



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Sistemática

**UBICACIÓN FILOGENÉTICA CON CARACTERES MOLECULARES DE LA RATA DE
MONTE (*Nelsonia goldmani*), ENDÉMICA DEL EJE NEOVOLCÁNICO
TRANSVERSAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Sistemática)

PRESENTA:

Miguel Ángel León Tapia

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza
Instituto de Biología, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. Joaquín Arroyo Cabrales
Posgrado en Ciencias Biológicas
Dra. Gabriela Parra Olea

Instituto de Biología, UNAM.

MÉXICO, D.F. octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



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

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de agosto de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del alumno **LEÓN TAPIA MIGUEL ÁNGEL** con número de cuenta **404016889** con la tesis titulada "**Ubicación filogenética con caracteres moleculares de la rata de monte (*Nelsonia goldmani*), endémica del Eje Neovolcánico Transversal**", realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA**:

Presidente: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
Vocal: DRA. ELIZABETH ARELLANO ARENAS
Secretario: DR. JOAQUIN ARROYO CABRALES
Suplente: DRA. SOFIA SOLORZANO LUJANO
Suplente: DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca asignada con número de registro 239887. Al apoyo financiero del proyecto “Diversidad genética de mamíferos endémicos de México, su historia evolutiva e implicaciones para su conservación” PAPIIT-UNAM No. IN215711-2 a cargo del Dr. Fernando A. Cervantes Reza. A la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el apoyo financiero otorgado al proyecto “Código de Barras de los mamíferos de la Colección Nacional de Mamíferos”

A los miembros del comité tutor: Dr. Fernando A. Cervantes Reza, Dra. Gabriela Parra Olea, Dr. Joaquín Arroyo Cabrales por su tiempo e ideas invertidas en el enriquecimiento de la tesis y mi formación académica.

Agradecimientos personales

A mis padres María Juana Tapia Velázquez y Miguel Ángel León Robles por su ejemplo diario de trabajo duro y constante, que siempre me han infundado, por toda su confianza en mí y en mis capacidades, además de toda su ayuda, comprensión y cariño. Gracias por ser mis padres.

A mis hermanos Iván, Luis Alberto y Adrián David a quienes pretendo poner el mejor ejemplo posible.

A mi tutor Fernando Cervantes por su confianza en mi capacidad para llevar a cabo este proyecto y finalizarlo satisfactoriamente, por enseñarme a filtrar comentarios y actitudes innecesarias durante mi formación académica y todas las experiencias tan valiosas que compartió conmigo.

A Yolanda Hortelano por su compañerismo, por su confianza en mis aptitudes, por todas esas pláticas y todas esas oportunidades que me han hecho crecer profesionalmente y como persona, además de todo lo que me ha enseñado dentro de la CNMA y fuera de ella.

A Julieta Vargas por su agradable actitud, por demostrarnos a todos esas ganas de pasarla bien en cualquier momento, por su apoyo y por esas conversaciones que me han hecho crecer como persona y el tiempo tan agradable que nos ha ofrecido siempre.

A todos mis amigos y compañeros de la Colección Nacional de Mamíferos que me soportaron estos años y que pasamos tantos momentos juntos en ese precioso hogar y fuera de él: Karla Hernández, Laura Ruíz, Paula Vargas, Diana Gutiérrez, Jesica Arcangeli, Bere Brito, Bere García, Anaid Mora, Vania Rivera, Eduardo Solano, Luis Juárez, Edwin Batalla, Romano Vázquez e Isaac Camargo. Gracias a todos por su paciencia y compañerismo.

Gracias Laura Ruíz por enseñarme a tratar de ser siempre más positivo, por sonreír todos los días y por esa compañía inigualable, por ese cariño que me has demostrado y por compartir todo estos años conmigo.

Agradezco con mucho cariño a Karla Hernández y Eduardo Solano por su increíble amistad durante todos estos años; por su personalidad que, sin duda, es tan valiosa en mi vida, por todos esos consejos, apoyo, regaños y promesas que jamás olvidaré.

A Rocío por hacer todo tipo de trámites más fáciles en la secretaría de posgrado con esa actitud tan agradable y contagiosa.

A Laura Márquez por sus clases de Biología Molecular y por toda su ayuda para secuenciar las muestras de este proyecto.

A Sofía Solórzano y Alejandro Cruz por enseñarme temas tan valiosos, por su disponibilidad y por escuchar los problemas y darme consejos durante este proyecto.

A los curadores de las colecciones biológicas: Fernando A. Cervantes (CNMA), Celia López (CIIDIR Durango), Mark S. Hafner (LSUMZ), Jim Dines (LACM), Robert M. Timm (UK), Alfred L. Gardner y Suzanne C. Peurach (USNM), Maureen Flannery (CAS) y Candace McCaffery (UFMNH) por su apoyo y permitirme contar con un fragmento de los valiosos ejemplares de *Nelsonia goldmani* para incluirlos como muestras históricas en este estudio.

