 9.0 km E Uspatan, Quiche, 2490m	15.46208	-90.7881	3♂	USAC5108 (MVZ226989, <b>KP284351: 46LjGU</b> ), 5122(MVZ227001, <b>KP284354: 49LjGU</b> ), 5140	
H	GUATEMALA: Aldea Chibalazum, 10km NW San Mateo Ixtatán, Huehuetenango, 2766m	15.8200	-91.5547	4♀5♂	USAC1759, 1762, 1764, 2285; 1765, 1781, 2283, 2286, 2293	
H	GUATEMALA: Cerro Bobi, 2.5 km S, 2.75 km W San Mateo Ixtatan, Huehuetenango, 3079m	15.8052	-91.5062	3♀4♂	USAC4752 (MVZ223221, <b>KP284363: 58BoGU</b> ), 4760 (MVZ223219, <b>KP284362: 57BoGU</b> ), 4793; 4751, 4755, 4794, 4795	
I	CHIAPAS: Campamento El Triunfo, RB El Triunfo, Poligono I, Mpio. Ángel Albino Corzo, 1920m	15.6447	-92.8099	2♀	ECO1283, 1185 ( <b>KP284365: 60TrCH</b> )	
I	CHIAPAS: Cerro Motozot, 10.8 mi NW Motozintla de Mendoza, 2450m.	15.3936	-92.3289	1♀3♂	MVZ159524; 161256, 159529, 159530	
I	CHIAPAS: Cerro Motozot, 13.5 mi NW Motozintla de Mendoza, 2800m	15.4439	-92.3261	3♀7♂	MVZ159533, 157537, 159540; 159531, 159532, 159535, 159536, 159538, 159539, 159544	
I	GUATEMALA: Parque Regional Municipal de San Marcos, ca. 0.8 km N, 4.2 km W San Marcos, 2712	14.97361	-91.8268	7♀5♂	USAC5002 ( <b>KP284370: 65SMGU</b> ), 5003, 5004 ( <b>KP284370: 65SMGU</b> ), 5013 ( <b>KP284370: 65SMGU</b> ), 5024, 5205, 5216; 1716, 4998 ( <b>KP284368: 63SMGU</b> ), 5000, 5025, 5027	
I	GUATEMALA: Finca El Porvenir, Volcán Tajumulco, San Pablo, San Marcos, 1500m	14.9778	-91.9208	2♂	USAC1768, 1773	
J	GUATEMALA: Fuentes Georginas, 3.8 km S, 0.3 km E Zunil, Quetzaltenango, 2433m	14.74962	-91.4801	6♀6♂	USAC4643 (MVZ224824, <b>KP284382: 77GeGU</b> ), 4656 (MVZ224825, <b>KP284382: 77GeGU</b> ), 4704, 4705, 4706, 4708; 4644(MVZ224826, <b>KP284383: 78GeGU</b> ), 4645(MVZ224827, <b>KP284384: 79GeGU</b> ), 4702, 4703, 4709, 4712	
J	GUATEMALA: 0.5km O Santa María de Jesús, Zunil Quetzaltenango, 1800m	14.7236	-91.5333	1♀2♂	USAC4387; 1747, 1760	
K	GUATEMALA: Finca Bethel, San Pedro Carcha, Depto. Alta Verapaz, 1430 m	15.6126	-90.2736	2♂	USAC5150, 5153	
K	GUATEMALA: Campamento de los Helechos, Finca Chinaux, Alta Verapaz, 2116m	15.3833	-90.1000	1♀	CM120167	
L	GUATEMALA: Río Pachum, San Antonio Las Trojes, San Juan Sacatepequez, Guatemala, 1507m	14.7547	-90.7022	2♀	USAC5412 ( <b>KP284412: 107PcGU</b> ), 5413 ( <b>KP284412: 107PcGU</b> )	
L	GUATEMALA: Campamento Palo Jiote, 3.5km N, 6.4kmO San Juan Sacatepéquez, Depto. Guatemala, 1609m	14.7528	-90.704	1♂	USAC5050 ( <b>KP284413: 108PcGU</b> )	

L	GUATEMALA: Cerro Alux, San Lucas Sacatepequez, Depto. Sacatepequez, 2240m	14.6159	-90.6331	1♂	CM117023
L	GUATEMALA: Cerro Iquitiú, San Lucas Tolimán, Sololá, 1830m	14.6311	-91.1297	1♂	USAC1700
L	GUATEMALA: Cerro Miramundo, Mataquescuintla, Jalapa, 2548m	14.5306	-90.1444	1♀	USAC1698
L	GUATEMALA: El Frutal, 7.3 kmS, 2.8kmW Museo Nat. Historia Natural, Ciudad de Guatemala, 1260m	14.5300	-90.5583	1♂	CM117022 ( <b>KP284421; 116FrGU</b> )
L	GUATEMALA: Fca. Lourdes, Cerro Alux, Mixco, Guatemala, 2276	14.6200	-90.6400	1♀1♂	USAC1695
L	GUATEMALA: Finca Los Angeles, Aldea El Pueblito, Santa Catarina Pinula, Guatemala, 1700m	14.55	-90.4833	8♀6♂	CM117002, 117004, 117005 ( <b>KP284418: 113PnGU</b> ), 117008 ( <b>KP284415: 110PnGU</b> ), 117010 ( <b>KP284417: 112PnGU</b> ), 117011, 117012, 117016; 117003 ( <b>KP284417: 112PnGU</b> ), 117006 ( <b>KP284419: 114PnGU</b> ), 117007 ( <b>KP284414: 109PnGU</b> ), 117009 ( <b>KP284416: 111PnGU</b> ), 117014, 117017
L	GUATEMALA: Fca. San Agustin Las Minas, Depto. Guatemala, 1750m	14.5294	-90.4969	9♀5♂	CM118990, 118992, 118996, 118998, 18977, 18978, 18980, 18981, 18985; 118986, 118988, 118991, 18979, 18983
L	HONDURAS: Don Tomas camping station, Celaque National Park, Lempira, 2075m	14.5333	-88.65	2♀6♂	CM113090 ( <b>KP284392: 87CeHO</b> ), 120089; 113088, 113089, 113091 ( <b>KP284393: 88CeHO</b> ), 113092, 113094 ( <b>KP284392: 87CeHO</b> ), 113095 ( <b>KP284390: 85CeHO</b> )
M	HONDURAS: Naranjo camping station, Celaque National Park, Lempira, 2560m	14.5333	-88.6666	6♀9♂	CM113072, 113073, 113076, 113082, 113086 ( <b>KP284391: 86CeHO</b> ), 120032; 113077 ( <b>KP284391: 86CeHO</b> ), 113079, 113080, 113081, 113083, 113084, 113085, 113087, 120033.
M	HONDURAS: Visitors Center, Celaque National Park, Lempira, 1430m	14.55	-88.63	10♀23♂	CM113097, 113100, 113106, 113108, 11311 118689, 118694, 118702, 118706, 11871 113096 ( <b>KP284391: 86CeHO</b> ), 11309 113103 ( <b>KP284391: 86CeHO</b> ), 11310 113107, 113109, 113693, 118107, 1186 118686, 118690, 118692, 118695, 1186 118703, 118704, 118705, 118708, 1187 118710, 118712, 118713, 118714
M	HONDURAS: El Mojon (summit), Celaque National Park, Lempira, 2850m	14.5339	-88.6801	1♀	CM113071 ( <b>KP284394: 89CeHO</b> )
M	EL SALVADOR: El Imposible National Park, Sonsonate, 806m	13.8368	-89.9379	1♂	USAC5059 ( <b>KP284396: 91ImES</b> )
M	EL SALVADOR: Cerro Cacahuatique Natural Protected Area, Morazán, 1500m	13.75	-88.2167	1♀1♂	USAC5062 ( <b>KP284398: 93ImES</b> ); 5069 ( <b>KP284400: 95MoES</b> )
M	EL SALVADOR: Los Esemiles, Chalatenango, 1950m	14.3553	-89.1366	3♀2♂	MVZ131272, 131670, 131674, 131671, 131673
M	GUATEMALA: Volcan Suchitan, 4.8 km S, 4 km W Sta. Catarina Mita, Jutiapa, 1891m	14.4041	-89.7812	3♀5♂	USAC1731, 5373, 5385 (MVZ228289, <b>KP284407: 102SuGU</b> ); 1728, 1749, 1751, 5382, 5391 ( <b>KP284407: 102SuGU</b> )
N	HONDURAS: Sendero Esperanza, La Tigra National Park, Distrito Central, 1900-2000m	14.2	-87.1167	3♀5♂	CM118681 ( <b>KP284312: 7TgHO</b> ), 118682 ( <b>KP284310: 5TgHO</b> ), 120090; 118680 ( <b>KP284309: 4TgHO</b> ), 118683 ( <b>KP284311: 6TgHO</b> ), 118684, 120005, 120006

N	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 1750m	14.97472	-85.9175	9♀6♂	CM113133 (KP284925: 20AgHO), 113135, 113141, 113142 (KP284321: 16AgHO), 113148, 113149, 113155, 113160, 113161 (KP284323: 18AgHO), 113162 (KP284324: 19AgHO), 113137, 113144, 113145, 113150, 113157, 113159
N	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 2030m	14.95722	-85.9180	3♀3♂	CM113166, 113173 (KP284326: 21AgHO), 113174; 113165, 113170, 113172 (KP284322: 17AgHO)
N	HONDURAS: La Picucha trail, Babilonia Mountain, Agalta National Park, Olancho, 1380m	14.99361	-85.9569	2♀5♂	CM113116, 113118; 113113, 113117, 113119, 113122, 113123.
N	HONDURAS: Visitors Center, Parque Nacional La Muralla, Depto. Olancho	15.0837	-86.7356	1♀	CM118738
N	HONDURAS: El Pizote trail, La Muralla National Park, Depto. Olancho, 1480	15.0831	-86.7313	6♀4♂	CM118715, 118719, 118740, 11874 118742, 118722 (KP284316: 11MuH) 118723 (KP284317: 12MuHO), 11872 118726 (KP284316: 11MuHO), 1187 (KP284320: 15MuHO),
N	HONDURAS: Senderos Los Cuatro Pavos and Pizote, La Muralla National Park, Depto. Olancho, 1480m	15.0833	-86.7333	2♀3♂	CM118732 (KP284314: 9MuHO), 118736 (KP284316: 11MuHO), 113112, 118730, 118733 (KP284315: 10MuHO)
N	NICARAGUA: Biological Station, Volcán Mombacho Natural Reserve, Granada, 1140m	11.8308	-85.9664	3♀3♂	CM120262, 120265, 120266; 120261, 120263, 120264
O	GUATEMALA: Pinalón, RB Sierra de las Minas, Sn. Agustín Acasaguastlan, El Progreso, 2871m	15.0817	-89.9219	5♀4♂	USAC1479, 1485, 1486, 1488, 2812; 1475, 1476, 1477, 1478
O	GUATEMALA: RB Sierra de las Minas, 10km NO San Lorenzo Mármol, Panzós, Alta Verapaz, 2200m	15.1406	-89.6767	4♀15♂	CM113430, USAC1481, 1482, 1484; 1473, 1480, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1916, 1917, 1918, 2811, 2814, 2815, 2816, 2817
O	GUATEMALA: Fca. La Unión, km 157 carr. Cobán, 300mts Posada del Quetzal, Salamá, Baja Verapaz, 1669m	15.2113	-90.2094	3♀2♂	USAC1720, 1722, 1725; 1724
O	GUATEMALA: Cerro Quisis, Biotopo del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz, 2100m	15.1913	-90.2386	4♀11♂	USAC1705, 1717, 1793, 1802; 1448, 1704, 1708, 1736, 1741, 1742, 1743, 1789, 1801, 2746, 2748
O	GUATEMALA: Cerro Verde, La Unión Barrios, Salamá, Baja Verapaz, 2100m	15.1778	-90.1853	2♀8♂	USAC1709, 1737; 1442, 1706, 1707, 1710, 1738, 1740, 1744, 1806
O	GUATEMALA: Finca Luisiana, Chilascó, Baja Verapaz, 2100m	15.0731	-90.0322	3♀8♂	USAC1790, 1795, 1805; 1657, 1711, 1791, 1796, 1800, 1803, 1804, 1809
O	GUATEMALA: Baja Verapaz: Biotopo del Quetzal, Purulhá, Baja Verapaz, 2150m	15.1913	-90.2386	1♀	USAC1739
O	GUATEMALA: La Cabaña, 3 km O Cerro Pinalon, Las Minas Biosphere Reserve, El Progreso, 2560m	15.0806	-89.9425	7♀13♂	CM113376, 113377, 113378, 113381, 113382, 113390, CM112285, 113379, 113380, 113383, 113384, 113386, 113387, 113388, 113389, USAC1483, 2813, 1487, 4431 (MVZ223384, KP284374: 69PiGU), 4434 (KP284376: 71PiGU)

We defined operational taxonomic units (OTU's) for our morphometric analyses, based on the 15 mitochondrial lineages described for the phylogenetic relationships for the *P. mexicanus* group in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). Only 89 out of 521 specimens included both morphometric and mitochondrial DNA information, hence the data for the 432 additional skins and skulls examined were assigned to one of the 15 lineages based on their mountain distributions (see Table 1, Fig. 1).

We estimated age based on molars wear and eruption, where young adults were identified by the complete eruption of the third upper molar and only slight wear on occlusal sides of all crowns; two adult classes were defined by moderate or complete degrees of molar wear. To avoid effects of ontogenetic allometry, only adult specimens (222 females and 299 males) were included in the analyses, covering most of the distribution of the group along southeast Mexico and Central America (Fig. 1), except localities from Oaxaca.

External measurements were recorded from specimen tags and collectors field notes as general information, because they were not used in the multivariate analysis considering the potential uncertainty of such measurements (Santos, 1994): total length (TL), length of tail (LT), length of hind foot (HF), length of ear (E) and weight (Wt). Cranial measurements were taken solely by one person, to the nearest 0.01mm, using a digital calliper (Mitutoyo Absolute Coolant Proof IP 67). Twenty one selected measurements were taken: greatest length of skull (GLSK), rostral length (RL), nasal length (NL), frontal breadth (FB), frontal length (FL), interorbital constriction (IOC), zygomatic breadth (ZB), cranial breadth (CB), cranial height (CH), condylobasal length (CBL), incisive foramen length (IFL), mesopterygoid fossa width (MFW), palatal bridge length (PBL), molar toothrow length (MTRL), distance from third upper molars (M3M3), first molar width (M1), bullar length (BUL), mandible length (ML), mandible height (MH), diastema length (DL) and mandibular molars length (MM). Descriptive statistics of variables (mean and standard deviation) of each OTU were calculated (Supporting Information Table S1). All statistical procedures were conducted in the platform of the R project (R Core Team 2013), using different packages as stats, vegan, mvtnorm, mvShapiroTest, car, Hmisc and ecodist.

All cranial measurements were log-transformed in order to reduce the effect of scale differences among measurements. There were forty-nine individual measurements lacking (for example because of damaged bones), this is 0.004% out of 11,025 total measurements, which were substituted by the mean value of the particular OTU they belonged to, allowing the inclusion of more individuals into the analysis. We explored the independence of variables by correlation analyses between the measurements variances; high correlated and significant variables ( $P < 0.05$ ) were discarded. The multivariate distributional pattern of the data was

analyzed with the Shapiro test. A parametric two factor (lineage and sex) multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed for the entire data set for the 15 OTU's; sex was considered as a factor based on the morphometric differences between sexes reported in the literature for some species. We used the general multivariate statistic Wilk's lambda, with an alpha of 0.05, to test the hypothesis of no median differences between lineages. Post-hoc comparisons were conducted by a series of multivariate Hotelling's  $T^2$  tests, with a Bonferroni correction (Rice 1989). Additionally, we conducted a series of univariate comparisons (ANOVA) between lineages for each of the variables analyzed. Finally, linear discriminant analysis (LDA) was performed to distinguish among lineages and to help identify the most discriminatory variables, using the log-transformed cranial measurements for the entire data set (15 lineages).

#### *Phylogeny and mitochondrial lineages delimitation*

To compare with the phylogenetic hypothesis described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), we conducted a similar phylogenetic analysis that included only the specimens having both molecular and morphometric data and encompassing representatives of all 15 lineages (67 unique haplotypes). We added two new sequences from Cartago, Costa Rica (haplotype 121CaCR; see Table 1) and Catemaco, Veracruz (122CaVE); these were amplified following protocols as described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015).

To improve the genetic analysis coverage, we also added two sequences from GenBank from localities for which we had skull measurements but no sequences: KP284425 (haplotype 120SJCR; 1) from San José, Costa Rica, and KP284306 (1CaGU) from Carcha, Guatemala; and three sequences from Wade (1999): from Poptún, Guatemala (*P. tropicalis*; haplotype PetGU), Palenque, México (*P. cf. gymnotis*; PalCH) and Berriozabal, Mexico (*P. cf. gymnotis*; BerrCH). As in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), we included six sequences as taxonomic references for some of the species: *P. mexicanus* (Veracruz; EF028174), *P. nudipes* (Costa Rica; EF989992), *P. gymnotis* (Chiapas; EF028169), *P. zarhynchus* (Chiapas; EF028167), *P. guatemalensis* (Guatemala; GQ461925) and *P. grandis* (Guatemala; GQ461925). With the aim of having species more closely related to *P. mexicanus* as outgroup, we selected six sequences from GenBank representing: *Reithrodontomys sumichrasti* (AF108709), *Peromyscus megalops* (DQ000475), *P. stirtoni* (DQ973108), *P. fuvus* (GQ175974), *P. mayensis* (DQ836300) and *Habromys lophurus* (DQ861398). As a result, we had a total dataset of 86 sequences, 80 unique haplotypes for the ingroup plus six outgroup species. To avoid having missing data, all sequences were aligned and trimmed to a fragment of 545 bp, from nucleotide 127 to 671 of the *cyt b* gene.



We selected the best model of sequence evolution for our data with the program jModelTest 2.1.3 (Guindon & Gascuel 2003; Darriba et al. 2012) and the Akaike Information Criterion (AIC). Phylogenetic analyses were performed with the Bayesian Inference (BI) method with MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). For the BI analysis we used the GTR-I-G nucleotide model of substitution and default settings, allowing the program to estimate specific parameters, with four chains sampled every 1000 generations for 10 million generations, and burning = 3000. We visualised convergence and stationarity within chains with TRACER 1.4 (Rambaut & Drummond 2007); 25% of generations were discarded as burn-in. Topologies were visualized and edited in FigTree v.1.4.0 (Rambaut 2013).

#### *Phylogeny and morphometric comparisons*

To test the hypothesis of correlation between mitochondrial DNA and morphometric information, we estimated a matrix of mean Mahalanobis distances between 14 lineages—one lineage was excluded due to small sample size (lineage K; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015)—, including 518 individuals, and a median genetic distance matrix based on the Kimura 2-parameter (K2P) estimated with MEGA v.6 (Tamura et al. 2013). Next, we conducted a Mantel test with R between morphometric (Mahalanobis) and genetic (K2P) distances.