A la CONANP y SEMARNAT por los permisos otorgados para la colecta en campo, a Beatriz Sánchez responsable de la Secretaría de Turismo de Jilotepec, a don Chucho y don Daniel del “Parque Natural Las Peñas”, al Biól. Felipe Martínez responsable de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca “Santuario Sierra Chincua”, al Ing. Luis Toral, don Baltasar y don Salvador por su ayuda en “El Tejamanil” y don Andrés en “Patzingo” en la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, a la Biól. Rocío Gama jefa de proyectos del Parque Nacional “Pico de Tancítaro”, al Biól. José Villa responsable del Parque Nacional “El Nevado de Colima” y Oscar Manuel Sánchez en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán. A todos gracias por su amable hospitalidad y su ayuda en la logística de las localidades visitadas, pero sobre todo por darme la oportunidad de conocer esas maravillas.

A todas esas personas de la CNMA y fuera de ella que me ofrecieron su tiempo y ayuda en campo: Karla Hernández, Laura Ruiz, Diana Gutiérrez, Jesica Arcangeli, Elizabeth Cabrera, Elizabeth Labastida, Nicté Villanueva, Eduardo Solano, Luis Juárez, Adolfo Flores, Jonathan Hernández, Romano Vázquez, Edwin Batalla, Hazael Rivera, Cristian Medina y Roberto Guerrero. A todos muchas gracias por soportar el frío, las lluvias intensas, las extensas horas caminando, el cansancio, algunas veces la mala comida que tuvimos que soportar y todas las demás situaciones que pasamos para poder capturar la hermosa especie de mi proyecto, pero sobre todo gracias por apoyarme todas esas veces cuando regresábamos con las manos vacías después de todo ese esfuerzo.

“Creo que los animales ven en el hombre un ser igual a ellos que ha perdido de forma extraordinariamente peligrosa el sano intelecto animal, es decir, que ven en él al animal irracional, al animal que ríe, al animal que llora, al animal infeliz”.

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | I |
| Abstract | II |
| Introducción | 1 |
| Género <i>Nelsonia</i> | 1 |
| Eje Neovolcánico Transversal | 5 |
| <i>Nelsonia goldmani</i> | 7 |
| Hipótesis | 14 |
| Objetivo general | 13 |
| Objetivos particulares | 13 |
| Materiales y métodos | 15 |
| Muestreo taxonómico | 15 |
| <i>Trabajo de campo</i> | 15 |
| <i>Búsqueda de ejemplares y solicitud de muestras en colecciones biológicas</i> | 16 |
| Protocolos de laboratorio | 17 |
| <i>Extracción de DNA</i> | 17 |
| <i>Amplificación y secuenciación</i> | 17 |
| Análisis de los datos | 20 |
| <i>Análisis filogenético</i> | 22 |
| Resultados | 24 |
| Muestreo taxonómico | 24 |
| <i>Trabajo de campo</i> | 24 |
| <i>Ejemplares depositados en colecciones biológicas</i> | 24 |
| Análisis de los datos | 26 |
| <i>Análisis filogenético</i> | 30 |
| <i>Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI)</i> | 30 |
| <i>Citocromo b (Cytb)</i> | 33 |
| <i>Análisis concatenado (COI/Cytb)</i> | 36 |
| <i>Estimación del tiempo de divergencia</i> | 40 |
| Discusión | 41 |
| <i>Importancia del conocimiento de Nelsonia goldmani</i> | 41 |
| <i>Posición filogenética del género Nelsonia</i> | 42 |
| <i>Variación genética en Nelsonia goldmani</i> | 45 |
| <i>Aspectos biogeográficos</i> | 48 |
| <i>Conservación de Nelsonia goldmani</i> | 51 |
| Conclusiones | 53 |
| Literatura citada | 54 |
| Apéndices | 64 |