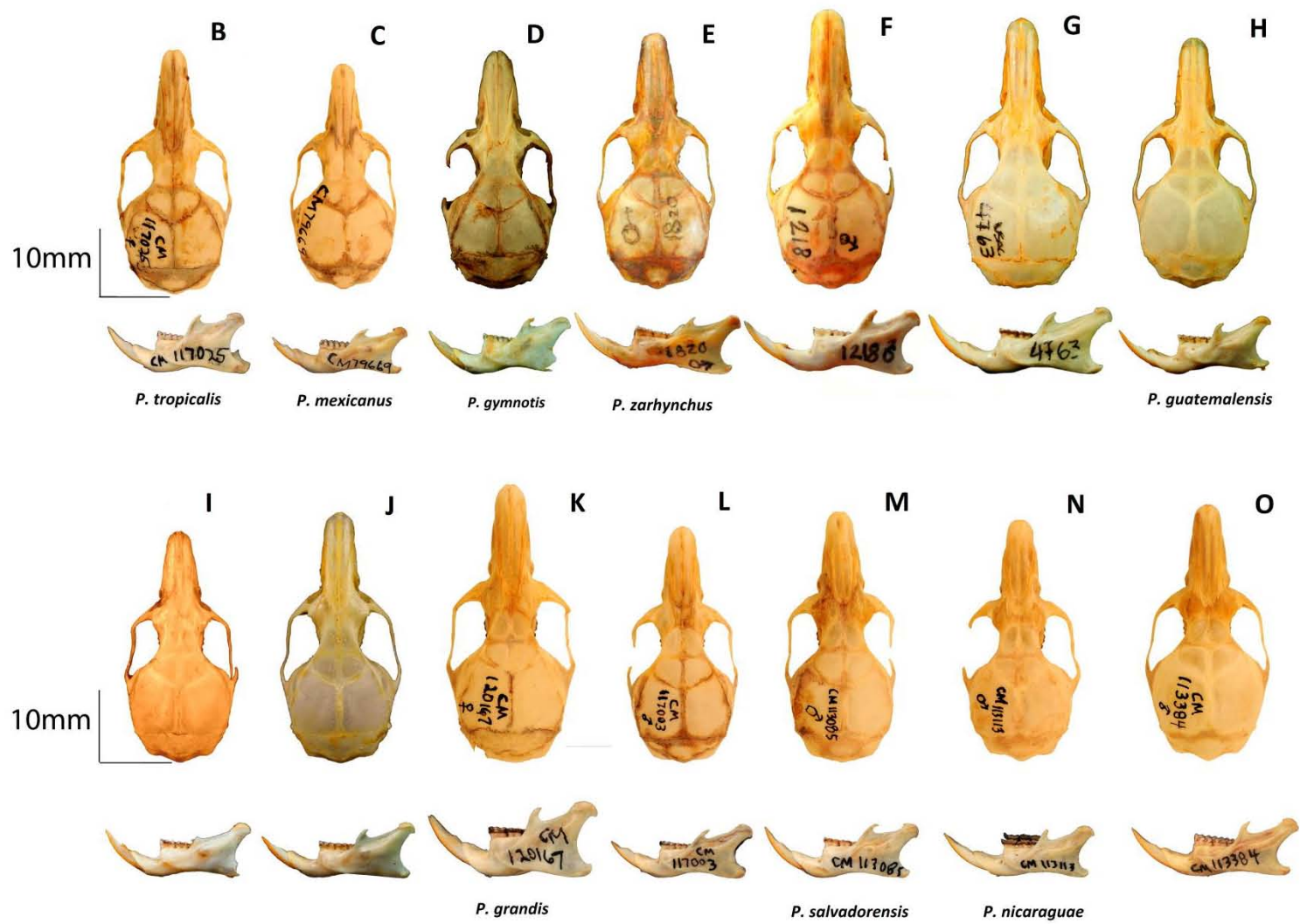


Figure 2. General view of the skull variations in specimens of the *Peromyscus mexicanus* species group, from mitochondrial lineage B to O

## Results

### *Morphometric analyses*

Descriptive statistics of the 21 variables for the 15 OTU's (lineages), including 521 adult specimens, 222 females and 299 males, are described in Supporting Information Table S1; also, an example of the variation of the skull's morphology is shown in figure 2.

A high and significant ( $p < 0.001$ ) correlation was found between five pairs of the cranial measurements: GLSK-RL ( $r = 0.97$ ), GLSK-CBL ( $r = 0.99$ ), GLSK-IFL ( $r = 0.89$ ), ZB-CBL ( $r = 0.88$ ) and RL-CBL ( $r = 0.97$ ); accordingly, RL and CBL were removed, leaving 19 variables for multivariate analyses. The Shapiro test was not significant (median  $p = 0.404$  for 10 repeated tests), allowing the use of parametric multivariate hypothesis testing.

The two factorial multivariate analysis of variance (MANOVA) test for the 19 cranial measurements was significant for lineages, sexes and their interaction ( $\lambda = 0.457$ ,  $p < 0.01$ ; Table 2). Overall, lineages were significantly different for all measurements (Table 3). Males and females were significantly different for the entire data set ( $\lambda = 0.913$ ,  $p < 0.01$ ) for three characters: nasal length (NL), distance from third upper molars (M3M3) and first molar width (M1). The null hypothesis of equal means of multivariate vector values was rejected for both lineages ( $\lambda = 0.0028$ ,  $p < 0.001$ ) and all 19 separate univariate ANOVA's (Table 2). The post-hoc comparisons with pairwise multivariate Hotelling's  $T^2$  tests showed significant values ( $p \leq 0.001-0.02$ ) for most of the 105 lineages pairwise comparisons, with the exception of six comparisons, one non-significant and five with too low sample size to perform (Table S2).

The linear discriminant analysis results showed that most lineages can be correctly separated by the two principal discriminant functions, although with some overlap between them (Fig. 3). Discriminant coefficients of the first and second linear discriminant functions (LD1 and LD2, Table 4), for the 19 morphometric variables used in the multivariate analysis showed that the three main variables in function 1 are: greatest length of skull (GLSK), zygomatic breadth (ZB) and cranial breadth (CB). The three main discriminant variables for LD2 are: cranial breadth (CB), cranial height (CH) and mandibular height (MH).

**Table 2.** Results of the two factorial multivariate analysis of variance (lineage and sex) for the *Peromyscus mexicanus* group.

	df	Wilk's $\lambda$	F	P
Lineage	14	0.00278	13.8204	< 2.2e-16
Sex	1	0.91379	2.3487	0.0011
Lineage-sex	14	0.45796	1.4479	4.578e-6
Residuals	491			

**Table 3.** Univariate ANOVA results for 19 skull measurement variables for the *Peromyscus mexicanus* group. The F value (highest values in bold) for the factor lineage and its significance (*p* value) are indicated. *p* values considering the factor sex alone and the combined lineage-sex are also shown. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001. For abbreviations of measurement variables see Table 1.

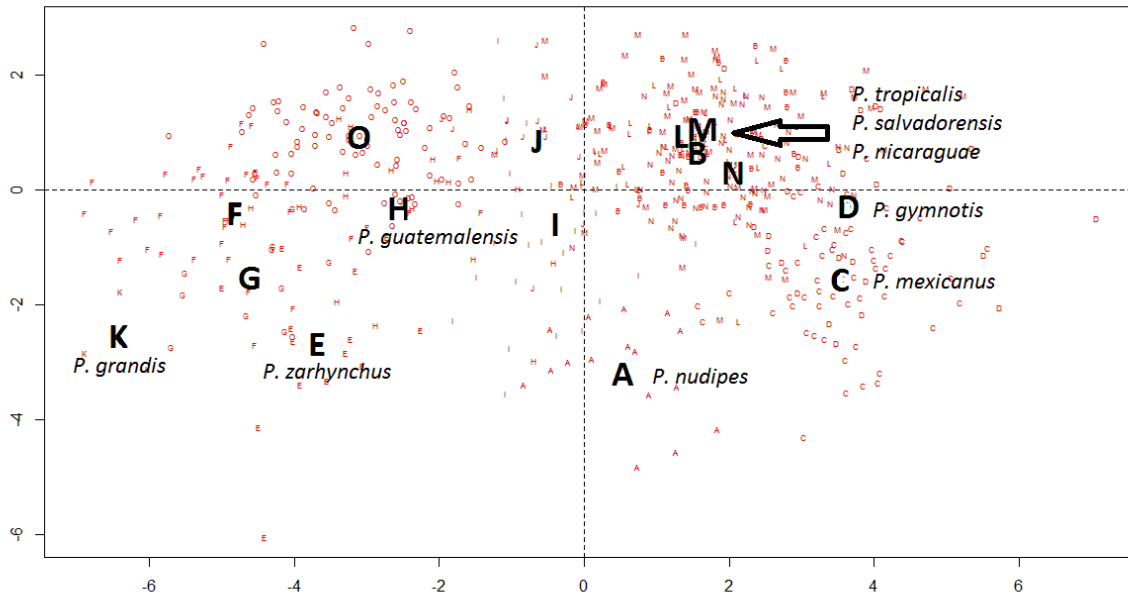
Response	F value for	<i>p</i> value for	<i>p</i> value for	<i>p</i> value for
GLSK	<b>143.3699</b>	<2e-16***	0.3177	0.1740
NL	29.1848	<2e-16***	0.0325*	0.1740
FB	19.5537	<2e-16***	0.5309	0.7768
FL	25.7896	<2e-16***	0.3542	0.5065
IOC	46.5774	<2e-16***	0.0113	0.9161
ZB	77.5787	<2e-16***	0.0217	0.3196
CB	<b>110.2021</b>	<2e-16***	0.1051	0.4061
CH	73.8927	<2e-16***	0.6724	0.6957
IFL	<b>94.4329</b>	<2e-16***	0.1570	0.2576
MFW	29.1148	<2e-16***	0.1147	0.0906
PBL	36.3279	<2e-16***	0.7912	0.6742
MTRL	<b>95.7480</b>	<2e-16***	0.9363	0.5712
M3M3	74.8938	<2e-16***	0.0090**	0.5444
M1	<b>94.0062</b>	<2e-16***	0.0344*	0.1853
BUL	20.8928	<2e-16***	0.5647	0.9122
ML	42.4125	<2.2e-16***	0.4241	6.558e-14***
MH	77.2756	<2e-16***	0.3784	0.9299
DL	43.2130	<2e-16***	0.0719	0.3984
MML	<b>96.6895</b>	<2.2e-16***	0.1633	0.0057**

**Table 4.** Discriminant coefficients of the first and second linear discriminant functions (LD1 and LD2), for the 19 morphometric variables from 521 specimens of the *Peromyscus mexicanus* group. In each function, the three values farther from zero are highlighted in bold. For abbreviations of measurement variables see Table 1.

	LD1	LD2
GLSK	<b>-7.72017945</b>	-7.6394283
NL	0.64968835	1.9039769
FB	-0.07034136	2.5122018
FL	-0.78528675	1.5869507
IOC	0.66624453	3.4662348
ZB	<b>5.99038222</b>	-8.0446267
CB	<b>-9.20172117</b>	<b>15.7553115</b>
CH	-3.28248091	<b>-13.635234</b>
IFL	-4.69531647	1.2722024
MFW	0.03695138	-3.1522359
PBL	-1.23914795	2.4253869
MTRL	-2.94833772	-1.5747729
M3M3	-3.50912697	-2.0569236
M1	-4.12079551	1.847845
BUL	1.05692623	0.6949294
ML	0.14751823	0.8095837
MH	-1.1146892	<b>8.8423161</b>
DL	0.36604736	-1.0893454
MML	-3.585305	-4.1627144

The scatter plot showed an area of overlap (upper right side of the scatter plot, Fig. 3) between the lineages assigned in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015) as *P. tropicalis* (lineage B), *P. salvadorensis* (L-M) and *P. nicaraguae* (O). These lineages are not

entirely differentiated morphometrically, despite being genetically distinct. Contrastingly, some high elevation (mountainous) lineages like *P. guatemalensis* (H), *P. zarhynchus* (E), *P. grandis* (K) and *P. nudipes* (A) are well segregated (Fig. 3).



**Figure 3.** Scatterplot of linear discriminant analysis (521 observations, in red small letters) for the first two linear discriminant functions. Median vectors for each of the 15 lineages are shown in black capital letters (A to O as described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez, 2015), along with their taxonomic associations, if any. The arrow indicates an area of overlap of morphometric variation for four cryptic (B, M, L, O) lineages (see Fig.4).

### *Phylogeny and genetic distances*

The best nucleotide model of evolution selected by the Akaike Information Criterion was the TPM1UF+I+G. Bayesian inference results showed a strongly differentiated topology with high posterior probability support (PP = 1-0.8), similar to the one described in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), supporting a genetic structure with four main clades and 15 different genetic lineages (Fig. 4). To make it easier to follow, we used here the same clade and lineage coding for the Bayesian tree as that in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015) (Fig. 4): lineage A (Clade I) corresponds to *P. nudipes* from the highlands of Costa Rica and Panama and lineage B (Clade II) to *P. tropicalis*, at the low elevation mountains of the Caribbean slope of Guatemala (and adjacent mountains of Belize and Honduras), whereas lineages C (*P. mexicanus*) and D (*P. gymnotis*) are grouped in Clade III, distributed at low elevation humid mountains in central and southeast Mexico, and a few located in southern

Guatemala. Clade IV is the most widely distributed (mountains from Chiapas to Nicaragua; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez, 2015) and includes 11 different lineages that can be divided in five subgroups, one for *P. zarhynchus sensu lato* (lineages E, F and G), *P. guatemalensis sensu lato* (lineages H, I, J, K), *P. salvadorensis sensu lato* (L, M), *P. nicaraguae sensu lato* (lineage N), and a lineage for Sierra de las Minas (O, no taxonomic name available).

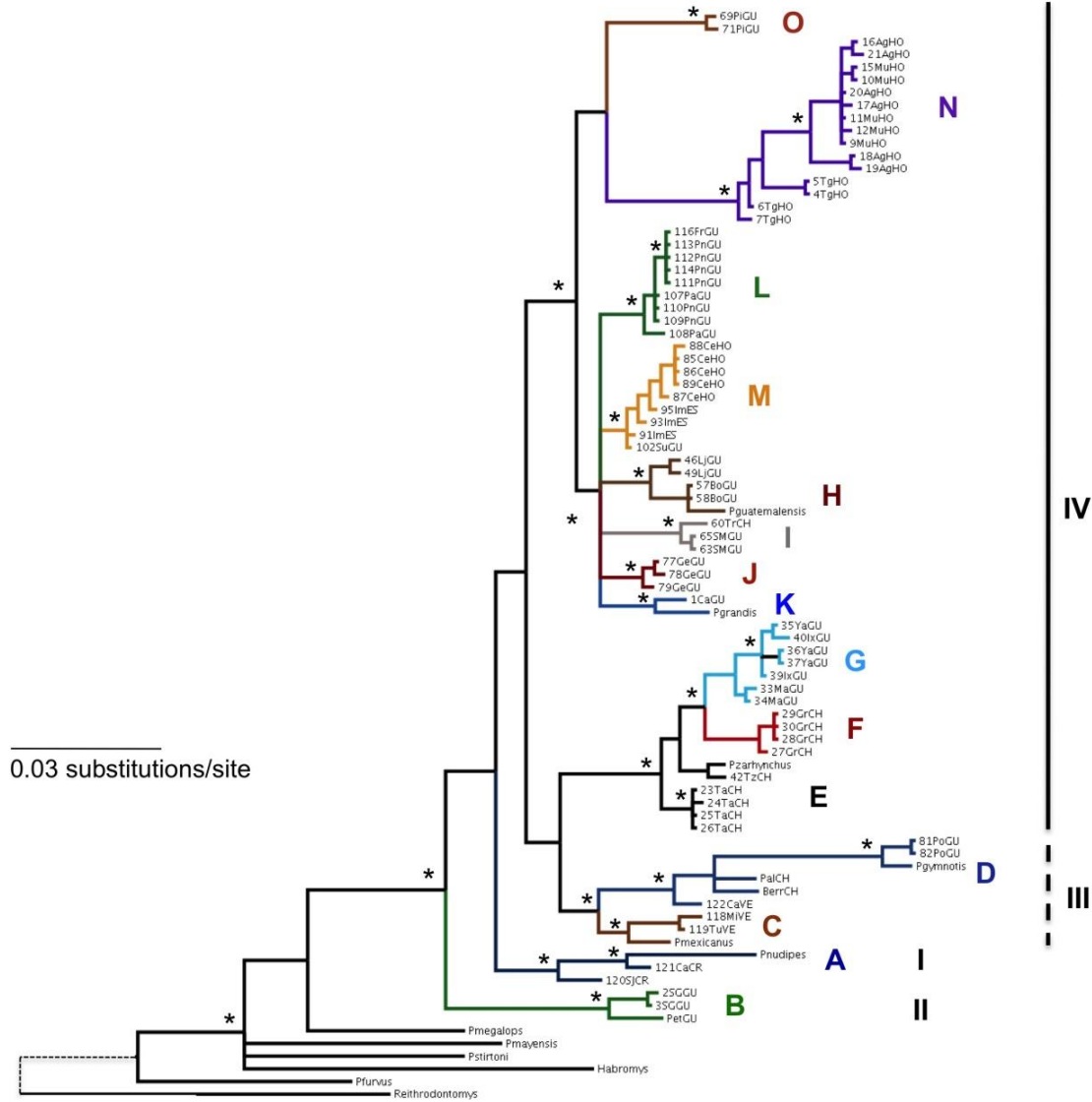
Kimura 2-parameter genetic distance results for all lineages showed the highest value between lineages B and E (K2P = 0.118), while the smallest was between lineages L and M and lineages I and J, K2P = 0.033 and 0.034 respectively (Table 5). The remaining genetic distance values were intermediate and within the range of species genetic differentiation for the genus *Peromyscus* (Bradley & Baker, 2001).

### Phylogeny and morphometric comparisons

The correlation between mitochondrial DNA and morphometric information was significant for the morphometric (Mahalanobis)-genetic (K2P) distance comparison (R= 0.4218, P = 0.001).

**Table 5.** Kimura 2-parameter genetic distances (below diagonal) and mean Mahalanobis morphometric distances (above diagonal) for the *Peromyscus mexicanus* group. The smallest values are shaded and pairs with both genetic and morphometric small values are in bold.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A	47.77	37.78	31.88	57.46	43.46	145.55	56.61	29.33	51.92	---	39.78	26.03	45.69	22.24
B	0.1	25.11	10.50	89.09	41.06	142.51	52.95	19.96	20.77	---	15.59	12.68	43.68	10.78
C	0.088	0.115	<b>4.61</b>	135.40	10.90	164.01	85.71	39.30	67.53	---	19.35	13.52	72.00	16.36
D	0.093	0.112	0.081	68.16	46.07	86.74	39.43	23.07	20.95	---	<b>7.86</b>	<b>7.14</b>	45.93	<b>5.23</b>
E	0.091	0.118	0.11	0.107	13.91	29.79	15.10	27.66	52.47	---	56.45	36.48	22.76	66.25
F	0.092	0.12	0.103	0.103	0.05	<b>8.91</b>	11.73	22.67	15.73	---	33.80	37.37	13.65	46.02
G	0.099	0.119	0.112	0.108	0.049	0.049	39.76	80.58	74.16	---	58.88	47.27	27.84	97.38
H	0.083	0.115	0.103	0.097	0.09	0.094	0.104	12.36	24.85	---	36.79	18.75	<b>7.27</b>	43.22
I	0.088	0.102	0.111	0.099	0.091	0.105	0.108	<b>0.035</b>	<b>6.79</b>	---	14.17	9.11	17.00	12.82
J	0.085	0.103	0.104	0.093	0.089	0.086	0.096	0.039	<b>0.034</b>	---	11.89	9.47	13.23	18.41
K	0.092	0.106	0.102	0.101	0.098	0.097	0.1	0.047	0.048	<b>0.04</b>	---	---	---	---
L	0.077	0.108	0.106	0.096	0.089	0.091	0.09	0.048	0.047	0.048	0.052	<b>4.75</b>	30.50	<b>5.86</b>
M	0.082	0.108	0.111	0.102	0.089	0.1	0.101	0.044	0.042	0.044	0.055	<b>0.033</b>	24.52	<b>4.61</b>
N	0.088	0.11	0.108	0.106	0.095	0.092	0.093	0.058	0.058	0.056	0.07	0.062	0.06	40.13
O	0.099	0.11	<b>0.11</b>	0.114	0.096	0.099	0.098	0.075	0.074	0.066	0.082	0.073	0.07	0.07



**Figure 4.** Bayesian inference tree based on cytochrome *b* sequences of the *Peromyscus mexicanus* species group, based on 90 samples used in the morphometric analysis. The 15 lineages recovered are shown with colored lines and letters: A-O. \* above branches indicate Bayesian posterior probabilities (> 0.9). Outgroup species used in the phylogenetic analyses were: *Reithrontomys sumichrasti*, *Peromyscus megalops*, *P. stirtoni*, *P. furvus*, *P. mayensis* and *Habromys lophurus*; the phylogenetic tree was rooted with *R. sumichrasti*, the placement of which is indicated by the dashed line and branch length is not to scale

## Discussion

*Peromyscus* (deer mice), specially the species inhabiting the mountains of Mesoamerica, are recognized among the most diversified rodent genera (León-Paniagua *et al.* 2007). Consequently, defining the taxonomic relationships among many *Peromyscus* species groups has proven rather difficult, despite different morphological and genetic assessments (Musser & Carleton 2005; Bradley *et al.* 2007). The *Peromyscus mexicanus* group is no exception, which shows high diversification levels and a particular allopatric pattern of diversification associated with elevation (Ordóñez-Garza *et al.* 2010; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015).

Lineage separation and divergence often result in reciprocally monophyletic populations in terms of haplotype variation, ecological differentiation or morphological distinctiveness, among others. Accordingly, evaluating multiple information (e.g., genetic, morphological, ecological) allows to identify lineage separation more accurately and, when in agreement, provide evidence to support recent lineage diversification (de Queiroz 2007; Leache *et al.* 2009). Based on the most comprehensive geographic, taxonomic and morphometric sampling of the *Peromyscus mexicanus* group, in the present study we were able to support the phylogenetic hypothesis and physiographic distribution of the group shown by Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). Specifically, the morphological results show that the molecular lineages are morphometrically discernible, representing distinct phenotypes, which suggests the existence of general patterns associated not only with the group's biogeography and population evolutionary history (Ordóñez-Garza *et al.* 2010; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015), but likely with ecological factors (e.g. vegetation type, elevation, food habits) as well. The Bayesian phylogeny obtained showed a rather similar topology to the mitochondrial tree presented in Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), supporting the OTU's used for the morphometric analysis. In accordance, the results of both the univariate and the two factorial multivariate analyses of variance were significant for lineages regarding the cranial morphometric measurements analysed (Tables 2, 3).

The *P. mexicanus* group has mostly an allopatric pattern of distribution, similar to other mountain or cloud forest organisms in Mesoamerica (e.g. Ornelas *et al.* 2013 and references therein). Speciation in organisms with allopatric patterns of distribution generally produces a series of cryptic and morphologically conservative species, posing a taxonomic challenge for biologists (Lande 1980; Bickford *et al.* 2007; Baker & Bradley 2006). Allopatric speciation, as originally developed by Mayr (1963), explains the observed tendency of phenotypic changes in small isolated populations; it can result from geographic isolation, in which reproductive isolation, mutation, genetic drift and natural selection can ultimately lead to local adaptation (Coyne & Orr



2004). It has also been observed that extensive sequence divergence can occur without appreciable morphological differentiation (Mayr 1963; Wilcox *et al.* 1997; Baker & Bradley 2006). Our results are in agreement with allopatric forms of adaptation and likely speciation processes.

The mountains of Mexico and Central America contain a mosaic of different habitats that represent a source of diversification for many animals and plants. The biogeographic barriers that characterize Nuclear Central America (e.g. volcanoes, mountain ridges, extended valleys) are recognized as key factors that have promoted high levels of diversification and endemism for different taxa (Carleton 1989; Strecker *et al.* 2004; Crawford & Smith 2005; Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez 2012; Suárez-Atilano *et al.* 2014). Adaptation to different habitats with particular biotic and abiotic conditions may play a key role in the *P. mexicanus* lineages' differentiation. Lorenzo *et al.* (2006) suggested that variations in the diastema length and the palatine bridge length are potential indicators of differences in feeding habits for *P. zarhynchus*. Our discriminant analysis supports this hypothesis since zygomatic breadth and mandibular height are two of the most significant measurements differentiating genetic lineages, variables potentially associated with variations in food habits. Decades ago, Gould (1966) suggested that size increase alone may widen the size range of available food for organisms; accordingly, our analysis also identified global size morphometric variables as significant: the greatest length of skull, condylobasal length and cranial height as the main measurements for discriminating among lineages.

Interestingly, our results also show that highland mountain species are more clearly differentiated from the lowland species, and also that significant differences distinguish some species of highlanders, in agreement with Ordóñez-Garza *et al.* (2010). The medium and high elevation lineages in our analysis are grouped in the left side of the multivariate space (lineages E, F, G, H, I, J, K, O and partially A; see Fig. 3), suggesting a pattern of increasing size with elevation. Most of these lineages occupy highlands of Chiapas and Guatemala; nonetheless, the relation between size and elevation is not perfect, since lineage H (*P. guatemalensis* at the Cuchumatanes in Guatemala) occupies the highest elevations but is not the biggest of all, while lineage A (*P. nudipes* in Costa Rica) is relatively small for the high elevations it inhabits. On the other hand, smaller forms of the *P. mexicanus* group (lineages B, C, D, L, M and N) are mostly from low and mid elevation mountains from central Mexico to Guatemala, El Salvador, Honduras and Nicaragua, grouped in the right side of the multivariate space. These lineages' distributional areas overlap on some extent, indicating morphometric similarity, but they do not form a monophyletic group. The widest area of overlap includes lineages B, L, M and N, which are genetically differentiated and allopatrically distributed. As described with more detail in Pérez-

Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), lineage B (*P. tropicalis* from low elevation mountains in the Caribbean slope of Guatemala and Belize) corresponds to one of the four basal lineages in the *P. mexicanus* group (Fig. 4). Lineage L is another exception to the rule of body size increment with elevation, since it occurs on medium to high elevations in central Guatemala, but it is closer to small mice of the neighbor lineage M (*P. salvadorensis*) distributed on low elevation mountains of eastern Guatemala, El Salvador and southern Honduras. Finally, lineage N (*P. nicaraguae*) is highly diverged within the Nuclear Central America clade, distributed in north and eastern Honduras and Nicaragua. Hence, *P. tropicalis*, *P. salvadorensis*, *P. nicaraguae* and lineage L represent a fine example of cryptic species within the *P. mexicanus* group; that is, although their morphometric data overlap, their areas of distribution do not, supporting the fact that they represent distinct and independent evolutionary units (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015).

Lineages D (*P. gymnotis*) and C (*P. mexicanus sensu stricto*) form a second area of overlap in the morphometric space (Fig. 3), nonetheless, the first one inhabits low elevation mountains around the Isthmus of Tehuantepec, while lineage C occupies middle to high elevation habitats north of the Isthmus. The lineages from these two areas of overlap have been considered, at some point, part of a variable and wide-distributed *P. mexicanus* (Huckaby 1980). The partial overlap of their morphometric data can somewhat explain the taxonomic uncertainty regarding the entire *P. mexicanus* group, while our results are in agreement with previous studies that have repeatedly suggested that the species *P. mexicanus* is polyphyletic (Van Coeverden de Groot 1995; Wade 1999; Zaragoza 2005). It is important to mention that not only are there sufficient morphometric differences between lineages in the *P. mexicanus* group, also there exists certain morphometric-genetic distance conservatism —correlation between morphometric (Mahalanobis) and genetic (K2P) distance—, suggesting a phylogenetic signal.

The quaternary ice ages, with their scenario of combined isolation and dispersal (gene flow), climate change and adaptation (Hewitt 2000), played a central role in the diversification of the genetic and morphometric forms in this group that has had its major diversification during the Pleistocene (Dawson 2005; Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). Our study demonstrates that the *Peromyscus mexicanus* group is both genetically and morphometrically variable, which supports the presence of a series of cryptic species and the taxonomic suggestions proposed by Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). Such intricate diversification is the response to a combination of factors, including phylogeny, isolation and adaptations to a wide variety of habitats along the mountains of southeast Mexico and Central

America, coupled with a complex evolutionary history associated with the dynamics of the Pleistocene climate changes and biogeographic processes.

### **Acknowledgements**

We appreciate the help, kindness and tissue samples from the mammal collections visited for the study: Livia León-Paniagua and Anahí Ávila from Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM; James L. Patton, Theodore Papenfuss and Chris Conroy from the Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, California; Suzanne McLaren, Lisa Miriello and John Wible at the Carnegie Museum of Natural History in Pittsburgh, Pennsylvania; Consuelo Lorenzo and Jorge Bolaños at El Colegio de la Frontera Sur, San Cristobal de Las Casas, Chiapas. Picture work was facilitated by John Wible and Lester Meléndez. Molecular work was conducted at Instituto de Ecología, UNAM, with special thanks to the guidance of Daniel Piñero, Marco Suárez-Atilano, Tania Gutiérrez-García, Susette Castañeda-Rico, Alejandro Flores-Manzanero and Laura Sánchez. Ernesto Vega assisted with some of the statistical procedures with R. This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). This research is part of the doctoral thesis of SGPC in the UNAM-USAC cooperation program. SGPC acknowledges the financial support provided by the Program for Postgraduate Studies (PAEP), UNAM and Dirección General de Docencia, USAC. EVD received financial support from CONACyT (Grant 101861) and Papiit (IN217910 and IN219707). This study is also part of the project Biotic inventories and evolution of the terrestrial vertebrate fauna of Nuclear Central America (Museum of Vertebrate Zoology, National Science Foundation Grant DEB1026396 to Theodore Papenfuss).

### **Resumen**

#### **Historias evolutivas intrincadas en especies de montaña: alometría filogenética y diversidad críptica en el grupo de especies *Peromyscus mexicanus* (Mammalia: Rodentia)**

Las especies asociadas con las montañas, las que exhiben distribuciones alopátricas relacionadas con la elevación, endemismos e historias evolutivas complejas, plantean retos sobre los escenarios evolutivos para discernir la diversificación de las especies. Los ratones del grupo *Peromyscus mexicanus*, distribuidos a lo largo de las montañas en el sureste de México y Centroamérica, son morfométricamente variables, algo razonable para la controversia relacionada con la delimitación de sus especies. Basados en el reconocimiento previo de 15 linajes mitocondriales para el grupo, realizamos un análisis morfométrico para probar si estos

linajes están diferenciados morfométricamente y si la filogenia mitocondrial y la morfometría craneal permiten la delimitación de las especies.

Basados en 19 medidas del cráneo de 521 ejemplares, los análisis multivariados y de discriminantes mostraron que los linajes son morfométricamente discernibles, representando fenotipos distintos, y que el tamaño general y las medidas de la mandíbula son características importantes que discriminan los linajes, apoyando la hipótesis sobre diferencias en los hábitos alimenticios entre las especies. Se observó un traslape en la morfometría multivariada entre algunos de los linajes, apoyando el reconocimiento de linajes crípticos dentro del grupo. Nuestros resultados demuestran que *P. mexicanus* es tanto genética como morfométricamente variable, donde la mayoría de especies de alta montaña se diferencian de las de montañas bajas; además, una correlación significativa entre la información mitocondrial y morfométrica sugiere señal filogenética, en acuerdo con una reciente propuesta taxonómica. La diversificación intrincada del grupo responde a adaptaciones a una variedad de hábitat de montaña y a la dinámica climática biogeográfica del Pleistoceno.

## References

- Baker RJ, Bradley RD (2006) Speciation in mammals and the genetic species concept. *J Mammal* **87**:643-662.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* **22**:148-155.
- Bradley RD, Baker RJ (2001) A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *J Mammal* **82**:960-973.
- Bradley RD, Durish ND, Rogers DS, Miller JR, Engstrom MD, Kilpatrick CW (2007) Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome b sequences. *J Mamm* **88**:1146-1159.
- Carleton MD (1989) Systematics and Evolution. In: Kirkland GL, Layne JN (eds), *Advances in the study of Peromyscus* (Rodentia). Texas Tech University Press, Lubbock, Texas, pp 7-141.
- Coyne JA, Orr, HA (2004) *Speciation*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Crawford AJ, Smith EN (2005) Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol* **35**:536-555.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* **9**:772.
- Daza J, Castoe T, Parkinson C (2010) Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* **33**:343-354.
- Dawson WD (2005) Peromyscine biogeography, Mexican topography and Pleistocene climatology. In: Sanchez-Cordero V, Medellín RA (eds) *Contribuciones Mastozoológicas en Homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología-Instituto de Ecología, UNAM, CONABIO, México, pp.145-156.
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biol* **56**:879-886

- Gould SJ (1966) Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biol Rev* **41**:587-640.
- Gutiérrez-García TA, Vázquez-Domínguez E (2012) Biogeographically dynamic genetic structure bridging two continents in the monotypic Central American rodent, *Otodylomys phyllotis*. *Biol J Linn Soc* **107**:593-610.
- Gutiérrez-García TA, Vázquez-Domínguez E (2013) Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Res* **79**:311-324.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biol* **52**:696-704.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**:907-913.
- Hooper ET. 1968. Classification. In: King JA (ed) *Biology of Peromyscus* (Rodentia). *Sp Pub Amer Soc Mammal* **2**:27-74.
- Hooper ET, Musser GG (1964) The glans penis in Neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of muroid rodents. *Misc Publ Mus Zool Univ Mich* **123**:1-64.
- Huckaby DG (1980) Species limits in the *Peromyscus mexicanus* group (Mammalia: Rodentia: Muroidea). *Contr Sci Mus Nat His Los Angeles* **326**:1-24.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754-755.
- Lande R (1980) Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *Am Nat* **116**:463-479.
- Leache AD, Koo MS, Spencer CL, Papenfuss TJ, Fisher RN, McGuire JA (2009) Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *P Natl Acad Sci USA* **106**:12418-12423.
- León-Paniagua L, Navarro-Sigüenza AG, Hernández-Baños BE, Morales JC (2007) Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Mol Phylogenet Evol* **42**:653-664.
- Lindsay EH (1972) *Small mammal fossils from the Barstow Formation, California*. University of California Press, Berkeley, California.
- Lorenzo C, Cautle E, Espinoza E, García M (2006) Intraspecific variation in *Peromyscus zarhynchus* (Rodentia: Muridae) from Chiapas, México. *J Mamm* **87**:683-689.
- Lorenzo C, García M (2007) Sistemática y conservación de mamíferos de Chiapas. In: Sánchez-Rojas G, Rojas-Martínez A (eds), *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, pp. 47-57.
- Mayr E (1963) *Populations, species, and evolution*. Harvard University Press, London.
- Musser GG (1969) Notes on *Peromyscus* (Muridae) of Mexico and Central America. *Am Mus Novit* **2357**:1-23.
- Musser GG, Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (eds), *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 894-1534.
- Ordóñez-Garza N, Matson JO, Strauss RE, Bradley RD, Salazar-Bravo J (2010) Patterns of phenotypic and genetic variation in three species of endemic Mesoamerican *Peromyscus* (Rodentia: Cricetidae). *J Mammal* **91**:848-859.
- Ornelas JF, Sosa V, Soltis DE, Daza JM, González C, Soltis P, Gutiérrez-Rodríguez C, Espinosa A, Castoe T, Bell Ch, Ruiz-Sanchez E (2013) Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern Mesoamerica. *Plos One* **8**: e56283.

- Osgood WH (1909) Revision of the mice of the American genus *Peromyscus*. N Am Fauna **28**:1-285.
- Pérez-Consuegra SG, Vázquez-Domínguez E (2015) Mitochondrial diversification of the *Peromyscus mexicanus* group in Mesoamerica: taxonomical and biogeographical implications. J Zool Syst Evol Res **53**:300-311.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rambaut A (2013) FigTree [Online]. Website accessed on October, 2015, available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reham FA, Neiber MT, Walther F, Hausdon B (2016) Morphological and genetic differentiation of *Eremina desertorum* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) in Egypt. Zool Scr **45**:48-61.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution **43**:223-225.
- Rogers DS, Engstrom MD (1992) Evolutionary implications of allozymic variation in tropical *Peromyscus* of the *mexicanus* species group. J Mammal **73**:55-69.
- Rogers DS, Engstrom MD (2004) Phylogenetic relationships among peromyscine rodents: allozyme evidence. In: Sánchez-Cordero V, Medellín RA (eds), Contribuciones Mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa. Instituto de Biología, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 427-440.
- Santos JA (1994) Evaluación del uso de las medidas externas estándar en los análisis morfométricos de mamíferos. An Inst Biol Mex, Ser Zool **65**:275-285.
- Sergis EJ, Campbell KK, Olson LE (2014) Taxonomic boundaries and craniometric variation in the treeshrews (Scandentia, Tupaiidae) from the Palawan faunal region. J Mamm Evol **21**:111-123.
- Smith SA, Bradley RD, Greenbaum IF (1986) Karyotypic conservatism in the *Peromyscus mexicanus* group. J Mammal **67**:584-586.
- Stanley WT, Hutterer R, Giarla TC, Esselstyn JA (2015) Phylogeny, phylogeography and geographical variation in the *Crocidura monax* (Soricidae) species complex from the montane islands of Tanzania, with descriptions of three new species. Zool J Linn Soc-Lond **174**:185-215.
- Strecker U, Faúndez VH, Wilkens H (2004) Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome *b* sequence data. Mol Biol Evol **33**:469-481.
- Suárez-Atilano M, Burbrink FT, Vázquez-Domínguez E (2014) Phylogeographic structure of *Boa constrictor imperator* with emphasis of diversification across the lowlands and mountains of Central America and Mexico. J Biogeogr **41**:2371-2384.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol **30**:2725-2729.
- Van Coeverden de Groot P (1995) Phylogenetic systematics and speciation in highland deer mice of the *Peromyscus mexicanus* species group. Unpublished MSc. Thesis, University of Toronto, Canada.
- Wade, NL (1999) Molecular systematic of neotropical deer mice of the *Peromyscus mexicanus* species group. Unpublished MSc. Thesis, University of Toronto, Canada.
- Wilcox TP, Hugg L, Zeh JA, Zeh DW (1997) Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of Neotropical pseudoscorpions. Mol Phylogenet Evol **7**:208-216.