Resumen

Nelsonia es un género de roedores endémico de México que presenta una distribución geográfica altamente aislada y fragmentada. Desafortunadamente, poco se sabe acerca de este género, ya que es ignorado en muchas revisiones debido a que existen escasos ejemplares en colecciones biológicas. Incluye solamente dos especies: *N. goldmani* y *N. neotomodon*, los estudios reportados con *N. goldmani* son pocos lo que dificulta el conocimiento sobre su posición taxonómica y datos que expliquen la variación genética de sus poblaciones. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue llevar a cabo un análisis filogenético con los marcadores mitocondriales citocromo b y citocromo oxidasa subunidad 1 que aporte información genética sobre *N. goldmani* y ayuden a entender su sistemática. Se lograron capturar dos ejemplares de la subespecie *N. g. goldmani* y tres de *N. g. cliftoni*, además de que se reunieron 17 muestras históricas de varias colecciones biológicas de Estados Unidos, de las cuales siete ejemplares corresponden a la localidad tipo colectadas en 1903. Los análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana mostraron que todas las muestras analizadas del género *Nelsonia* formaron un grupo monofilético, el cual fue basal en la tribu Neotomini y probablemente se originó en el Mioceno tardío. Por otro lado, las muestras de *N. goldmani* y *N. neotomodon* formaron dos grupos monofiléticos que apoyan los datos morfológicos en la separación filogenética entre las dos especies que pudieron haber divergido a inicios del Plioceno. Los datos mostraron que las localidades individuales de *N. goldmani* formaron clados distintos, en donde el clado del centro del Eje Neovolcánico Transversal fue el grupo hermano de todos los demás. Además, entre los clados de *N. goldmani* existen distancias genéticas grandes que reflejan un nivel de estructuración filogeográfica definida debido a la concordancia de los clados encontrados en los análisis filogenéticos con el aislamiento geográfico de las localidades que pudieron haber comenzado a finales Plioceno y durante el Pleistoceno. Por otro lado, las dos subespecies no se separaron en dos clados diferentes, si no que *N. g. cliftoni* es un clado que se derivó de un ancestro compartido de *N. g. goldmani*, esto sugiere que las características morfológicas que distinguen a *N. g. cliftoni* pueden deberse a plasticidad fenotípica o adaptación local. Finalmente, es necesario poner mayor interés en la conservación de *N. goldmani*, así como promover la protección de las áreas donde habitan sus poblaciones, en la que destaca el Parque Natural “Las Peñas” ya que representa la localidad del clado más antiguo y el límite este de la distribución geográfica de *N. goldmani*. Además, esta localidad se encuentra aislada por zonas bajas de temperaturas más altas y representa la única localidad reportada para un taxón endémico: el roedor *Habromys delicatulus*.

Abstract

Nelsonia is a rodent genus endemic to Mexico with an isolated and highly fragmented geographic distribution. The genus includes only two species: *N. goldmani* and *N. neotomodon* and unfortunately little is known about them, as they are ignored in many revisions because there are few samples in biological collections. Due to the difficulty of collecting the samples, particularly *N. goldmani*, no research paper provides information on its phylogenetic position or genetic data to understand relationships among populations. Therefore, the aim of this study was to understand the genetic variation and systematic status of *N. goldmani*, performing a phylogenetic analysis with two mitochondrial markers cytochrome b and cytochrome oxidase subunit 1. Two samples of *N. g. goldmani* and three of *N. g. cliftoni* were obtained, furthermore 17 historical samples of several biological collections in the United States were examined, of which seven samples correspond to the type locality collected in 1903. Maximum Likelihood and Bayesian analysis showed that all samples from *Nelsonia* formed a monophyletic sister group to all members of the tribe Neotomini and arose during late Miocene. On the other hand, samples of *N. goldmani* and *N. neotomodon* formed two monophyletic groups each similar to the phylogenetic pattern supported by morphological data previously reported and may have diverged in the early Pliocene. The results show that *N. goldmani* formed monophyletic groups in which the clade from the central part of the Mexican Transvolcanic Belt is the sister group to all. Furthermore, the large genetic distances between clades of *N. goldmani* reflect a level of defined phylogeographic structure due to concordance of the clades found in phylogenetic analysis and the geographic isolation of the localities that may have begun at the end of the Pliocene and continued during Pleistocene. Samples of the two subspecies did not form two reciprocally monophyletic clades, as *N. g. cliftoni* shares the same ancestor with west populations of *N. g. goldmani*, which suggests that morphological distinctive features of *N. g. cliftoni* may be due to phenotypic plasticity or local adaptation. Finally, it is necessary to promote conservation interest in *N. goldmani*, provide legal protection to the areas where this threatened mammal occurs, particularly The Natural Park “Las Peñas” that represents the town oldest clade and the east boundary of the geographical distribution of *N. goldmani*. In addition, this locality is isolated by low areas of higher temperatures and represents the only locality reported for an endemic taxon: *Habromys delicatulus* rodent.

Introducción

Género *Nelsonia*

Nelsonia (Merriam, 1897; Cricetidae: Neotominae) es un género de roedor endémico de México con una distribución geográfica altamente aislada y fragmentada, y de considerable interés filogenético (Carleton, 1980; Engstrom *et al.*, 1992). Desafortunadamente, poco se sabe acerca de su distribución geográfica e historia evolutiva y aunque se han efectuado colectas dentro de su área de distribución, existen escasos ejemplares depositados en colecciones biológicas en México y Estados Unidos (Glendinning, 1992; Bradley *et al.*, 2007). El género incluye solamente dos especies: *N. goldmani* y *N. neotomodon* (García-Mendoza y López-González, 2005).