Zaragoza, EP (2005) Variación geográfica de *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Muridae) en México. Unpublished BSc. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

## **CAPÍTULO 3**

**Filogeografía de los ratones de alta y baja montaña del grupo  
*Peromyscus mexicanus* en el Núcleo de Centroamérica**

**Sergio G. Pérez-Consuegra, Susette Castañeda-Rico y Ella Vázquez-  
Domínguez**



## RESUMEN

Se ha sugerido que los bosques de montaña tropicales tienen gran riqueza de especies debido a la diversidad de microclimas y a las adaptaciones diferenciales de los linajes, catapultado por las distribuciones alopátridas. Los ratones de montaña del grupo *Peromyscus mexicanus* muestran patrones generales de distribución alopátrida en el sur de México y Centroamérica, pero también coexisten con distribuciones parapátridas y de segregación altitudinal de los linajes. Los datos mitocondriales sugieren que el grupo divergió de otros peromiscinos hermanos hace aproximadamente 4 millones de años a mediados del Plioceno y que la diversificación de los linajes modernos tuvo lugar durante el Pleistoceno, probablemente influenciada por los ciclos glaciales e interglaciales. La diferenciación de los linajes/especies modernas se inició hace aproximadamente 2.6 millones de años y el último se desarrolló hace 0.9 millones de años, aunque los linajes tienen entre 0.1 a 1 millón de años hasta su ancestro mitocondrial más cercano, con diferencias probablemente asociadas a diferentes pulsos climáticos del este período. Aunque el grupo muestra una fuerte asociación con los bosques húmedos de montaña (conservadurismo de nicho), la red de haplotipos sugiere que los linajes principales han cambiado del hábito de baja a alta montaña, y viceversa, en varias ocasiones, sugiriendo un patrón secundario de divergencia de nicho. La mayoría de linajes muestran una estabilidad poblacional a largo plazo, pero los linajes de alta montaña tienden a mostrar un ligero decremento poblacional en los últimos 25 mil años, aproximadamente desde el último glacial máximo y durante el Holoceno, mientras que los linajes de baja montaña tienden a mostrar un incremento poblacional durante el mismo período. El incremento poblacional de los linajes de baja montaña probablemente se asocia a un incremento en las áreas de distribución, mientras que los linajes de alta montaña tienden a reducir sus áreas de distribución con el calentamiento global, que genera una depresión poblacional. Esta tendencia sugiere que el cambio climático actual probablemente tenga efectos diferenciales en los linajes del grupo.

## INTRODUCCIÓN

Se desconocen todavía muchos de los procesos evolutivos que dieron forma a la biota actual del istmo centroamericano, una zona relativamente pequeña en extensión geográfica pero compleja en su historia geológica y biogeográfica. La complejidad geológica del área es resultado, sobre todo, de la confluencia de cinco placas tectónicas: Norteamericana, Sudamericana, Nazca, Cocos y Caribe, que han interactuado desde el Mesozoico, durante el Cenozoico y hasta el presente, generando la actual fisiografía del Istmo (Iturralde-Vinent 2006). Centroamérica ha sido de manera general dividida fisiográficamente en dos grandes regiones: Núcleo de Centroamérica al norte y Conexión Ístmica al sur (Schuchert, 1935). El Núcleo de Centroamérica incluye diversas cadenas montañosas a lo largo del llamado Bloque Maya, que forma parte de la placa de Norteamérica (norte de Chiapas, Guatemala y Belice) y del Bloque Chortí, sobre la placa del Caribe (sur de Chiapas y Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua) (Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez 2013). Las montañas del Núcleo de Centroamérica son interrumpidas y delimitadas por dos de las mayores barreras biogeográficas de la zona: el Istmo de Tehuantepec al norte y la Depresión de Nicaragua al sur (Daza *et al.*, 2010). El sistema de fallas Motagua-Polochic-Jocotán, que divide los Bloques Maya y Chortí, se reconoce también como una barrera biogeográfica importante (Daza *et al.*, 2010). En la región existen además otras barreras, tales como la Depresión Central de Chiapas (Ornelas *et al.* 2013), la Depresión Central de Honduras, así como volcanes, cañadas y mesetas (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015).

Así, la fisiografía del Núcleo de Centroamérica, con sus sistemas montañosos y barreras, ha dado como resultado patrones filogeográficos complejos en la biota del sur de México y Centroamérica (Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez 2012). En general se reconoce que la biota de la región es una mezcla compleja de elementos con afinidades norteamericanas y sudamericanas, así como de procesos de diversificación local (Ornelas *et al.* 2013). Dicha diversificación local se ubica temporalmente alrededor del Plio-Pleistoceno (Bagley & Johnson 2014). La biota presenta también distintos patrones filogenéticos y filogeográficos según con los diferentes hábitats característicos de la región. Por ejemplo, en el caso de las zonas tropicales hay una clara asociación de elementos con los de Sudamérica, como se aprecia en la filogenia de las hormigas neotropicales del género *Azteca*, que presenta clados de México y del norte de Centroamérica anidados en los clados del sur de Centroamérica, y éstos a su vez anidados en los de Sudamérica (Pringle *et al.* 2012). En los bosques secos y valles intermontanos se ha observado una alta diversificación local en plantas (Willis *et al.* 2014), en

iguanas del género *Ctenosaura* (Hasbún *et al.* 2005) y en ratones del grupo *P. melanophrys*, para quienes las montañas parecen funcionar como barreras (Castañeda-Rico *et al.* 2014).

Los bosques de montaña del Núcleo de Centroamérica también muestran esta mezcla de biota con afinidades distintas, por ejemplo ciertos géneros florísticos de Norteamérica como *Alnus*, *Carpinus*, *Cornus* y *Liquidambar*, que se distribuyen en la región desde el Terciario, comparten la zona con otros géneros de Sudamérica como *Clethra*, *Dendropanax* y *Podocarpus*. Se conoce que estos *taxa* han tenido ciclos de migración recurrentes en varias direcciones, resultando en complejos patrones evolutivos y biogeográficos (Ornelas *et al.* 2010; Jardón-Barbolla *et al.* 2011, Ruiz-Sánchez & Ornelas 2014).

Existen ejemplos que muestran que especies de flora y fauna de montaña presentan estructuras genéticas marcadas, donde la diferenciación genética es alta e independiente de la distancia geográfica, congruentes con las condiciones de aislamiento o alopatria. Estos patrones se han observado en salamandras bolitoglosinas (Rovito *et al.* 2015), en la serpiente *Boa constrictor* (Suárez-Atilano, Burbrink & Vázquez-Domínguez 2014) y en roedores de montaña de los grupos *Peromyscus fuvvus* (Harris, Rogers & Sullivan 2000) y *P. aztecus* (Sullivan, Markert & Kilpatrick 1997). Asimismo, se han documentado estructuras genéticas menos marcadas, como en aves del complejo *Buarremon* (Navarro-Siguenza *et al.* 2008) o *Chlorospingus aophthalmicus* (Weir *et al.* 2008).

El género *Peromyscus* pertenece a la familia del nuevo mundo Cricetidae, subfamilia Neotominae, tribu Reithrodontomyini (Musser y Carleton 2005). Los peromiscinos se distribuyen casi exclusivamente en Norteamérica (Alaska a Panamá), donde México es considerado su principal centro de diversidad (Dawson 2005). El registro fósil de peromiscinos es relativamente abundante, sugiriendo que ellos evolucionaron alrededor del Mioceno tardío del género extinto *Copemys* (Lindsay 1972). La diversificación de los neotóminos en general y del género *Peromyscus* en particular tuvo lugar a finales del Mioceno y durante el Plioceno (Wilson & Reeder 2005; Lindsay 1995). Durante el llamado “Óptimo Termal del Plioceno Medio” (MPTO, por sus siglas en inglés) la Tierra experimentó un periodo largo de clima relativamente cálido, incluso probablemente más cálido que el actual (Cronin 2010). Durante ese periodo se incrementó el nivel del mar y se formaron canales marinos y mares someros a lo largo del Istmo de Tehuantepec y la Depresión de Nicaragua, respectivamente (Daza *et al.* 2010), favoreciendo el aislamiento temporal del actual Núcleo de Centroamérica. Cabe resaltar que el Istmo de Tehuantepec y la Depresión de Nicaragua funcionaron repetidamente como barreras (efecto vicariante) durante el Mioceno y Plioceno, como se ha observado en algunos grupos de serpientes (Daza *et al.* 2010). Es durante estos periodos que, en particular para el grupo *P.*

*mexicanus*, inicia su diferenciación de grupos y géneros hermanos como *P. furvus*, *P. megalops*, *P. aztecus*, *Habromys* e *Isthmomys*, peromiscinos que actualmente se distribuyen desde el centro de México hasta Costa Rica y Panamá (Bradley *et al.* 2007). Es probable que el cierre posterior de los canales marinos en Tehuantepec y Nicaragua permitiera la dispersión del grupo *P. mexicanus* hacia el norte y el sur, como se ha documentado para el roedor *Oryzomys couesi* (Gutiérrez-García 2013), así como un intercambio general de linajes peromiscinos en toda la región. Actualmente, el grupo de especies *P. mexicanus* es considerado un grupo de origen pleistocénico (Dawson 2005), monofilético y con al menos nueve especies de montaña: *P. mexicanus*, *P. guatemalensis*, *P. gymnotis*, *P. zarhynchus*, *P. nudipes*, *P. grandis*, *P. salvadorensis*, *P. nicaraguae* y *P. tropicalis* (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015).

Se ha reconocido el efecto global que han tenido los ciclos glaciales en la distribución y estructura genética de muchas especies (Hewitt 2000), pero es durante el último período glacial y el inicio del Holoceno en que se aprecia una huella más significativa en las distribuciones e historias demográficas de diversos organismos de flora y fauna (Ridle, Hafner & Alexander 2000; Ramírez-Barahona & Eguiarte 2013), incluyendo los ejemplos clásicos de rápida expansión poblacional post-glacial en Norteamérica y Europa (Godfrey 2000, Moscarella 2011). Parece ser que una estructura genética más profunda se relaciona con refugios del Pleistoceno más amplios (Roberts & Hamann 2015). Pero hay indicios de que los efectos de los ciclos glaciales no solo cambiaron las distribuciones de las especies horizontalmente sino que también lo hicieron verticalmente, como por ejemplo en el caso de la distribución de algunas serpientes en Oriente Medio, que parecen haber ascendido altitudinalmente desde el Último Glacial Máximo (GLM) siguiendo su hábitat óptimo, produciendo distribuciones alopátridas ahora restringidas a los picos de las montañas (Yousefi *et al.* 2015). Los cambios en la distribución de los pisos altitudinales en zonas de montaña también se han observado con métodos paleo-palinológicos en los Andes (Mayle *et al.* 2009) y en la Sierra de Tamanca en el sur de Centroamérica (Kappelle 1996) y es de suponer que ello afecte las distribuciones de los ratones de montaña. Por otro lado existen ejemplos de distribución alopátrida en combinación con segregación parapátrida en roedores en los Andes (Patton & Smith 1992), así como en el grupo *P. mexicanus* en el sur de México y Centroamérica (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). En particular y que aplica para las especies de montaña, se ha sugerido que el conservadurismo evolutivo de los nichos termales (como en la segregación altitudinal) en *taxa* tropicales, aunado a una mayor zonificación de la temperatura en las montañas, puede incrementar el aislamiento alopátrido y la especiación (Cadena *et al.* 2012). Aunque dichos efectos son generalmente más evidentes en especies restringidas y especialistas (por ejemplo

por hábitat, alimento o área de distribución), también se observan en especies generalistas como el caso del roedor *Peromyscus gossypinus* en Norteamérica (Bekmann 2011).

La diversidad de hábitats de montaña y la segregación altitudinal de las especies (y linajes) cuya distribución se restringe a dichas montañas, permiten sugerir la existencia de patrones filogeográficos diferenciales, es decir que distingan entre aquellas que se distribuyen en alta montaña y las de baja montaña. En este contexto, los objetivos del presente estudio son: 1) evaluar la historia evolutiva de los linajes mitocondriales y nucleares del grupo *Peromyscus mexicanus* y determinar los tiempos de divergencia, en particular en relación con las especies de baja y alta montaña, y 2) investigar si existen diferencias en la historia demográfica entre linajes de alta y baja montaña. Nuestra premisa es que los ciclos climáticos de las glaciaciones del Pleistoceno afectaron a los linajes de alta y baja montaña de manera diferencial, lo cual se verá reflejado en patrones filogeográficos distintos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para este trabajo se retomaron los resultados filogenéticos obtenidos con 1113 pares de bases de gen mitocondrial citocromo *b* de 186 individuos del grupo *Peromyscus mexicanus* de 45 localidades en el Núcleo de Centroamérica, reportados en Pérez-Consuegra y Vázquez-Domínguez (2015) (ver Figura 2 de esa publicación). Para complementar los resultados, se realizó otro análisis filogenético utilizando un gen nuclear para una selección de 18 muestras representativas de los 15 linajes obtenidos con la filogenia mitocondrial (ver capítulo 1), como se describe a continuación.

### **Extracción de DNA, amplificación y secuenciación**

Amplificamos y secuenciamos el gen nuclear GHR (Growth Hormone Receptor) (829 pb) para 18 muestras de tejido fresco (Tabla 1), utilizando los primers GHR1f y GHRend1f (Jansa *et al.* 2009). El DNA se amplificó en un volumen de reacción de 25 µl con las siguientes concentraciones: 50-100 ng de DNA, 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Vivantis), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato y 0.4 µM de cada primer. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo de la siguiente forma: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 15 s, 60°C por 1 min, y 72°C por 1.5 min, con una extensión final de 72°C por 10 min (Castañeda Rico *et al.* 2014). Se utilizaron geles de agarosa (1.5%) teñidos con bromuro de etidio para visualizar los productos amplificados. Los productos de PCR fueron purificados y analizados en un ABI3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, California) por un proveedor de servicio de secuenciación, High Throughput

Sequencing (HTSeq), Washington, USA (<http://www.htseq.org>). Todas las reacciones de PCR incluyeron un control negativo que también se envió a secuenciar.

### **Análisis filogenético con el gen nuclear**

Editamos las secuencias con el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Realizamos un alineamiento múltiple en el programa ClustalX2 (Thompson *et al.* 1997; Larking *et al.* 2007). Para seleccionar el mejor modelo de evolución para el gen nuclear, empleamos el programa jModel Test 2.1.3 (Guindon & Gascuel 2003), con base en el criterio de Akaike (AIC). El modelo obtenido fue HKY+G, con los siguientes parámetros: frecuencias de las bases= A 0.2947, C 0.2724, G 0.2205, T 0.2125; nst= 2; rates= gamma; ( $\alpha$ )= 0.3680, y proporción de sitios invariables= 0.

Realizamos un análisis de Máxima Verosimilitud (MV) en el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010) utilizando cinco árboles “neighbor-joining” como punto de partida, con la opción de búsqueda de árboles del intercambio del vecino más cercano (NNI) y un soporte de ramas no paramétrico, con la prueba de la proporción aproximada de la verosimilitud, basado en el procedimiento de “Shimodaira-Hasewaga-like” (aLRT SH-like) con 100 réplicas. El análisis de Inferencia Bayesiana (IB) se implementó en el programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) con cuatro corridas, cada una con tres cadenas de Markov calientes y una fría por 10,000,000 de generaciones, muestreando cada 1,000 y partiendo de un árbol al azar. La convergencia y estacionalidad dentro de las cadenas se visualizó con TRACER 1.4 (Rambaut & Drummond 2007) y el 25% de las generaciones fueron descartadas con burn-in. Las topologías fueron visualizadas y editadas con FigTree v.1.4.0 (Rambaut 2013). Como grupos externos se incorporaron al análisis cinco secuencias del GenBank de las especies *Calomyscus baluchi*, *Neotoma micropus*, *Isthmomys pirrensis*, *Reithrodontomys sumichrasti* y *Habromys simulatus* (GQ405372.1, EF989753.1, EF989748.1, EF989824.1, KF885928.1).

### **Estructura y diferenciación genética**

Para determinar el grado de diferenciación intra e inter-específica del grupo *Peromyscus mexicanus* generamos una red de haplotipos con Network 4.6.1.3 (Bandelt, Forster & Röhl 1999), con base en las 186 secuencias mitocondriales. Utilizamos el algoritmo “Median Joining Network” con la adición de vectores medios que representan secuencias hipotéticas, generalmente ancestrales, que son necesarias para conectar las secuencias existentes.

Para explorar si las poblaciones del grupo *P. mexicanus* se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia, donde el flujo génico entre poblaciones tiene una relación lineal y

significativa con la distancia geográfica, realizamos una prueba de Mantel. Para ello utilizamos una matriz de distancias geográficas efectivas (utilizando distancias euclidianas), estimada con el Geographic Distance Matrix Generator (v.1.2.3) (Erst 2015) y una matriz de distancias genéticas a partir de valores pareados de *Fst*. La prueba de Mantel se realizó con el programa IBD (Jensen *et al.* 2005), con base en 30,000 permutaciones. Se excluyeron del análisis poblaciones con menos de 5 secuencias.

### **Análisis demográficos y de tiempos de divergencia**

Para estimar los tiempos de divergencia de los linajes mitocondriales obtenidos utilizamos BEAST 1.7.4 (Drummond & Rambaut, 2012), donde se analizaron las 186 secuencias mitocondriales y las mismas especies como grupo externo (con excepción de *Calomyscus* para evitar el efecto de las ramas largas). Esta aproximación utiliza un método filogenético relajado que no depende de un reloj molecular. El tiempo al ancestro más común (TMRCA por sus siglas en inglés) para los linajes principales se obtuvo utilizando búsquedas bayesianas con cadenas Markov de Monte Carlo (MCMC, siglas en inglés). Utilizamos un modelo nucleotídico de evolución general, el “Generalised time-reversible” (GTR) con una distribución gamma y sitios invariables (GTR+G+I) para todas las posiciones de codón, e implementamos un método logarítmico-normal sin correlación de reloj molecular relajado y un proceso de especiación de Yule (Yule 1925). Los tiempos de divergencia fueron estimados con un árbol a priori logarítmico-normal no correlacionado, con un tamaño de población constante a priori y fechas de calibración logarítmico-normal. Se muestrearon los árboles con 20,000 iteraciones y 100,000,000 generaciones, con 10% de muestras iniciales descartadas como calentamiento. Para el método relajado, proveímos puntos de calibración y estimaciones de error derivados de una distribución logarítmico-normal. Utilizamos tres puntos de calibración: la radiación de Neotominae-Peromyscinos hace  $8.6 \pm 2.1$  Ma (Engel *et al.* 1998), la radiación de los peromyscinos a  $4.5 \pm 1.1$  Ma (Engel *et al.* 1998) y la separación de *Habromys* y *Peromyscus* hace  $2.44 \pm 3.48$  Ma (León-Paniagua *et al.* 2007). Probamos varios ensayos en BEAST y la estabilidad de los corrimientos se determinó con TRACER v.1.4 (Rambaut & Drummond 2007).

Evaluamos los patrones demográficos históricos a partir de las secuencias mitocondriales para nueve linajes (aquellos que tuvieron un tamaño de muestra mayor a 10 individuos): C (*P. mexicanus*), D (*P. gymnotis*), E (*P. zarhynchus*), G (*P. zarhynchus sensu lato*), H (*P. guatemalensis*), I (*P. guatemalensis sensu lato*), L (*P. salvadorensis sensu lato*), M (*P. salvadorensis*) y N (*P. nicaraguae*). Realizamos un análisis de diferencias nucleotídicas pareadas entre linajes con DNASp (Rozas *et al.* 2003), para evaluar si se ajustaban a un

modelo de expansión o contracción poblacional. Asimismo, realizamos otro análisis demográfico con un método de coalescencia bayesiano, el de gráficas de líneas en el cielo (bayesian skyline plots) con BEAST, para inferir fluctuaciones poblacionales en el tiempo mediante la estimación de la distribución posterior del tamaño efectivo de la población en intervalos específicos a lo largo de la filogenia (Drummond & Rambaut, 2007). Los parámetros del modelo fueron muestreadas cada 1,000 generaciones con 100,000,000 de iteraciones bajo un modelo de reloj molecular logarítmico normal relajado, con supuestos de distribución uniforme y un calentamiento de 10%. La convergencia de los resultados fue determinada con TRACER. Los resultados demográficos se complementaron con los resultados de las pruebas de neutralidad realizadas en Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015): índices  $D$  de Tajima (Tajima, 1989),  $F$  y  $D$  de Fu & Li (1993) y  $F_s$  de Fu (Fu 1997).

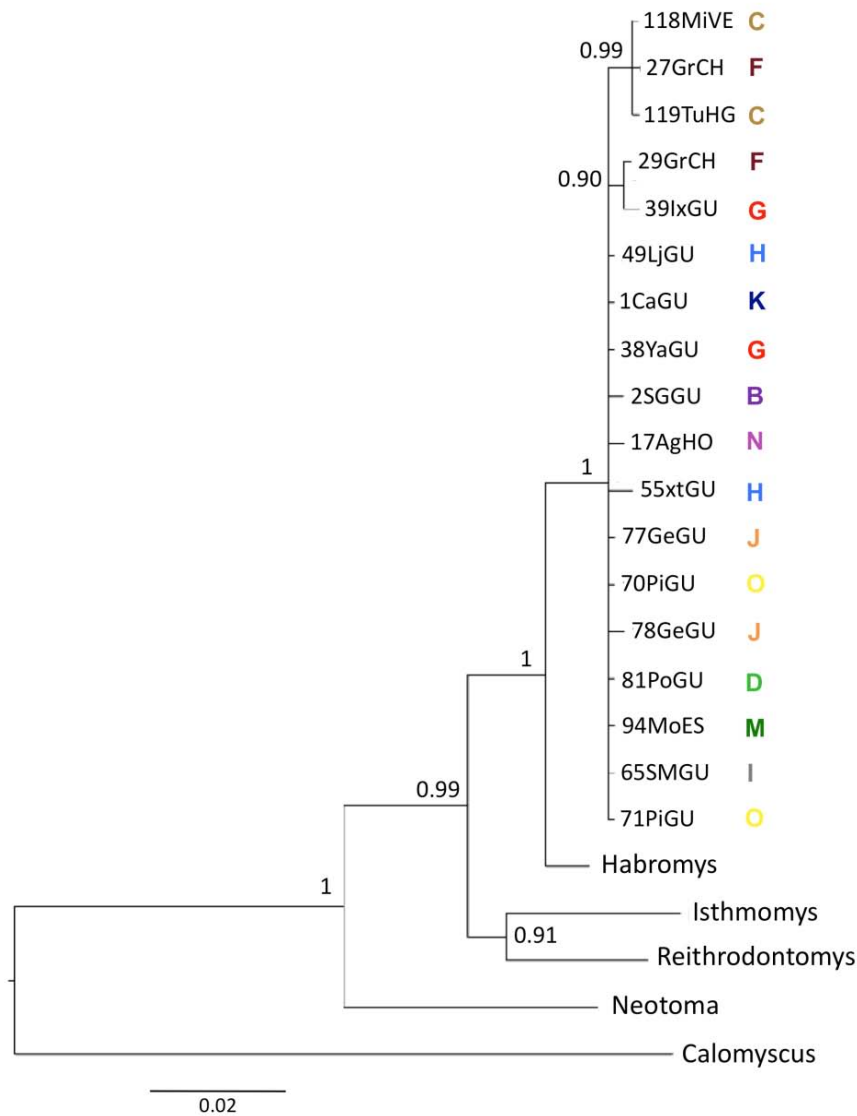
## RESULTADOS

El resultado del análisis filogenético mostró la misma topología para Máxima Verosimilitud y Bayesiano, donde se aprecian tres clados principales, con alto valor de soporte ( $pp = 0.9-1.0$ ), así como varios haplotipos diferenciados pero que no forman clados distintos (Fig. 1). Aunque la filogenia nuclear tiene poca resolución, ésta no contradice la estructura genética observada en la filogenia mitocondrial (ver figura 2 en Pérez -Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015), principalmente al reconocer al grupo *P. mexicanus* como monofilético. Cabe mencionar que no fue posible amplificar para el gen nuclear ninguna de las dos muestras del linaje A (Clado I, basal en la filogenia mitocondrial), lo cual pudo haber repercutido en la topología obtenida.

Se obtuvieron 36 secuencias nucleares de 18 individuos (826 pb), las cuales incluyeron 812 sitios invariables, 14 sitios polimórficos y 10 sitios parsimoniosamente informativos. Se detectaron 14 haplotipos ( $h = 0.8111$ ), una diversidad nucleotídica baja ( $\pi = 0.00218$ ) y un número promedio de diferencias nucleotídicas entre haplotipos ( $k$ ) de 1.802. Las pruebas de Tajima's  $D$  ( $D = -1.501$   $p > 0.1$ ), Fu y Li's  $F$  ( $F = -0.754$   $p > 0.1$ ) y Fu's  $F_s$  ( $F = -8.217$   $p > 0.1$ ) indicaron que los datos se conforman con la hipótesis de neutralidad.

Los resultados de la prueba de Mantel no se ajustan a un modelo de aislamiento por distancia ( $r = -0.025$ ,  $p = 0.40$ ) (Fig. 2).

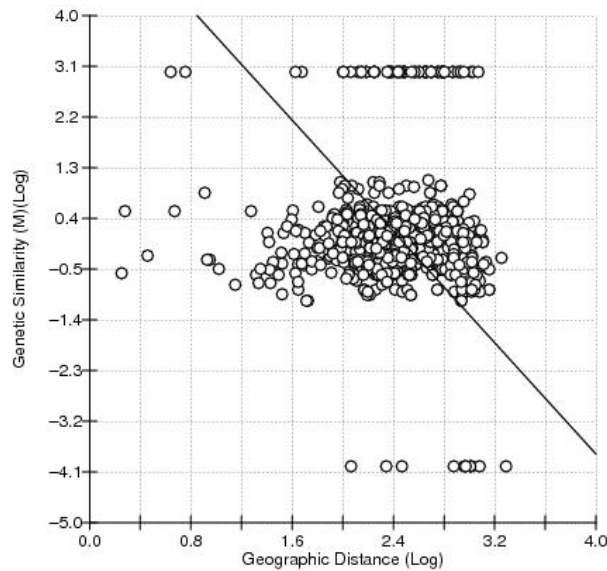




**Figura 1.** Árbol de inferencia Bayesiana basado en 18 secuencias del gen nuclear Growth Hormone Receptor del grupo *Peromyscus mexicanus* del Núcleo de Centroamérica. Los 12 linajes recuperados se indican con los códigos B-O de acuerdo con Pérez -Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015) (ver Tabla 2). Arriba de las ramas se incluyen el valor de probabilidad posterior ( $>0.9$ ). Las especies del grupo externo fueron *Calomyscus hotsoni*, *Neotoma albigula*, *Isthmomys pirrensis*, *Reithrodontomys sumichrasti* y *Habromys lophurus*; el árbol filogenético fue enraizado con *Calomyscus*.

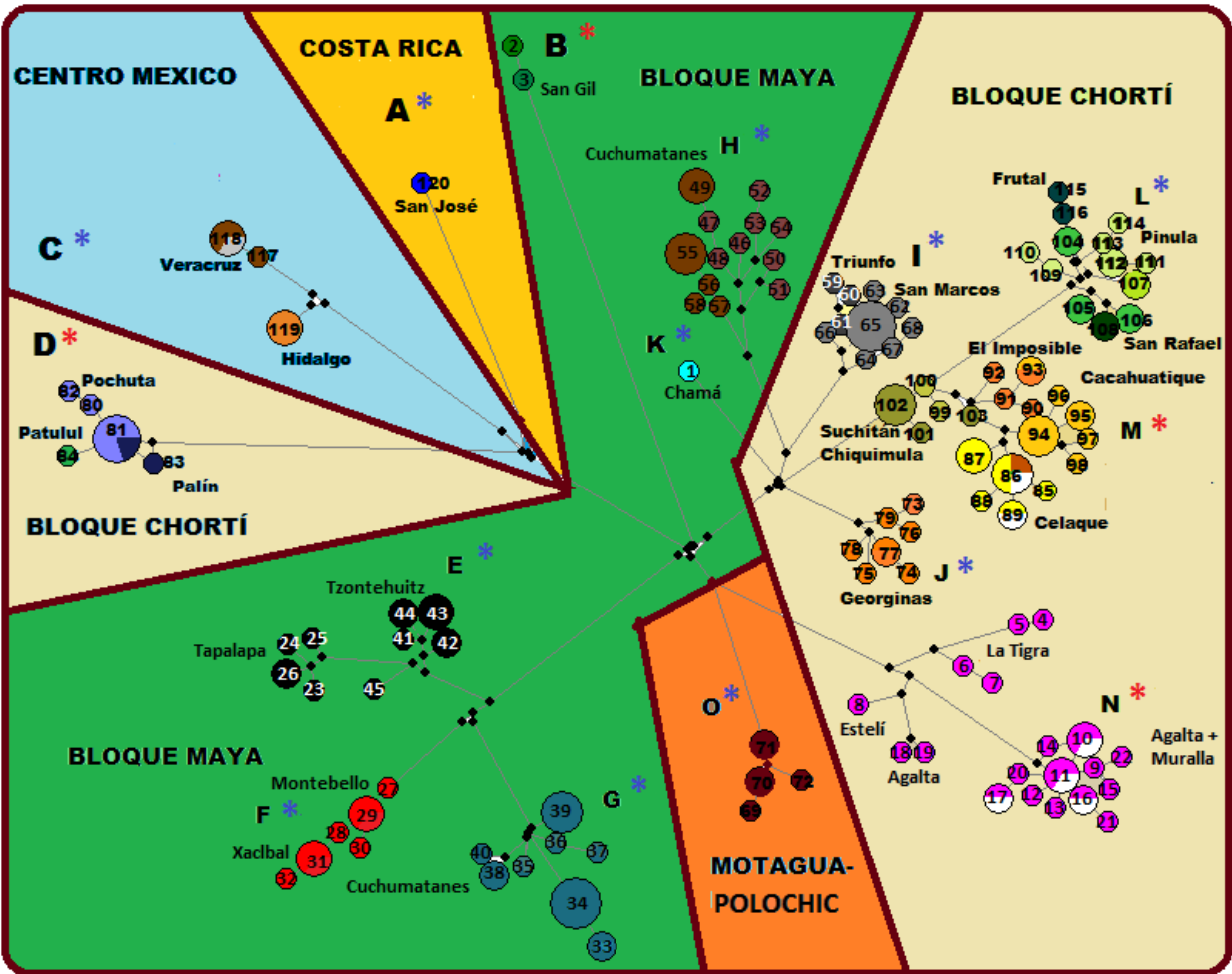
La red de haplotipos coincide con la topología observada en la filogenia mitocondrial, donde en general los grupos de haplotipos presentan una alta correspondencia geográfica (Fig. 3). En la red se pueden observar seis grupos principales, los cuales parten de un grupo central de haplotipos ancestrales hipotéticos. Con base en la clasificación de los linajes mitocondriales

(siguiendo a Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015), en la red de haplotipos se puede apreciar que tres grupos de haplotipos terminales corresponden a: el linaje A (*P. nudipes*), distribuido en alta montaña en la Sierra de Talamanca de Costa Rica; el linaje C (*P. mexicanus*), en zonas altas de bosques nubosos del centro de México (Veracruz hasta Hidalgo) al norte del Istmo de Tehuantepec; y el linaje D (*P. gymnotis*), que se distribuye aledaño al Istmo de Tehuantepec, en zonas bajas de montañas en la costa del Pacífico de Chiapas y Guatemala.



**Figura 2.** Prueba de Mantel basada en matrices de distancia genética ( $F_{st}$ ) y distancia geográfica (Euclidiana) (transformadas al logaritmo base 10) para 186 secuencias de citocromo b del grupo *Peromyscus mexicanus* de 45 localidades distintas ( $r=0.02$ ,  $p=0.4$ ).

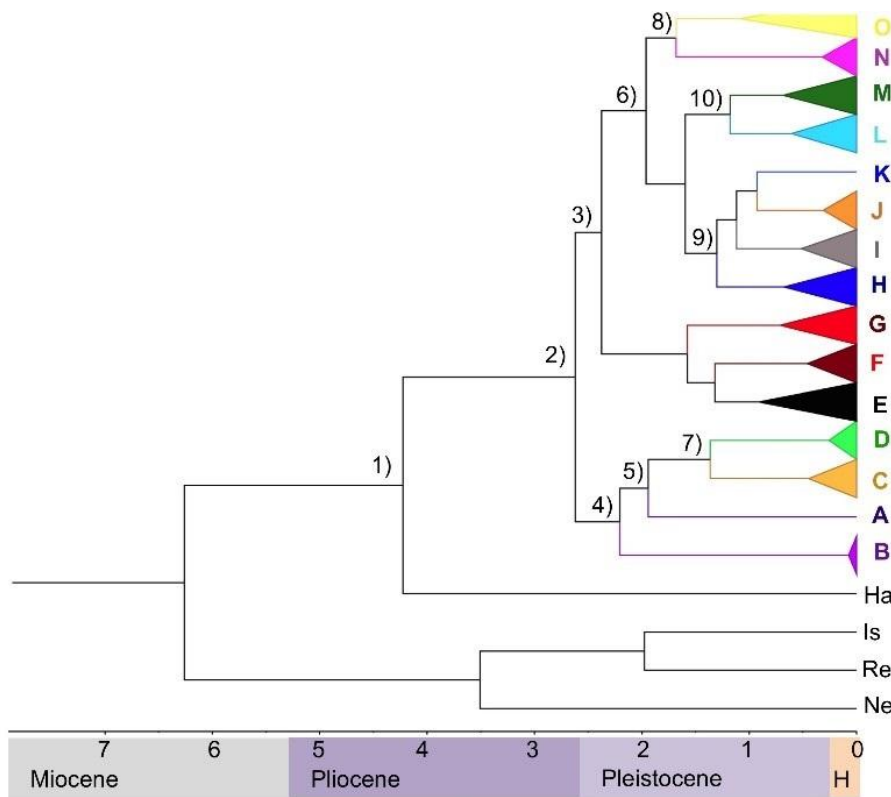
Asimismo, cuatro ramas principales de la red de haplotipos se distribuyen exclusivamente en el Núcleo de Centroamérica: el linaje B (*P. tropicalis*) se distribuye principalmente en las montañas de baja altura de Cerro San Gil en el Bloque Maya; los linajes E, F y G (*P. zarhynchus sensu lato*) en zonas altas de las montañas de los Altos de Chiapas (Bloque Maya) y norte de Guatemala; los linajes G y H (*P. guatemalensis*) comparten la zona de alta montaña en la Sierra de los Cuchumatanes de Guatemala; en las tierras altas de la Sierra de Chamá se ubica el linaje K (*P. grandis*). Los linajes I, J (*P. guatemalensis sensu lato*) y L (*P. salvadorensis sensu lato*) ocupan zonas de alta montaña en el Bloque Chortí, mientras que los linajes M (*P. salvadorensis*) y N (*P. nicaraguae*) se distribuyen en la misma región pero en las zonas bajas; finalmente, el linaje O es endémico de las tierras altas de la zona de fallas de Motagua-Polochic-Jocotán.



**Figura 3.** Rede de haplotipos del grupo *Peromyscus mexicanus*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos. Se indican los linajes (A-O) y los números de los haplotipos de cada linaje, con base en Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). Se indican las localidades (poblaciones) y la región fisiográfica a la que corresponden. Los asteriscos rojos señalan los linajes de los estratos altitudinales bajos (ca. 0-1500m) y los asteriscos azules los linajes de los estratos altitudinales medios y altos (ca. 1500-3000).

Los resultados del análisis de tiempos de divergencia mostraron que el evento de divergencia más antiguo corresponde a la separación del grupo *Peromyscus mexicanus* de *Habromys*, la especie del grupo externo basal a todo el grupo, hace cerca de 4.22 millones de años (Ma) (Nodo 1, Fig. 4), durante el Plioceno medio. Posteriormente, se aprecia una primera separación entre los clados I, II y III y el clado más diversificado, el clado IV (2.62 Ma; Nodo 2) durante el Pleistoceno temprano. Dentro del Clado IV, la siguiente diversificación ocurrió en las montañas Mayas y la región de los Cuchumatanes en Chiapas y Guatemala, separando los linajes E, F y G del resto de linajes (Nodo 3; 2.38 Ma). Siguiéron dos eventos que separan

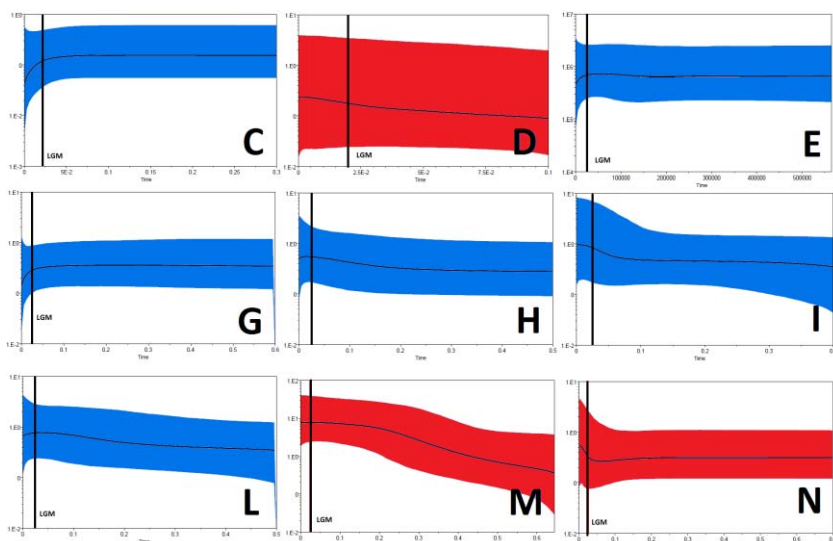
linajes del Clado II (sistema de fallas Motagua-Polochic-Jocotán en Guatemala) de los clados I/III y, un poco más tarde, la separación del Clado I del Clado III, hace 2.2 y 1.94 Ma respectivamente (Nodos 4 y 5). Un evento de separación adicional ocurrió aproximadamente al mismo tiempo, hace 1.96 Ma (Nodo 6), que incluye linajes del centro de Guatemala, Honduras y Nicaragua (linajes N y O; 1.8 Ma, Nodo 8), seguidos de la diferenciación de los linajes de tierras altas (H, I, J, K; 1.3 Ma, Nodo 9) en el altiplano del Bloque Maya y el Arco Volcánico de Centroamérica (Guatemala y Chiapas), separando a éstos de los linajes localizados en las tierras altas del Bloque Chortí al oeste de la Depresión de Honduras (1.18 Ma, Nodo 10).



**Figura 4.** Estimación de los tiempos de divergencia para los 15 linajes (A-O) del grupo *Peromyscus mexicanus* y el grupo externo que incluye a las especies *Habromys* (Ha), *Isthmomys* (Is), *Reithrodontomys* (Re) y *Neotoma* (Ne). Se indican los linajes (A-O) con base en Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015). Los nodos 1-10 corresponden a tiempos estimados que se explican en el texto.