Se considera que el género *Nelsonia* se encuentra filogenéticamente relacionado con otros roedores de los géneros *Neotoma*, *Hodomys* y *Xenomys* (Ceballos *et al.*, 2005; Musser y Carleton, 2005), con base en estudios morfológicos (Carleton, 1980). Aunque externamente no son muy parecidos entre ellos, sus características morfológicas internas como el patrón en la estructura del esmalte de los molares muestran algunas similitudes (Fig. 1; Hopper, 1954; Carleton, 1980). Sin embargo, algunas características morfológicas primitivas (Hooper y Musser, 1964) y similitudes en los patrones de bandeo de sus cariotipos (Engstrom, 1983; Engstrom *et al.*, 1992) sugieren cierta afinidad con el grupo de los peromyscinos (Bradley *et al.*, 2007). Esto ha resultado en que el género *Nelsonia* haya cambiado taxonómicamente a través del tiempo junto con el número de familias, tribus y géneros en los roedores de la familia cricetidae (cuadro 1); además de que no se tiene información sobre las relaciones filogenéticas con los géneros con los que se encuentra actualmente clasificado taxonómicamente.

Los estudios moleculares posteriores han apoyado la relación cercana entre *Xenomys*, *Neotoma* y *Hodomys*; sin embargo, no se han incluido ejemplares de *Nelsonia* en dichos estudios debido principalmente a la dificultad en la obtención de las muestras (Edwards *et al.*, 2001; Edwards y Bradley, 2001; Edwards y Bradley, 2002; Reeder *et al.*, 2006; Longhofer y Bradley, 2006; Miller y Engstrom, 2008). Hasta donde se sabe únicamente con información de los genes nucleares ND3, ND4L, ND4 y la arginina tRNA, se exploró la relación filogenética de un

ejemplar de *N. neotomodon* (número de catálogo LAF1800) con dos especies de un género de su grupo (*Neotoma*), además de varios roedores norteamericanos (Neotominae) y sudamericanos (Engel *et al.*, 1998). Se encontró que el ejemplar de *N. neotomodon* se agrupó con los ejemplares de *Neotoma* y este grupo fue hermano de las tribus Peromyscine y Baiomyini, pero no fueron incluidas muestras de los géneros *Xenomys* y *Hodomys*.

Cuadro 1. Clasificación de los géneros y tribus de la subfamilia Neotominae, incluyendo a *Nelsonia* bajo los arreglos de Hooper y Musser (1964), Carleton (1980), Musser y Carleton (2005), Reeder *et al.* (2006) y Miller y Engstrom (2008).

| Hooper y Musser, 1964 | Carleton, 1980 | Musser y Carleton, 2005 | Reeder <i>et al.</i> , 2006 | Miller y Engstrom, 2008 |
|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Neotomine-peromyscines | Neotomine-peromyscines | Neotominae | Neotomine-peromyscines | Neotominae |
| Neotomini | Neotomine | Neotomini | Neotomini | Neotomini |
| <i>Neotoma</i> | <i>Hodomys</i> | <i>Hodomys</i> | <i>Hodomys</i> | <i>Hodomys</i> |
| <i>Otolytomys</i> | <i>Nelsonia</i> | <i>Nelsonia</i> | <i>Nelsonia</i> | <i>Nelsonia</i> |
| <i>Tylomys</i> | <i>Neotoma</i> | <i>Neotoma</i> | <i>Neotoma</i> | <i>Neotoma</i> |
| <i>Xenomys</i> | <i>Xenomys</i> | <i>Xenomys</i> | <i>Xenomys</i> | <i>Xenomys</i> |
| Peromyscini | Baiomyine | Baiomyini | Baiomyini | Baiomyini |
| <i>Baiomys</i> | <i>Baiomys</i> | <i>Baiomys</i> | <i>Baiomys</i> | <i>Baiomys</i> |
| <i>Nelsonia</i> | <i>Scotinomys</i> | <i>Scotinomys</i> | <i>Scotinomys</i> | <i>Scotinomys</i> |
| <i>Neotomodon</i> | Peromyscine | Ochrotomyini | Ochrotomyini | Ochrotomyini |
| <i>Ochrotomys</i> | <i>Habromys</i> | <i>Ochrotomys</i> | <i>Ochrotomys</i> | <i>Ochrotomys</i> |
| <i>Onychomys</i> | <i>Isthmomyis</i> | Reithrodontomyini | Peromyscini | Peromyscini |
| <i>Peromyscus</i> | <i>Megadontomys</i> | <i>Habromys</i> | <i>Habromys</i> | <i>Habromys</i> |
| Reithrodontomys | <i>Neotomodon</i> | <i>Isthmomyis</i> | <i>Isthmomyis</i> | <i>Megadontomys</i> |
| <i>Scotinomys</i> | <i>Ochrotomys</i> | <i>Megadontomys</i> | <i>Megadontomys</i> | <i>Neotomodon</i> |
| | <i>Onychomys</i> | <i>Neotomodon</i> | <i>Neotomodon</i> | <i>Onychomys</i> |
| | <i>Osgoodomys</i> | <i>Onychomys</i> | <i>Onychomys</i> | <i>Osgoodomys</i> |
| | <i>Peromyscus</i> | <i>Osgoodomys</i> | <i>Osgoodomys</i> | <i>Peromyscus</i> |
| | <i>Podomys</i> | <i>Peromyscus</i> | <i>Peromyscus</i> | <i>Podomys</i> |
| | <i>Reithrodontomys</i> | <i>Podomys</i> | <i>Podomys</i> | Reithrodontomyini |
| | Tylomyine | <i>Reithrodontomys</i> | <i>Reithrodontomys</i> | <i>Reithrodontomys</i> |
| | <i>Nyctomys</i> | | Tylomyini | <i>Isthmomyis</i> |
| | <i>Otonyctomys</i> | | <i>Nyctomys</i> | |
| | <i>Tylomys</i> | | <i>Otonyctomys</i> | |
| | <i>Otolytomys</i> | | <i>Tylomys</i> | |
| | | | <i>Otolytomys</i> | |