En cuanto a los resultados de los análisis demográficos, las gráficas de diferencias pareadas (distribuciones mismatch) no se ajustaron a ningún modelo de incremento o decremento poblacional (resultados no mostrados). Lo anterior coincide con las pruebas de

neutralidad de Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez (2015), que no fueron significativas para ninguno de los índices. Sin embargo, las tendencias demográficas históricas obtenidas mediante gráficas de líneas en el cielo parecen tener una mejor resolución que las pruebas anteriores, ya que aunque muestran una estabilidad demográfica a largo plazo, permiten observar patrones de incremento o decremento recientes del tamaño poblacional que difieren entre linajes (Fig. 5). Para los linajes C, E, G, H y L, que son de alta montaña o de estratos altitudinales altos, se observa una tendencia a la reducción en el tamaño poblacional durante el Holoceno, aproximadamente en los últimos 25 mil años (último glacial máximo hace ca. 25,000 años). El linaje G es en realidad de mediana altitud (Lagos de Montebello en Chiapas y Quiché en Guatemala) pero se comporta en forma similar a los anteriores, mientras que el linaje H es de los que ocupa las mayores altitudes (cerca de 3,000 msnm) en la Sierra de los Cuchumatanes y Sierra Madre de Chiapas y Guatemala, su población permanece relativamente estable la mayor parte del tiempo, mostrando solo algún signo de ligera disminución reciente. En el caso particular del linaje I, también de alta montaña, se aprecia no un decremento sino un incremento poblacional poco más antiguo, hace aproximadamente 50 mil años. Por el contrario, los linajes D, I y N, que habitan montañas bajas o estratos altitudinales bajos muestran un incremento poblacional aproximadamente durante el mismo periodo (últimos 25 mil años); el linaje M, también de baja montaña, muestra un incremento poblacional mucho más antiguo y sostenido desde hace 600 mil años.



**Figura 5.** Análisis demográficos basados en gráficos de líneas de cielo (Skyline plots) para nueve linajes del grupo *Peromyscus mexicanus*, con escalas de tiempo en millones de años, determinados con BEAST. En color rojo se muestran los linajes de baja montaña y en azul aquellos de media y alta montaña. La línea vertical negra dentro de cada gráfica es una referencia del Último Glacial Máximo (LGM, por sus siglas en inglés) hace 20-25 mil años.

## DISCUSIÓN

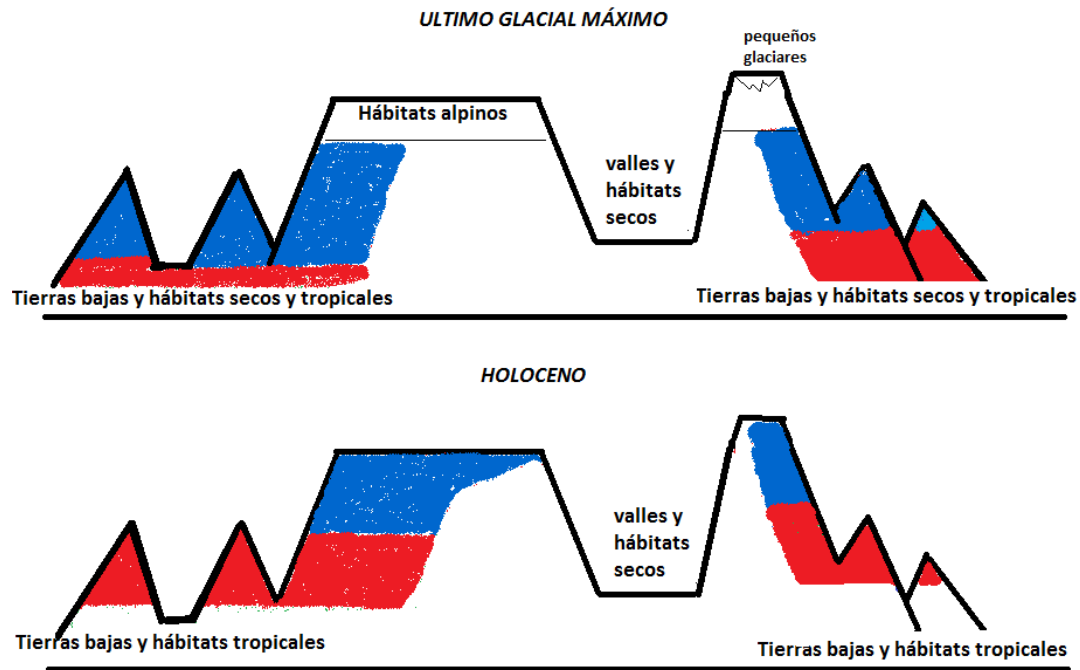
La biota que se distribuye en las montañas del sur de México y Centroamérica representa un sistema ideal para evaluar patrones de diferenciación genética y de historia filogeográfica. En particular para el caso de roedores, existen especies que presentan distribuciones alopátridas, en muchos casos en escalas muy finas, donde en una misma montaña se distribuyen dos especies, una en la parte baja y la otra en altitudes mayores (Patton & Smith 1992, Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). En el presente trabajo estudiamos a los roedores del grupo *Peromyscus mexicanus* del Núcleo de Centroamérica, grupo que está diferenciado en 15 linajes mitocondriales (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). Nuestros resultados muestran que los nueve linajes que se distribuyen en las montañas de la región presentan patrones filogeográficos distintos, donde los ciclos climáticos de las glaciaciones del Pleistoceno afectaron a los linajes de alta y baja montaña de manera diferencial. Los patrones filogeográficos que presentan es el típico de especies y poblaciones en alopatría de la biota de montaña, de linajes mitocondriales diferenciados, con una estructura genética significativa y limitado flujo génico (Avice 2000). Dichos patrones están asociados también con la diversidad de microclimas y a la complejidad fisiográfica e histórica que caracteriza las zonas montañosas de la región (Cadena *et al.* 2012).

La filogenia obtenida con el gen nuclear mostró poca resolución y concordancia respecto a los linajes mitocondriales. Dicho gen ha mostrado ser adecuado para el género *Peromyscus*, como lo muestran Castañeda-Rico *et al.* (2014) en su estudio filogenético del grupo de *Peromyscus melanophrys*. En nuestro caso cabe suponer que la diversificación entre linajes es más reciente de la que puede determinarse a nivel nuclear.

Las estimaciones de los tiempos de divergencia sugieren que el ancestro del grupo *Peromyscus mexicanus* habitó la región hace aproximadamente 4 millones de años, durante el Plioceno medio y tardío y el Óptimo Termal del Plioceno Medio, cuando los climas tropicales dominaban gran parte del sur de Norteamérica. La radiación de los linajes actuales del grupo ocurrió posteriormente, durante el Pleistoceno (hace 2.62 Ma). El origen de los linajes actuales puede apreciarse en los resultados de la red de haplotipos, que muestra al menos cinco ramas principales que se separan de un ancestro hipotético (Fig. 3). Aunque difícil de asociar con una región geográfica en particular, los resultados sugieren que este ancestro mitocondrial probablemente se distribuyó en el Núcleo de Centroamérica, región que actualmente concentra la mayor diversificación del grupo (es decir, la mayoría de sus descendientes y ramas principales).

Este periodo de diversificación del grupo *P. mexicanus* se caracteriza por haber estado dominado por ciclos glaciales e interglaciales, además de la fase principal del llamado Gran Intercambio Biótico Americano (GABI por sus siglas en inglés; Webb 2006, Cody *et al.* 2010). El GABI se desarrolló en forma de pulsos asociados a los ciclos del clima, que afectaron no sólo a los organismos que se dispersaban en la región (de Norteamérica a Sudamérica y viceversa), sino también a aquellos ya establecidos en Centroamérica (Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez 2012). Dada la distribución de los roedores del grupo en bosques húmedos de montaña, las barreras biogeográficas que los afectaron debieron corresponder principalmente a valles secos intermontanos. Los periodos glaciales en Centroamérica tuvieron un efecto de enfriamiento del clima más acentuado en las tierras altas y mayor aridez en las tierras bajas, planicies costeras y valles intermontanos (Bush *et al.* 2009).

Las oscilaciones de temperatura asociados con los ciclos de las glaciaciones afectaron el movimiento de los estratos altitudinales de los hábitats montanos (Mayle *et al.* 2009, Kappelle 1996), así como la distribución de diversas especies de fauna (Yousefi *et al.*). El grupo *P. mexicanus* no fue la excepción, como puede apreciarse en nuestros resultados que exhiben cómo pudo cambiar la distribución de los linajes en diferentes periodos (ciclos). Los cambios de temperatura y humedad, así como del tipo de vegetación y hábitat asociado, que se sucedieron durante los ciclos glaciales e interglaciales ocasionaron el aislamiento de especies y poblaciones junto con las barreras biogeográficas, pero también favorecieron la dispersión y contacto secundario a través de las mismas (Webb 2006) (Figura 6). Esto lo podemos ver para algunos linajes de *P. mexicanus*: el linaje H (*P. guatemalensis sensu stricto*) y el linaje I (*P. guatemalensis sensu lato*) se distribuyen a ambos lados de la barrera formada por los valles y las fallas Motagua-Polochic-Jocotán, el primero localizado en la Sierra de los Cuchumatanes al norte y el segundo al sur de la misma barrera en las tierras altas de la Sierra Madre en Chiapas y Guatemala. Estos linajes ocupan los bosques mesófilos de mayor altura (ca. 2500 a 3400 m), pero donde los límites (valles de Polochic y Motagua) se vuelven difusos, y probablemente hayan existido corredores de bosque de montaña entre las sierras Madre, Cuilco, Cuchumatanes y Chamá. Siguiendo la topografía de las montañas, este corredor puede corresponder a las montañas del área de Motozintla de Mendoza en Chiapas. Otros corredores potenciales podrían corresponder a la zona de Los Chimalapas (entre el centro de México y Centroamérica Nuclear), la zona del Lago de Yohoa en Honduras (entre dos regiones fisiográficas del Bloque Chortí), entre otras.



**Figura 6.** Diferentes escenarios hipotéticos de cambios en la distribución de los linajes de los roedores de montaña entre el último glacial máximo (arriba), hace aproximadamente 25 mil años, y el presente (abajo). Los colores indican diferentes linajes hipotéticos, azul para los de alta montaña, rojo para los de baja montaña.

El patrón de alopatría general asociado a bosques húmedos de montaña sugiere la existencia de cierto conservadurismo de nicho, sin embargo las diferencias climáticas regionales y principalmente el patrón secundario de parapatría y segregación altitudinal sugieren también segregación de nicho (Kalkvik et al. 2012), lo que agrega un grado de complejidad adicional a la historia evolutiva del grupo. Los requerimientos ecológicos y las diferencias en la capacidad de dispersión de los diferentes linajes parecen tener un efecto preponderante en los patrones genéticos y filogeográficos observados. La especialización a nichos climáticos específicos produce patrones de distribución parapátrida secundaria (estratificación altitudinal) que requiere del planteamiento de hipótesis y explicaciones históricas. Debido a que no hay una clara correspondencia entre las ramas principales de haplotipos y los hábitos de alta o baja montaña, los datos sugieren que la colonización de las montañas bajas desde mayores altitudes o vice versa, ha ocurrido repetidas veces durante el Pleistoceno, cuando el clima de la tierra se enfriaba gradualmente y se acentuaban los ciclos de las glaciaciones (Cronin, 2010). Por ejemplo, eventos de “colonización o divergencia” en las



tierras altas pudieron ocurrir cuando el linaje A (*P. nudipes*) se estableció hace aproximadamente 1.92 Ma en la Sierra de Tamanca y, posteriormente, el linaje C (*P. mexicanus*) se estableció en el Centro de México al norte del Istmo de Tehuantepec hace aproximadamente 1.3 Ma. De igual manera, el efecto vicariante del Istmo de Tehuantepec y la Depresión de Nicaragua parece haber ocurrido en varias ocasiones, desde la diferenciación temprana de los peromiscinos hasta la diferenciación al interior del grupo.

Las variaciones en el nicho climático sugieren la existencia de distintos patrones filogeográficos. Como se mencionó anteriormente, durante los ciclos glaciales e interglaciales los linajes de montaña pudieron incrementar o disminuir sus áreas de distribución, lo cual dependía también de su asociación a hábitats de montaña específicos, en general de alta o baja montaña. Este proceso debió tener un efecto diferencial en las fluctuaciones de los tamaños poblacionales. Esto es, es probable que durante los períodos glaciales los linajes de tierras altas descendieran a altitudes menores, y lo contrario durante los períodos interglaciales (Yousefi *et al.* 2015), pudiendo respectivamente incrementar y reducir su área de distribución así como el tamaño poblacional. Existen escasas evidencias de los efectos genéticos y poblacionales de los cambios altitudinales en las historias evolutivas de las especies, como en el caso de árboles de las montañas de Australia (Mellick, Wilson & Rossetto 2014) o un ave de montaña en los Himalayas (Qu *et al.* 2011), en ambos casos se cree que la complejidad topográfica de las áreas produce patrones distintos. Este fenómeno ha sido menos estudiado que los efectos de expansión horizontal en regiones más templadas. Sin embargo, los resultados demográficos de gráficas de cielo para el grupo *P. mexicanus* en el sur de México y norte de Centroamérica apoyan esta predicción, donde se muestra una reciente disminución del tamaño poblacional para aquellos linajes de tierras altas, como C (*P. mexicanus sensu stricto*) del centro de México (Veracruz e Hidalgo), E y G (*P. zarhynchus sensu lato*) de Chiapas y Guatemala, así como los linajes H y L (*P. guatemalensis sensu lato*), de los estratos altos en el occidente de Guatemala, que muestran un comportamiento ligeramente distinto, con un incremento poblacional ligero y constante en los últimos 100 mil años y, más recientemente, con signos de cierta disminución poblacional. Durante las glaciaciones estos linajes pudieron verse favorecidos por la ocupación de tierras de menor altitud, mientras que al terminar la glaciación, se dispersaron hacia sus hábitat característicos de zonas de alta montaña, los cuales se vieron fuertemente disminuidos; es más, los hábitat alpinos como los de la meseta de los Cuchumatanes, actualmente casi desaparecieron en Centroamérica.

El patrón demográfico observado para los linajes distribuidos en altitudes bajas, con incrementos poblacionales hacia el presente, puede estar también asociado con aspectos

climáticos. Durante el Holoceno, un incremento generalizado de la temperatura y la humedad en Centroamérica (Hillesheim *et al.* 2005) pudo favorecer la expansión de áreas boscosas aledañas en montañas de baja altitud hacia zonas de altitud media, permitiendo la expansión de especies como *P. mexicanus*.

Los datos sugieren entonces una historia evolutiva compleja para el grupo de roedores de montaña *P. mexicanus*, donde interviene una historia geológica y climática compleja determinada por los períodos glaciales del Pleistoceno, así como aspectos ecológicos, principalmente aquellos asociados con los ecosistemas de montaña. Roedores de montaña como los del grupo *P. mexicanus* parece lograron sortear barreras biogeográficas, adaptarse a nuevos ambientes, manteniendo poblaciones estables durante largo tiempo, con patrones de dispersión y diversificación íntimamente asociados a los hábitat específicos a los que están asociados. Dicha especificidad los hace, sin embargo, susceptibles a efectos negativos si, en escalas actuales de tiempo a diferencia de los procesos en escalas históricas, hay una mayor fragmentación de su hábitat, asociados a perturbaciones antropogénicas, o aún por el cambio climático global. Si la tendencia de incremento global de temperatura continúa, es factible que los linajes del estrato altitudinal alto sean negativamente afectados.

## REFERENCIAS

- Awise, JC. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Bagley, JC. & JB Johnson. 2014. Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. *Biological Reviews* 89(4): 767-790.
- Bandelt, H-J, P Forster & A Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.
- Bradley, RD, ND Durish, DS Rogers, JR Miller, MD Engstrom y CW Kilpatrick. 2007. Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome b sequences. *Journal of Mammalogy* 88(5): 1146–1159.
- Bush, MB, AY Corea-metrio, DA Hodell, M Brenner, FS Anselmetti, D Ariztegui, AD Mueller, JH Curtis, DA Grzesik, C Burton & A Gilli. 2009. Re-evaluation of climate change in lowland Central America during the Last Glacial Maximum using new sediment cores from Lake Petén Itzá, Guatemala. Pp. 113-128 en: Vimeux, F, F Silvestre & M Khodri (eds.). *Past Climate Variability in South America and surrounding regions: from the Last Glacial Maximum to the Holocene*. Volume 14. Springer, Francia.
- Cadena, CD, KH Kozak, JP Gómez, JL Parra, CM McCain, RCK Bowie, AC Carnaval, C Moritz, C Rahbek, TE Roberts, NJ Sanders, CJ Schneider, J VanDerWal, KR Zamudio & CH Graham. 2012. Latitude, elevational climatic zonation and speciation in the New World vertebrates. *Proceedings of the Royal Society B* 279(1726): 194-201.

- Castañeda-Rico, S, L León-Paniagua, E Vázquez-Domínguez & AG Navarro-Sigüenza. 2014. Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: The *Peromyscus melanophrys* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70:454-463.
- Cody, S, JE Richardson, V Rull, C Ellis & T Pennington. 2010. The Great American Biotic Interchange revisited. *Ecography* 33(2): 326-332.
- Cronin, TM. 2010. *Paleoclimates, understanding climate change past and present*. Columbia University Press, New York.
- Dawson, WD. 2005. Peromyscine biogeography, Mexican topography and Pleistocene climatology, Cap. 13. Pp. 145-156 en: Sánchez-Cordero V & RA Medellín (eds.). *Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*, 706p. Instituto de Biología, UNAM: Instituto de Ecología, UNAM; CONABIO. México.
- Daza, JM, TA Castoe & CL Parkinson. 2010. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* 33(2): 343-354.
- Drummond, AJ, MA Suchard, D Xie & A Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29(8): 1969-1973.
- Engel, SR., KM Hogan, JF Taylor & SK Davis. 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the South American Sigmodontine Rodents. *Molecular Biology And Evolution* 15(1): 35-49.
- Ersts, PJ. 2015. Geographic Distance Matrix Generator (v. 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation ([http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg)). Accesado el 23 de octubre de 2015.
- Fu, Y & W Li. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics* 133 (3): 693-709.
- Fu, Y. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2): 915-925.
- Guindon, S & O Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5): 696-704.
- Guindon, S, J Dufayard, V Lefort, M Anisimova, W Hordijk & O Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307-321.
- Gutiérrez-García, TA & E Vázquez-Domínguez. 2012. Biogeographically dynamic genetic structure bridging two continents in the monotypic Central American rodent *Ototylomys phyllotis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 107(3): 593-610.
- Gutiérrez-García, TA & E Vázquez-Domínguez. 2013. Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research* 79(3): 311-324.
- Harris, D, DS Rogers & J Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology* 9(12): 2129-2135.
- Hasbún, CR, A Gómez, G Köhler & DH Lunt. 2005. Mitochondrial DNA phylogeography of the Mesoamerican spiny-tailed lizards (*Ctenosaura quinquecarinata* complex): historical biogeography, species status and conservation. *Molecular Ecology* 14(10): 3095-3107.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hillesheim, MB, DA Hodell, BW Leyden, M Brenner, JH Curtis, FS Anselmentti, D Ariztegui, DG Buck, TP Guilderson, MF Rosenmeier & DW Schnurrenberger. 2005. Climate change in lowland Central America during the late deglacial and early Holocene. *Journal of Quaternary Science* 20(4): 363-376.