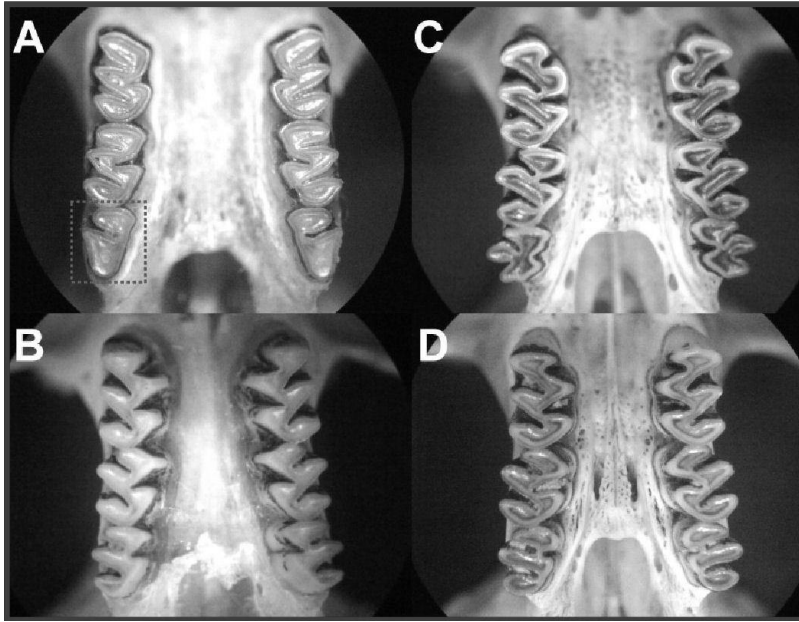


Fig. 1. Vista ventral del cráneo de algunos ejemplares de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) que muestra algunas similitudes en el patrón de la estructura del esmalte de los molares entre los géneros del grupo Neotomini, A) *Nelsonia goldmani goldmani* (CNMA 19699), B) *Xenomys nelsoni* (CNMA 5663), C) *Neotoma mexicana mexicana* (CNMA 39036) y D) *Hodomys alleni alleni* (CNMA 6336). Los molares de los cuatro taxones tienen una forma de “W”, sin embargo la característica forma de “U” del tercer molar (cuadro punteado) de *Nelsonia* la distingue.

Previo a los estudios morfológicos *N. goldmani* se incluyó como una subespecie de *N. neotomodon* (Hooper, 1954); sin embargo, una combinación de caracteres externos y craneales distinguieron a *N. neotomodon* de *N. goldmani* (Engstrom *et al.*, 1992). Externamente *N. neotomodon* presenta un pelaje de color canela, más oscuro dorsalmente que lateralmente, la superficie dorsal de las patas traseras es usualmente blanca y la cola es marcadamente bicolor con la punta blanca (Fig. 2A; Merriam, 1987). En *N. goldmani* el pelaje dorsal es más oscuro con un tinte grisáceo y una suavizada línea lateral, las patas traseras son oscuras y la cola carece de una coloración bicolor con la ausencia de la punta blanca (Fig. 2B; Merriam, 1903; Hooper, 1954, Engstrom *et al.*, 1992). Las características internas craneales que distinguen a las dos especies son: la presencia de una placa cigomática angosta, el interparietal angosto y la ausencia de una escotadura cigomática anterorbitaria en *N. neotomodon*, mientras que en *N. goldmani* la placa cigomática es ancha, el interparietal ancho y con una escotadura anterorbital evidente (Fig. 2; Engstrom *et al.*, 1992).

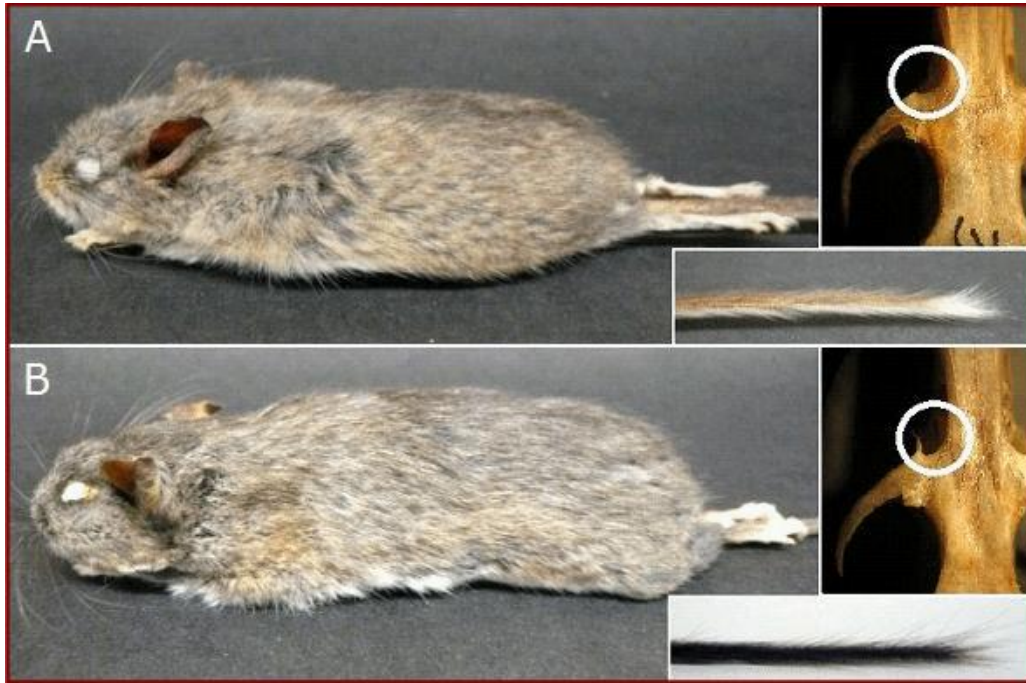


Fig. 2. Diferencias externas y craneales entre ejemplares de *Nelsonia neotomodon* y *Nelsonia goldmani* de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA). A) Una hembra subadulta de *Nelsonia neotomodon* (CNMA 1528) de Sierra Fría, Aguascalientes, colectada el 12 de marzo de 1953; en el lado derecho se encuentra la vista lateral de la cola de coloración bicolor y la vista dorsal del cráneo con la ausencia de la escotadura anteriororbital encerrada en un círculo. B) Un macho adulto de *Nelsonia goldmani goldmani* (CNMA 19699) de Jilotepec, Estado de México, colectado el 16 de Agosto de 1982; en el lado derecho se encuentra la vista lateral de la cola de coloración negra y la vista dorsal del cráneo con la presencia de la escotadura anteriororbital encerrada en un círculo.

La distribución geográfica de estas dos especies es alopátrica, a pesar de esto las dos especies se encuentran en ambientes muy similares (Engstrom *et al.*, 1992). Los hábitats que ocupan son acantilados, bordes, cañadas y otros sitios rocosos, donde existen grietas y salientes convenientes como refugios. Estos sitios rocosos también aparentemente son comparativamente templados, húmedos y al menos unas pocas horas del día están protegidos de los rayos del sol. El tipo de vegetación de estos sitios está compuesto predominantemente de coníferas con una densa vegetación rasante, al menos en algunos días de la época seca del año (Hooper, 1954); aunque un ejemplar de *N. goldmani* fue capturado en un claro seco en el fondo de un barranco, el cual difiere de los ambientes documentados (Glendinning, 1992).

Nelsonia neotomodon presenta poblaciones fragmentadas en la Sierra Madre Occidental, desde el sur de Chihuahua, Durango hasta Zacatecas, Aguascalientes y el norte de Jalisco. En

contraste, *N. goldmani* se encuentra distribuida en localidades dispersas en el centro-oeste del Eje Neovolcánico Transversal de México (Fig. 3; Engstrom y Bickham, 1983; Engstrom *et al.*, 1992; García-Mendoza y López-González, 2005). El Eje Neovolcánico Transversal cuenta con una serie de características ambientales y geológicas que indudablemente deben estar fuertemente relacionadas con la historia evolutiva de varias especies (Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010).

Eje Neovolcánico Transversal (ENT)

De todas las regiones geográficas en que México está dividido, el ENT es una de las más importantes debido a la biodiversidad que alberga (Palma *et al.*, 2001). Consiste en una zona volcánica que representa el sistema montañoso más largo en la parte central de México a través de los 1200 km del Golfo de California desde el centro de México hasta el Golfo de México (García-Palomo *et al.*, 2000). De acuerdo con los límites morfotectónicos el ENT se extiende desde su parte más occidental en el océano Pacífico entre San Blas; Nayarit y Bahía de Banderas en Jalisco hasta el Cofre de Perote y Pico de Orizaba en Veracruz, en su parte más oriental (Fig. 4; Demant, 1978; Yarza, 2003; Corona *et al.*, 2007).