- Huelsenbeck, JP & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.
- Iturralde-Vinent, MA. 2006. El origen paleogeográfico de la biota de Guatemala. Pp. 1-6 en: Cano, EB. (ed.). *Biodiversidad de Guatemala, Volumen I*. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Centro América.
- Jardón-Barbolla, L, P Delgado-Valerio, G Geada-López, A Vázquez-Lobo & D Piñero. 2011. Phylogeography of *Pinus* subsection *Australes* in the Caribbean Basin. *Annals of Botany* 107: 229-241.
- Jensen, JL, AJ Bohonak, & ST Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Kalkvik, HM, IJ Stout, TJ Doonan & CL Parkinson. 2012. Investigating niche and lineage diversification in widely distributed taxa: phylogeography and ecological niche modeling of the *Peromyscus maniculatus* species group. *Ecography* 35(1): 54-64.
- Kappelle, M. 1996. Los bosques de roble (*Quercus*) de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica: biodiversidad, ecología, conservación y desarrollo. Instituto Nacional de Biodiversidad / Universidad de Amsterdam. Heredia, Costa Rica.
- Kieswetter, CM & CJ Schneider. 2013. Phylogeography in the northern Andes: complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, *Pristimantis w-nigrum* (Craugastoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3): 417-429.
- León-Paniagua, L, AG Navarro-Sigüenza, BE Hernández-Baños & JC Morales. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42(3): 653-664.
- Lindsay, EH. 1972. Small mammal fossils from the Barstow Formation. *University of California Publications in Geological Sciences* 93: 1-104.
- Lindsay, EH. 1995. *Copemys* and the Barstovian/Hemingfordian boundary. *Journal of Vertebrate Paleontology* 15(2): 357-365.
- Mayle, FE., MJ. Burn, M Power & DH. Urrego. 2009. Chapter 4: Vegetation and fire at the Last Glacial Maximum in tropical South America. Pp. 89-112 en: Vimeux, F, F Sylvestre & M Khodri (eds.). *Past climate variability in South America and surrounding regions*. *Developments in Paleoenvironmental Research* 14, DOI 10.1007/978-90-481-2672-9\_4
- Mellick, R, PD Wilson & M Rossetto. 2014. Demographic history and niche conservatism of tropical trees separated along an altitudinal gradient of a biogeographic barrier. *Australian Journal of Botany* 62(5): 438-450.
- Moscarella, RA. 2011. Dissecting the geographical expansion of *Peromyscus leucopus* in the Northern Great Lakes: insights from genetics, morphometrics and ecology. Tesis de doctorado, Michigan State University.
- Musser, GG. & MD Carleton. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894-1531 en: DE Wilson y D Reeder. *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*, Third edition, Volume 2. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Navarro-Sigüenza, AG, AT Peterson, A Nyari, GM. García-Deras & J García-Moreno. 2008. Phylogeography of the Buarremon brush-finch complex (*Avex*, Emberizidae) in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47(1): 21-35.
- Ornelas, JF, E Ruiz-Sánchez & V Sosa. 2010. Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre-Quaternary relicts in northern Mesoamerican cloud forests. *Journal of Biogeography* 37(12): 2384-2396.

- Ornelas, JF, V Sosa, DE Soltis, JM Daza, C González, PS Soltis, C Gutiérrez-Rodríguez, AE de los Monteros, TA Castoe, CB & E Ruiz-Sanchez. 2013. Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of northern Mesoamerica. *Plos One* 8(2): 1-11.
- Patton, JL & MF Smith. 1992. MtDNA phylogeny of Andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46(1): 174-183.
- Pérez-Consuegra, SG & E Vázquez-Domínguez. 2015. Mitochondrial diversification of the *Peromyscus mexicanus* species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53(4): 300-311.
- Pringle, EG, SR Ramírez, TC Bonebrake, DM Gordon & R Dirzo. 2012. Diversification and phylogeographic structure in widespread Azteca plant-ants from the northern Neotropics. *Molecular Ecology* 21(14): 3576-3592.
- Qu, Y, X Luo, R Zhang, G Song, F Zou & F Lei. 2011. Lineage diversification and historical demography of a montane bird *Garrulax elliotii* – implications for the Pleistocene evolutionary history of the eastern Himalayas. *BMC Evolutionary Biology* 11: 174.
- Rambaut, A. 2013. FigTree [Online]. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A. y AJ Drummond. 2007. Tracer v1.4, Disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramírez-Barahona, S & LE Eguiarte. 2013. The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology and Evolution* 3(3): 725-738.
- Roberts, DR & A Hamann. 2015. Glacial refugia and modern genetic diversity of 22 western North American tree species. *Proceedings of the Royal Society B* 282: 20142903.
- Rovito, SM, CR Vázquez-Almazán, TJ Papenfuss, G Parra-Olea & DB Wake. 2015. Biogeography and evolution of Central American cloud forest salamanders (Caudata: Plethodontidae: *Cryptotriton*), with the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 175(1): 150-156.
- Rozas, J, JC Sánchez-DelBarrio, X Messenguer & R Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19(18): 2496-2597.
- Ruiz-Sánchez, E & JF Ornelas. 2014. Phylogeography of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) in Mesoamerica: survivors of Neogene widespread temperate forest (or cloud forest) in North America?. *Ecology and Evolution* 4(4): 311-328.
- Schuchert, C. 1935. Historical geology of the Antillean-Caribbean region, or the lands bordering the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Suárez-Atilano, M, F Burbrink & E Vázquez-Domínguez. 2014. Phylogeographical structure within *Boa constrictor* imperator across the lowlands and mountains of Central America and Mexico. *Journal of Biogeography* 41(12): 2371-2384.
- Sullivan, J, JA Markert & CW Kilpatrick. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46(3): 426-440.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3): 585-595.
- Webb, SD, 2006. The Great American Biotic Interchange: patterns and processes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93(2): 245-257.
- Weir, JT, E Bermingham, MJ Miller, J Klicka & MA González. 2008. Phylogeography of a morphologically diverse Neotropical mountain species, the Common Brush-Tanager (*Chlorospingus aphthalmicus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 650-664.

- Willis, CG, BF Franzone, Z Xi & CC Davis. 2014. The establishment of Central American migratory corridors and the biogeographic origins of seasonally dry tropical forests in Mexico. *Frontiers in Genetics* 5(433): 1-14.
- Yousefi, M, M Ahmadi, E Nourani, R Behrooz, M Rajabizadeh, P Geniez & M Kaboli. 2015. Upward altitudinal shifts in habitat suitability of mountain vipers since the Last Glacial Maximum. *PLoS ONE* 10(9): e0138087. doi:10.1371/journal.pone.0138087.
- Yule, GU. 1925. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character* 213: 21-87.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES**

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

### Historia evolutiva, estructura genética y distribución de los linajes

Las regiones de montaña son reconocidas como motores naturales de evolución, asociado con la gran diversidad de microclimas existentes. Esto parece ser particularmente cierto en el sur de México y Centroamérica, ya que esta zona presenta una historia geológica y climática altamente compleja (Iturralde-Vinent 2006, Gutierrez-García & Vázquez-Domínguez 20013).

Los neotomino-peromiscinos son un grupo de ratones que habitan exclusivamente en Norteamérica, de entre los cuales el grupo *Peromyscus mexicanus* se distribuye en la parte más meridional y tropical de este continente, en el sur de México y Centroamérica (Musser & Carleton 2005). *Peromyscus mexicanus* es un grupo monofilético y conformado por especies que habitan bosques húmedos de montaña, principalmente bosques nubosos, frecuentemente asociados a robledales y otras plantas típicas de estas regiones, siendo menos comunes en bosques dominados por coníferas. Estos ratones son de los representantes de mayor tamaño corporal del género *Peromyscus*. Tradicionalmente se incluían seis especies en el grupo: *P. mexicanus*, *P. nudipes*, *P. gymnotis*, *P. guatemalensis*, *P. grandis* y *P. zarhynchus*, sin embargo, los datos mitocondriales muestran una estructura genética profunda y más compleja que no corresponde en su totalidad con la taxonomía tradicional (Pérez-Consuegra & Vázquez-Domínguez 2015). En particular, la estructura y variación genética mitocondrial no se asocian con un modelo de aislamiento por distancia como se hipotetizaba, sino que están fuertemente asociadas a las regiones fisiográficas donde se distribuyen las especies del grupo. Así, se distinguen al menos 15 linajes mitocondriales que presentan distancias genéticas de entre 3 y 8%, valores que son frecuentes para marcadores mitocondriales entre especies hermanas de otros grupos de *Peromyscus* (Baker & Bradley 2006).

Los datos moleculares sugieren además que el grupo divergió de otros peromiscinos cercanos a finales del Plioceno, durante la formación de los principales elementos fisiográficos de Centroamérica (Pérez-Consuegra et al., en prep.). Los cambios geológicos y climáticos del Mioceno-Plioceno parecen haber jugado un papel preponderante en la radiación de los peromiscinos ancestrales, pero la historia evolutiva más temprana del grupo todavía no ha sido resuelta, ni su relación con otros linajes de peromiscinos hermanos, especialmente con los grupos *megalops* (centro de México), *furvus* (centro de México y un relictos en Guatemala), *aztecus* (ampliamente distribuido en el sur de México y norte de Centroamérica), con los géneros *Isthmomys* (del sur de Centroamérica) y *Habromys* (del centro de México, Guatemala y El Salvador), así como con las especies de tierras bajas *P. yucatanicus* (Península de Yucatán)



y *P. stirtoni* (valles secos de Centroamérica). La hipótesis de que el origen del grupo *P. mexicanus* fue en el centro de México y que posteriormente se dispersaron hacia el sur no se soporta con la información mitocondrial existente. Por el contrario, sugiere que los ancestros del grupo *P. mexicanus* se distribuyeron en toda la región incluso antes de divergir de los grupos hermanos cercanos, y cuya evolución estuvo aparejada a los cambios orogénicos de las montañas donde se distribuyen (Pérez-Consuegra et al., en prep.).

La diversificación de los linajes modernos parece haber ocurrido posteriormente, a finales del Plioceno pero principalmente durante el Pleistoceno. Entre los principales motores evolutivos que se atribuye determinaron la divergencia del grupo *P. mexicanus* podemos mencionar los procesos climáticos y bióticos, cuando ocurrió la fase principal del llamado “Gran Intercambio Biótico Americano”, serie de “pulsos” que afectaron a los organismos migrantes como a los locales. Estos pulsos, asociados a los ciclos glaciales e interglaciales, generaron grandes cambios ambientales y periódicos en la mayoría de los ecosistemas y en un sinnúmero de especies (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez 2013). Por ejemplo, en Costa Rica se ha reportado evidencia de variaciones altitudinales de los bosques nubosos, mientras que en la planicie de Petén en Guatemala, hubo cambios en la vegetación de sabanas y bosques de roble a bosques húmedos tropicales desde el último ciclo glacial hasta el Holoceno. El clima cambiante del Pleistoceno parece haber tenido profundos efectos en la distribución y estructura genética del grupo *P. mexicanus*, que se evidencia en la distribución alopátrida de todas sus especies, resultado de periodos de aislamiento, y en la gran diversidad de linajes que lo conforman (Pérez-Consuegra y Vázquez-Domínguez 2015).

El patrón de distribución alopátrida es congruente con las regiones fisiográficas del sur de México y Centroamérica, así como con la existencia de una serie de barreras biogeográficas que parecen determinar discontinuidades en los datos genéticos. Las barreras identificadas son, ordenadas de norte a sur: el Istmo de Tehuantepec, la Depresión Central de Chiapas, el Valle del Polochic, el Valle del Motagua, la Depresión Central de Honduras y la Depresión de Nicaragua; así como otra serie de barreras de aparente menor importancia pero que también ayudan a explicar la estructura genética del grupo: Cañón del Sumidero, Río Ixcán, Río Chixoy, la Falla de Jocotán-Jalpatagua, etc. Sin embargo, la filogenia mitocondrial sugiere una estructura genética aún más compleja, principalmente en aquellas zonas con escasa o nula cobertura geográfica del estudio, como Oaxaca, Nicaragua y Costa Rica, y hace suponer una mayor variedad de barreras biogeográficas que han operado para moldear la estructura genética del grupo.

Cabe resaltar, sin embargo, que la congruencia fisiográfica no es perfecta, ya que en algunos sitios se observan valores de distancia genética menores de lo esperado a ambos lados de una barrera, hecho que sugiere la existencia en el presente y/o el pasado de corredores biológicos que permitieron el flujo génico ocasional entre regiones y linajes, lugares que merecen ser estudiados con mayor detalle en el futuro. Ejemplo de estos potenciales corredores donde se observaron distancias genéticas menores a lo esperado resultado de barreras, son el área de los Chimalapas (Istmo de Tehuantepec: Oaxaca-Chiapas) como puente entre el Núcleo de Centroamérica y el centro de México, el área de Motozintla de Mendoza (Chiapas) y la Sierra de Cuilco (Guatemala) como potencial conexión entre los bloques Maya y Chortí, los alrededores del Lago de Yohoa (Honduras) como potencial conexión entre la Plataforma Central y las Tierras Altas, ambas del Bloque Chortí, y la Cordillera de Yolaina en el sureste de Nicaragua, como posible corredor intermitente entre el Núcleo de Centroamérica y el Bloque Chorotega. Estas zonas podrían ser las responsables de los patrones filogenéticos y filogeográficos no claramente definidos.

### **Segregación altitudinal y modelo de especiación del grupo *Peromyscus mexicanus***

La estructura genética profunda concuerda con un modelo general de especiación alopátrida para todo el grupo *P. mexicanus*. Pero es interesante resaltar que existe también un patrón secundario de distribución parapátrida, esto es algunos linajes comparten la misma montaña, segregándose altitudinalmente, patrón que se presenta en el centro de México, los Altos de Chiapas, la Sierra Madre del sur de Chiapas y Guatemala y en la Sierra de Talamanca, entre otras, a juzgar por la distribución de los linajes mitocondriales. En la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala los linajes de "alta montaña" son hermanos cercanos, y lo mismo ocurre con los linajes de baja montaña, congruentes con el modelo de especiación alopátrida. Sin embargo la red de haplotipos sugiere que eventualmente ocurren cambios del hábito de alta a baja montaña o viceversa, congruente con el modelo de especiación parapátrica. Los resultados observados sugieren que este fenómeno ha ocurrido repetidas veces durante la radiación del grupo. Si en realidad esto ocurrió primero en una fase de alopatría y posterior parapatría, o si la diferenciación fue desde el primer momento en parapatría, es un tema que requiere ser estudiado con más detalle, para éste y otros grupos representantes de la biota de montaña (Pérez-Consuegra y Vázquez-Domínguez 2015 y Capítulo 3 de esta tesis).

El contacto posterior de los linajes después de eventos vicariantes prolongados pudo favorecer la segregación altitudinal y procesos de adaptación local, tal como se observa en la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala. En este lugar los linajes H (*P. guatemalensis*) y G

(*P. zarhynchus sensu lato*) comparten la misma montaña pero están segregados altitudinalmente y se distinguen en sus medidas morfométricas, principalmente en aquellas asociadas a la mandíbula, lo que sugiere algunas diferencias en sus hábitos alimenticios. La adaptación a condiciones de alta o baja montaña también pudo haber ocurrido en varias ocasiones y en múltiples linajes, como se observa en la red de haplotipos. Un caso distinto de diferenciación altitudinal, pero en este caso de dos linajes hermanos en alopatría lo observamos en la más reciente diferenciación de los linajes M (este de Guatemala, El Salvador y suroeste de Honduras), en su mayoría en montañas de baja altitud, y el linaje L (Sierra Madre del centro de Guatemala) de macizos montañosos relativamente más altos. En la red de haplotipos el linaje L aparece cercanamente anidado en M, contrario a lo que se esperaría si se considera la variación relacionada con la distancia geográfica (M anidado en L). La segregación de estos dos linajes ocurrió hace poco más de un millón de años y son una excepción a la constante de los linajes del grupo que muestran monofilia recíproca. El linaje L, aparentemente más reciente, nos hace pensar en la probable extinción ocasional de linajes y su reemplazo y colonización de las áreas por linajes cercanos.

### **Diferenciación morfológica y formas crípticas**

El modelo de especiación alopatrida o por vicarianza es entonces el más probable y generalizado para el grupo *mexicanus*. El modelo de especiación alopatrida plantea, entre otras cosas, el problema frecuente de ausencia de diferenciación morfológica entre linajes, es decir presencia de especies crípticas. Ello puede observarse muy bien en el grupo *mexicanus*. El análisis morfométrico de medidas craneales mostró una alta congruencia entre la información filogenética mitocondrial y las medidas morfométricas, lo que es indicativo de una buena señal filogenética. Asimismo, se observaron tanto diferencias morfológicas significativas en el espacio multivariado del grupo y entre pares particulares, como un alto grado de traslape en los vectores multivariados de algunos linajes no cercanamente emparentados. Es decir, existen especies crípticas en el grupo *P. mexicanus*. Este patrón de especies crípticas ha sido el principal origen de las incertidumbres taxonómicas que por más de un siglo han caracterizado a los roedores del género, por ello la importancia de una nueva revisión taxonómica. Los resultados del análisis de discriminantes muestran que las variaciones morfológicas asociadas a la mandíbula y maxilar superior fueron de las más significativas, lo que sugiere posible adaptación a condiciones alimenticias particulares de cada montaña. Sin duda se requiere de profundizar en la búsqueda de caracteres morfológicos y de otra índole que ayuden a distinguir las especies.

### **Historias filogeográficas contrastantes del Pleistoceno-Holoceno**

La existencia de linajes adaptados a condiciones distintas sugiere también que deben ser resultado de historias filogeográficas distintas. La mayoría de los linajes del grupo mostraron patrones demográficos estables, es decir con tamaños poblacionales históricos relativamente constantes. De manera interesante también, se observaron historias demográficas contrastantes recientes. Durante el Holoceno, los linajes de baja montaña mostraron un incremento del tamaño poblacional, mientras que los linajes de alta montaña muestran lo contrario, tendencia de reducción del tamaño histórico. Los linajes de baja montaña podrían haber sido favorecidos por el incremento generalizado de la precipitación en Centroamérica durante el Holoceno (Hillesheim *et al.* 2005), que se asocian con un incremento de las áreas de bosque húmedo de montaña de baja altitud. Estos linajes pudieron además colonizar nuevas áreas de mayor altitud, pudiendo ampliar sus áreas de distribución. Los linajes de alta montaña parecen haber migrado hacia áreas de mayor altitud, con la consiguiente reducción de su área de distribución, que puede apreciarse en la contracción del tamaño poblacional durante el Holoceno. La principal excepción a este patrón son los linajes que actualmente ocupan las mayores altitudes tanto en la Sierra de los Cuchumatanes (H) como en la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala (I), que no presentan señal de disminución poblacional tan evidente, lo cual puede estar asociado a que colonizaron cumbres en las que, antes del último glacial, predominaban hábitats alpinos e incluso con pequeños glaciares como en la Sierra de los Cuchumatanes (Lachniet 2004).

### **Consideraciones finales**

Los resultados filogenéticos, morfométricos y filogeográficos en conjunto sugieren que los linajes del grupo *Peromyscus mexicanus* representan verdaderas unidades evolutivas independientes, razón por la cual requieren de un reconocimiento taxonómico adecuado. El presente trabajo no se enfocó en la taxonomía del grupo, sino en mejorar nuestro conocimiento de su historia evolutiva. Aunque es sin duda necesario realizar estudios más exhaustivos de cada linaje, incluyendo su morfología externa, con este trabajo fue posible iniciar su reordenamiento taxonómico, al revivir tres nombres de especies en desuso, que anteriormente se consideraban sinónimos de *P. mexicanus*, siguiendo las reglas y criterios de la nomenclatura taxonómica. Aunque el estudio trató de tener la mayor cobertura geográfica posible, quedaron algunas regiones poco representadas y la filogenia recuperada nos sugiere una mayor estructura genética que la aquí presentada, sobre todo en áreas en los alrededores del Istmo de

Tehuantepec, Honduras, Nicaragua y Costa Rica. También es importante incrementar el número de montañas representadas y número de ejemplares de los linajes ya identificados, lo que mejorará el entendimiento de su diversidad e historia evolutiva.