Es común que en las publicaciones no se detallen los límites del ENT ni los criterios de delimitación y que la nomenclatura utilizada para referirse a esta porción del país sea inexacta (Escalante *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2007); aunque se ha considerado que los límites geográficos naturales del ENT deben ser muy parecidos a los límites morfotectónicos, basándose en el hecho de que la evolución de los taxones y sus áreas de distribución están fuertemente relacionadas al espacio geográfico y la dinámica del mismo en el tiempo geológico.

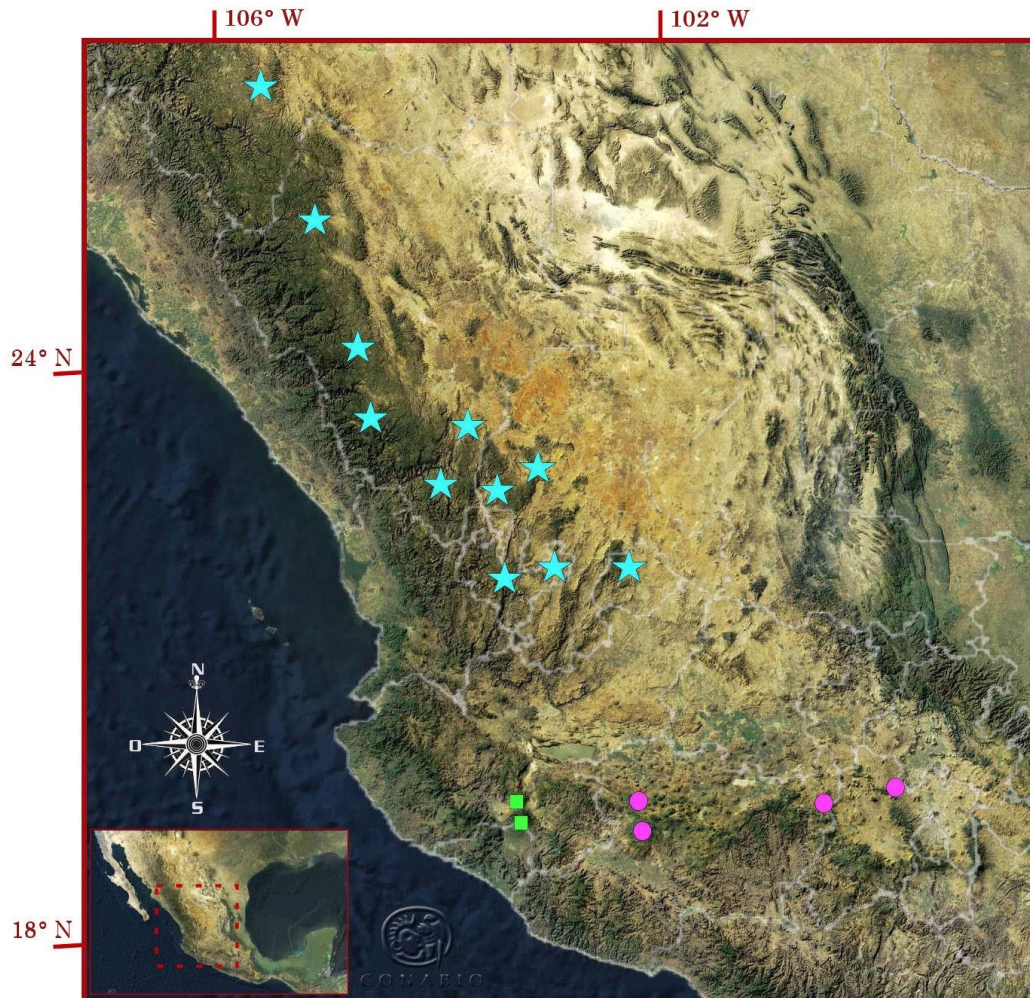


Fig. 3. Distribución geográfica de *Nelsonia neotomodon* (estrellas), *Nelsonia goldmani cliftoni* (cuadros) y *Nelsonia goldmani goldmani* (círculos) de acuerdo con los ejemplares depositados en las colecciones biológicas. Mapa satelital de CONABIO (2003).

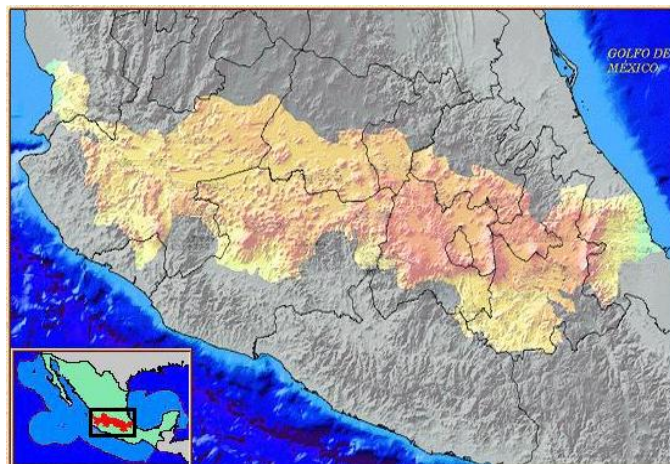


Fig. 4. Ubicación y extensión geográfica de acuerdo a los límites morfoestructivos del Eje Neovolcánico Transversal (polígono claro) en el centro de México (INEGI, 2011).