Los datos proporcionados en este trabajo pueden también ser útiles en estudios sobre otros aspectos biológicos de relevancia. Nada sabemos actualmente sobre la competencia o exclusión de nicho que potencialmente ocurre en las estrechas zonas de simpatria, o sobre la potencial hibridación entre linajes diferentes (sugerido por una estructura más somera en el gen nuclear estudiado). Asimismo, conocemos poco sobre las tasas de extinción de linajes en el pasado o sobre los efectos que tendrán el cambio climático y la mayor fragmentación de hábitat sobre dichos linajes en el futuro. Se espera que un mayor desarrollo de las técnicas moleculares, especialmente en genómica y sistemas de información geográfica, ayuden a esclarecer los mecanismos particulares que operan en la evolución de este maravilloso grupo de organismos.

## **Referencias (de introducción, discusión y conclusiones generales)**

- Baker, R.J. & R.D. Bradley. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy* 87(4): 643-662.
- Bradley, R.D., N.D. Durish, D.S. Rogers, J.R. Miller, M.D. Engstrom & C.W. Kilpatrick. 2007. Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome b sequences. *Journal of Mammalogy* 88(5): 1146-1159.
- Dawson, W.D. 2005. Peromyscine biogeography, Mexican topography and Pleistocene climatology. Pp. 145-156, En: V. Sánchez-Cordero & R. A. Medellín (eds.). *Contribuciones Mastozoológicas en Homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología/ Instituto de Ecología/CONABIO. México, D.F.
- Daza, J.M., T.A. Castoe & C.L. Parkinson. 2010. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* 33(2): 343-354.
- Flores, O. & I. Goyenechea. 2001. A comparison of hypotheses of historical biogeography for Mexico and Central America, or in search of the lost pattern. Pp. 171-181 en: J. Johnson, R. Webb & O. Flores-Villela (eds.), *Mesoamerican herpetology: systematics, zoogeography, and conservation*. The University of Texas at El Paso, El Paso, Texas.
- Gutiérrez-García, T.A. & E. Vázquez-Domínguez. 2013. Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research* 79(3): 311-324.
- Hillesheim, M.B., D.A. Hodell, B.W. Leyden, M. Brenner, J.H. Curtis, F.S. Anselmentti, D. Ariztegui, D.G. Buck, T.P. Guilderson, M.F. Rosenmeier & D.W. Schnurrenberger. 2005. Climate change in lowland Central America during the late deglacial and early Holocene. *Journal of Quaternary Science* 20(4): 363-376.
- Huckaby, D. 1980. Species limits in the *Peromyscus mexicanus* Group (Mammalia: Rodentia: Muroidea). *Contributions in Science of the Natural History, Museum of Los Angeles County* 326.

- Iturralde-Vinent, MA. 2006. El origen paleogeográfico de la biota de Guatemala. Pp. 1-6 en: Cano, Enio B, Biodiversidad de Guatemala, Volumen I. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, C.A.
- James, KH 2012. Chapter 11, structural geology: from local elements to regional synthesis. Pp. 277-322 en: Bundschuh, J & GE Alvarado (eds.), Central America: geology, resources and hazards. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Lachniet, MS. 2004. Late Quaternary glaciation of Costa Rica and Guatemala, Central America. Pp. 135-138 en: Ehlers, J & P. L. Gibbard (eds.). Quaternary glaciations extent and chronology, Part III: South America, Asia, Africa, Australasia, Antarctica. Developments in Quaternary Science 2. Series editor: Jim Rose. Elsevier, Amsterdam.
- Lorenzo, C. & M. García. 2007. Sistemática y conservación de mamíferos de Chiapas. Pp. 47-57 en: Sánchez-Rojas, G & A. Rojas-Martínez (eds.). Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Musser, GG & MD Carleton. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894-1531 en: Wilson, DE & D Reeder (eds.). Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference, third edition, volumen 2. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Pérez-Consuegra, SG. & E Vázquez-Domínguez. 2015. Mitochondrial diversification of the *Peromyscus mexicanus* species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 53(4): 300-311.
- Rogers, DS & MD Engstrom . 1992. Evolutionary implications of allozymic variation in tropical *Peromyscus* of the *mexicanus* species group. Journal of Mammalogy 73(1): 55-59.
- Smith, S., R. Bradley & I. Geenbaum. 1986. Karyotypic conservatism in the *Peromyscus mexicanus* species group. Journal of Mammalogy 67(3):584-586.
- Smith, S, R Bradley & I Geenbaum. 1986. Karyotypic conservatism in the *Peromyscus mexicanus* species group. Journal of Mammalogy 67(3):584-586.

## **ANEXOS**

**Anexo 1: Información suplementaria del Capítulo 1**  
**Mitochondrial diversification of the mountainous mice of the *Peromyscus mexicanus* species group in Nuclear Central America: biogeographic and taxonomic implications**

Table S1. Genetic distance values, p-uncorrected (above diagonal) and K2P (below diagonal), between the *Peromyscus mexicanus* group clades (I-IV; see Fig. 2) and outgroup species from Nuclear Central America. The thin line separates values for the external and internal group comparisons. Outgroup species are EGa – *Calomyscus*, EGb – *Neotoma*, EGc – *Reithrodontomys* and EGd – *Habromys*.

	EGa	EGb	EGc	EGd	I	II	III	IV
EGa		0.203	0.197	0.211	0.190	0.192	0.204	0.190
EGb	0.237		0.176	0.178	0.158	0.167	0.162	0.168
EGc	0.229	0.203		0.170	0.150	0.155	0.160	0.160
EGd	0.251	0.206	0.197		0.145	0.145	0.139	0.140
I	0.221	0.180	0.170	0.165		0.100	0.097	0.086
II	0.224	0.177	0.177	0.161	0.110		0.097	0.095
III	0.240	0.184	0.184	0.158	0.099	0.106		0.089
IV	0.221	0.192	0.183	0.169	0.094	0.104	0.096	



Table S2. Genetic distance values ( $p$  unrounded) between the *Peromyscus mexicanus* group lineages (A-G, following Table 1) and outgroup species from Nuclear Central America. Lineages are described in Table 1. The line separates values for the external and internal group comparisons. Outgroup species are: EGb = *Calyptorhina*, EGe = *Neotoma*, EGc = *Reithrodontomys* and EGi = *Habronyctes*. The highest and lowest distance values are in bold.

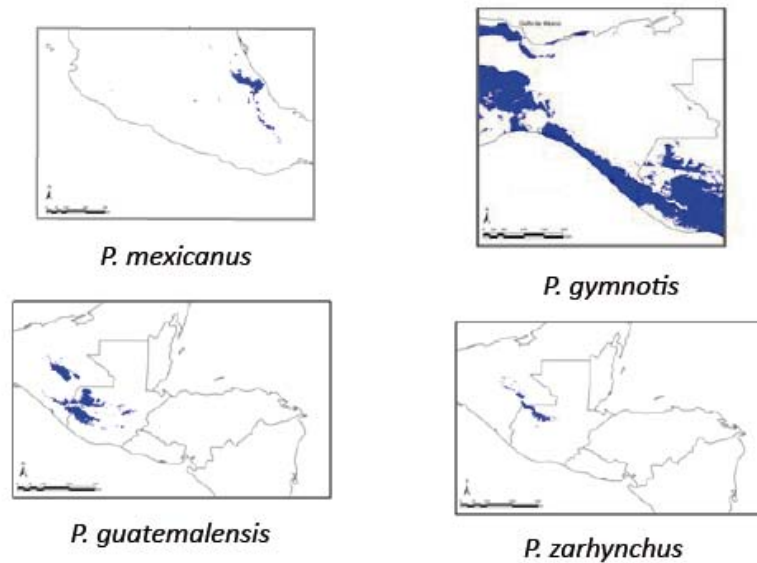
Day	FCa	FCb	FCc	FCd	A	B	C	D	F	F	G	H	I	J	K	L	M	N
<b>EGa</b>																		
EGb	0.201																	
EGc	0.195	0.177																
EGd	0.213	0.177	0.159															
A	0.192	0.163	0.149	0.145														
B	0.142	0.161	0.150	0.142	0.095													
C	0.208	0.159	0.155	0.115	0.071	0.083												
D	0.205	0.165	0.159	0.157	0.097	0.089	0.071											
F	0.196	0.156	0.150	0.135	0.090	0.087	0.077	0.065										
F	0.197	0.177	0.155	0.141	0.092	0.098	0.076	0.065	0.045									
G	0.194	0.177	0.156	0.143	0.092	0.099	0.084	0.095	0.043	0.030								
H	0.195	0.175	0.153	0.113	0.079	0.087	0.076	0.081	0.081	0.085	0.060							
I	0.195	0.174	0.153	0.118	0.085	0.089	0.087	0.081	0.083	0.090	0.090	0.064						
J	0.196	0.160	0.153	0.145	0.096	0.088	0.082	0.084	0.080	0.078	0.085	0.037	0.034					
K	0.194	0.160	0.154	0.142	0.087	0.093	0.083	0.084	0.081	0.083	0.087	0.030	0.041					
L	0.188	0.160	0.161	0.119	0.071	0.091	0.083	0.083	0.079	0.083	0.080	0.041	0.041	0.040	0.019			
M	0.191	0.160	0.160	0.150	0.077	0.083	0.081	0.081	0.079	0.080	0.087	0.042	0.041	0.040	0.021	0.021		
N	0.191	0.164	0.148	0.147	0.094	0.088	0.085	0.084	0.085	0.084	0.088	0.055	0.054	0.051	0.052	0.053	0.050	
O	0.191	0.165	0.158	0.157	0.098	0.093	0.082	0.087	0.070	0.078	0.070	0.052	0.055	0.051	0.070	0.054	0.050	0.054

Table S3. Genetic distance values (K2P) between the *Peromyscus mexicanus* group lineages (A-G, following Table 1) and outgroup species from Nuclear Central America. Lineages are described in Table 1. The line separates values for the external and internal group comparisons. Outgroup species are: EGb = *Calyptorhina*, EGL = *Neotoma*, EGe = *Reithrodontomys* and EGi = *Habronyctes*. The highest and lowest  $D_{ext}$  and  $D_{int}$  values are in bold.

$D_{ext}$	$D_{int}$	EGa	EGb	EGc	EGd	A	B	C	D	L	I	G	H	I	J	K	L	M	N
<b>EGa</b>																			
EGb	0.258																		
EGc	0.227	0.201																	
EGd	0.252	0.201	0.198																
A	0.201	0.182	0.185	0.181															
B	0.221	0.182	0.171	0.161	0.105														
C	0.246	0.181	0.181	0.163	0.083	0.102													
D	0.238	0.180	0.183	0.154	0.104	0.107	0.084												
E	0.227	0.202	0.171	0.152	0.090	0.107	0.095	0.102											
F	0.230	0.200	0.179	0.156	0.090	0.108	0.093	0.100	0.040										
G	0.225	0.201	0.179	0.156	0.102	0.107	0.095	0.104	0.044	0.045									
H	0.224	0.201	0.162	0.162	0.037	0.105	0.093	0.090	0.090	0.090	0.090								
I	0.224	0.200	0.162	0.166	0.090	0.095	0.101	0.090	0.099	0.099	0.090	0.035							
J	0.220	0.194	0.170	0.166	0.090	0.096	0.093	0.093	0.095	0.090	0.090	0.037	0.034						
K	0.224	0.194	0.170	0.162	0.090	0.101	0.093	0.100	0.095	0.095	0.094	0.044	0.040	0.041					
L	0.210	0.180	0.160	0.166	0.071	0.102	0.096	0.099	0.097	0.099	0.090	0.044	0.040	0.046	0.049				
M	0.220	0.167	0.164	0.177	0.035	0.100	0.096	0.101	0.096	0.094	0.094	0.041	0.041	0.040	0.033	0.030			
N	0.220	0.180	0.160	0.166	0.091	0.105	0.101	0.100	0.099	0.099	0.090	0.057	0.056	0.055	0.064	0.058	0.056		
O	0.222	0.192	0.179	0.162	0.103	0.100	0.099	0.102	0.099	0.093	0.094	0.060	0.067	0.061	0.074	0.065	0.063	0.069	

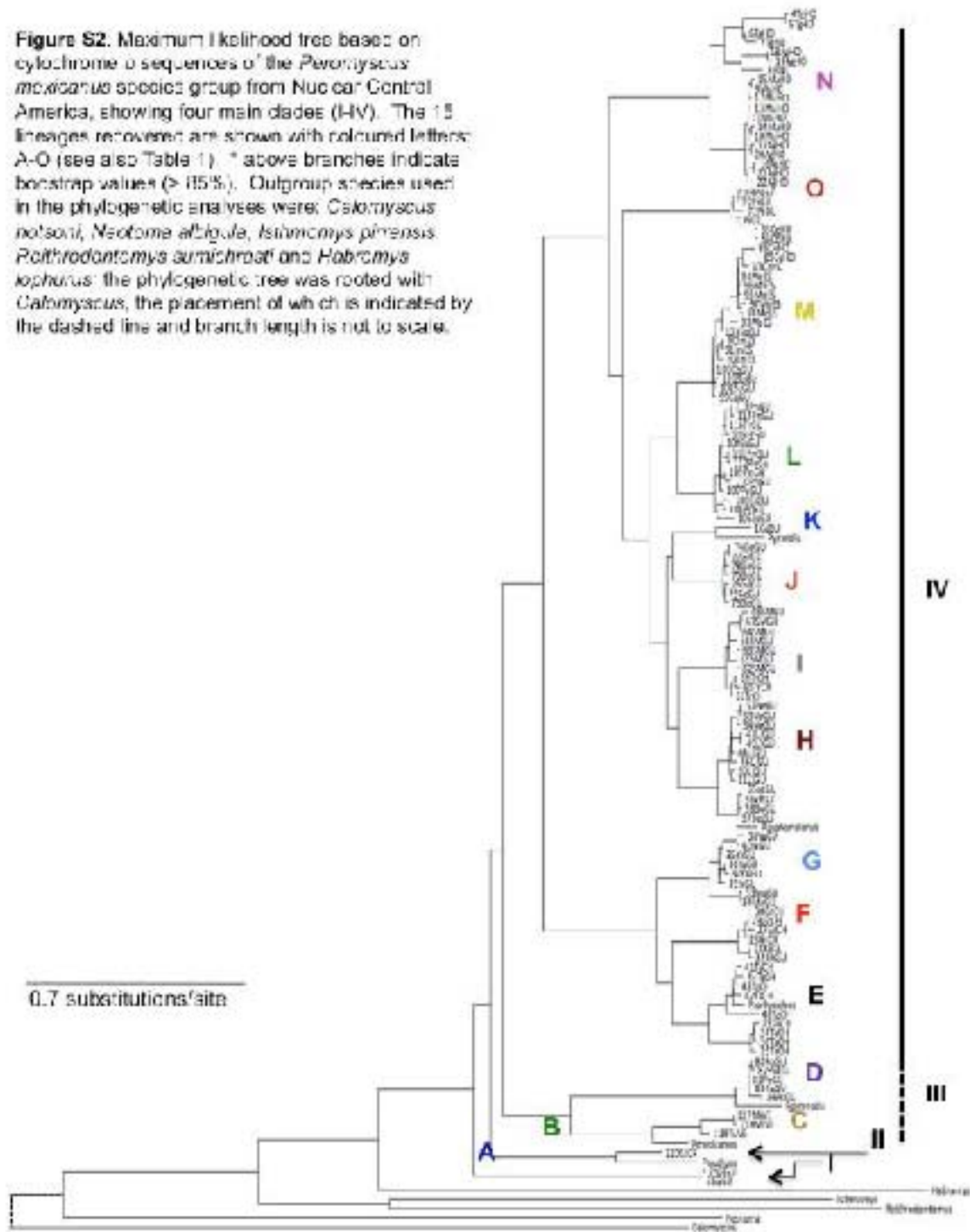
Table S4. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for the *Peromyscus mexicanus* group from Nuclear Central America. (\*\* $P < 0.01$ ).

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among lineages	14	5820.373	32.42304 Va	84.11**
Among sampling sites within lineages	21	528.860	4.78439 Vb	11.05**
Within sampling sites	150	284.304	1.89536 Vc	4.84**
Total	185	6633.538	39.10279	



**Figure S1.** Maps of the potential current distribution of *Peromyscus mexicanus*, *P. gymnotis*, *P. guatemalensis* and *P. zarhynchus*, obtained with MaxEnt and based on capture localities and museum records. We do not include *P. nudipes* and *P. grandis* because their ranges are too small to justify the analysis, a few sites along Costa Rican mountains and Alta and Baja Verapaz mountain regions in Guatemala, respectively. Figure modified from Sánchez-Tovar 2014; Pérez-Consuegra et al. in prep. Methods and results can be checked from Sánchez-Tovar 2014 (<http://132.248.9.195/ptd2014/septiembre/407113884/Index.html>).

**Figure S2.** Maximum likelihood tree based on cytochrome *b* sequences of the *Peromyscus mexicanus* species group from Nuclear Control America, showing four main clades (HV). The 15 lineages recovered are shown with coloured letters: A-O (see also Table 1). \* above branches indicate bootstrap values (> 85%). Outgroup species used in the phylogenetic analyses were: *Calomyscus notsoni*, *Neotoma albigula*, *Isthmomya pinensis*, *Rothrodontomys aurichroati* and *Habromys iohannis*; the phylogenetic tree was rooted with *Calomyscus*, the placement of which is indicated by the dashed line and branch length is not to scale.





**Table S2.** Results of multivariate Hotelling's T2 tests for factor lineage, for all pairs of lineages (A-O). Numbers represent p values, with asterisks indicating significant values, and nonsignificant ones highlighted in bold. Lineage K was represented by few specimens which were not enough for some comparisons (represented with a line).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
B	2.692e-12 ***													
C	<2e-16 ***	<2e-16 ***												
D	1.111e-10 ***	2.473e-07 ***	4.298e-07 ***											
E	0.0002076 ***	2.433e-13 ***	<2e-16 ***	1.113e-11 ***										
F	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	3.537e-08 ***									
G	3.106e-07 ***	1.878e-14 ***	<2e-16 ***	2.401e-10 ***	0.06217 ***	2.006e-06 ***								
H	1.295e-06 ***	4.245e-15 ***	<2e-16 ***	9.837e-10 ***	0.001287 ***	2.359e-07 ***	0.0001411 ***							
I	4.282e-08 ***	1.054e-14 ***	<2e-16 ***	4.612e-11 ***	1.473e-10 ***	<2e-16 ***	2.045e-09 ***	1.766e-06 ***						
J	0.0001331 ***	2.774e-07 ***	<2e-16 ***	8.698e-07 ***	0.001086 ***	1.626e-11 ***	0.0102 ***	0.002305 ***	0.01311 ***					
K	---	3.943e-09 ***	<2e-16 ***	8.54e-06 ***	---	0.02024 ***	---	---	1.627e-05 ***	---				
L	3.168e-12 ***	2.378e-12 ***	<2e-16 ***	2.214e-06 ***	1.082e-14 ***	<2e-16 ***	2.398e-11 ***	1.303e-12 ***	4.613e-13 ***	8.213e-05 ***	1.15e-06 ***			
M	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	2.219e-11 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	7.383e-16 ***	3.805e-14 ***	1.084e-08 ***	2.519e-12 ***	1.225e-09 ***		
N	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	3.295e-08 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	1.025e-12 ***	7.633e-13 ***	1.61e-08 ***	<2e-16 ***	
O	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	2.741e-10 ***	<2e-16 ***	3.744e-15 ***	4.442e-08 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***	<2e-16 ***