Sin embargo, las variaciones ambientales y las relaciones ecológicas entre las especies han modificado esas distribuciones al igual que los eventos que han ocurrido en la tierra, de tal manera que se considera que los límites morfotectónicos con algunas modificaciones resultan ser una buena aproximación para la delimitación de la provincia biótica del ENT (Escalante *et al.*, 2007).

El ENT es uno de los principales centros de endemismo y riqueza de especies de mamíferos mexicanos y se ha mencionado que se encuentran tanto especies neárticas como neotropicales, por lo que se postula al ENT como una zona transicional (Ceballos *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2007). Aunque el ENT no es una de las zonas con mayor riqueza de especies del país, se ha documentado que existe gran cantidad de especies exclusivas, constituyendo una zona evolutivamente activa (Escalante *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2007). Su compleja topografía, variabilidad de altitudes y climas, así como la posición geográfica del país y su historia geológica hacen del ENT uno de los sistemas tectónicos más complejos del planeta (Gómez-Tuena *et al.*, 2005; Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010); así mismo, se le reconoce por su diversidad de ambientes, hábitats y microhábitats con elementos de insularización para un importante número de especies sedentarias, dando todo esto como resultado un intrincado patrón de distribución de especies (Rzedowski y Rzedowski, 1989; Ceballos *et al.*, 2005; Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010). Sin duda, el caso de distribución de *N. goldmani* es uno de ellos.

Nelsonia goldmani (Merriam, 1903)

Nelsonia goldmani tiene una longitud total de aproximadamente 250 mm, 125 mm de cola vertebral y un peso aproximado de 60 g. Posee pocos detalles en la apariencia exterior que son distintivos, como las vibrisas extremadamente largas extendiéndose al menos a la región lumbar, las orejas largas y muy redondas con escaso pelaje, pero la característica más evidente es la cola larga cubierta con un mechón de pelos oscuro; estas características externas pueden dar un indicio del conjunto único de rasgos que la distinguen de otros roedores (Fig. 5; Merriam, 1903; Hooper, 1954; Genoways y Jones, 1968). Este mamífero es poco común y se tiene reportado que sólo habita en pocas regiones disjuntas de clima templado y húmedo como bosque de coníferas, bosque de oyamel, pino-encino y bosque mesófilo de montaña; usualmente está asociado a

acantilados y laderas rocosas en las zonas con mayor densidad de vegetación y mayor humedad en elevaciones que van desde los 2,100 hasta los 3,100 m (Glendinning, 1992; Engstrom *et al.*, 1992).



Fig. 5. Ejemplar de una hembra subadulta de *Nelsonia goldmani goldmani* CNMA 46292 colectado el 16 de octubre del 2010 en el Parque Natural “Las Peñas”, Estado de México. Fotografía: Miguel Ángel León Tapia.

Nelsonia goldmani consta de dos subespecies: *N. g. cliftoni* y *N. g. goldmani*. La primera hasta ahora se ha colectado en dos localidades, la primera al ENE de “El Jazmín” en Jalisco y la segunda dentro del Parque Nacional “El Nevado de Colima” en el Volcán de Colima y el Volcán de Fuego, en Jalisco y Colima respectivamente (Genoways y Jones, 1968; Engstrom *et al.*, 1992). Estas localidades presentan bosques de pino (*Pinus hartwegii*, *P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. maximinoi*, *P. douglasiana* y *Juniperus monticola*), oyamel (*Abies religiosa*) y encino (*Quercus spp.*; SARH, 1993).

En contraste *N. g. goldmani* se ha reportado en cuatro localidades aisladas, dos se encuentran al oeste de Michoacán en el Cerro Patambán y en el Parque Nacional “Pico de Tancítaro”, la cual corresponde a la localidad tipo (Fig. 6; Merriam, 1903; Hooper, 1954). El parque se encuentra dentro de los municipios de Tancítaro, Periban de Ramos, Uruapan y Nuevo San Juan Parangaricutiro, donde se encuentra un clima templado y húmedo, predominan los bosques de

pino (*Pinus pseudostrobus*, *P. leiophylla*, *P. douglasiana* *P. montezumae*), oyamel (*Abies religiosa religiosa* y *Abies r. emarginata*), encino (*Quercus laurina*, *Q. rugosa*, *Q. martinezii*, *Q. laurina*, *Q. crassifolia*, *Q. obtusata*, entre otras especies), pino-encino y bosque mesófilo de montaña; el estrato herbáceo es rico en plantas compuestas, gramíneas y leguminosas, así como helechos. El parque presenta una topología accidentada con laderas de fuertes pendientes y barrancas prolongadas con una altura máxima de 3845 m (CONANP, 2008).

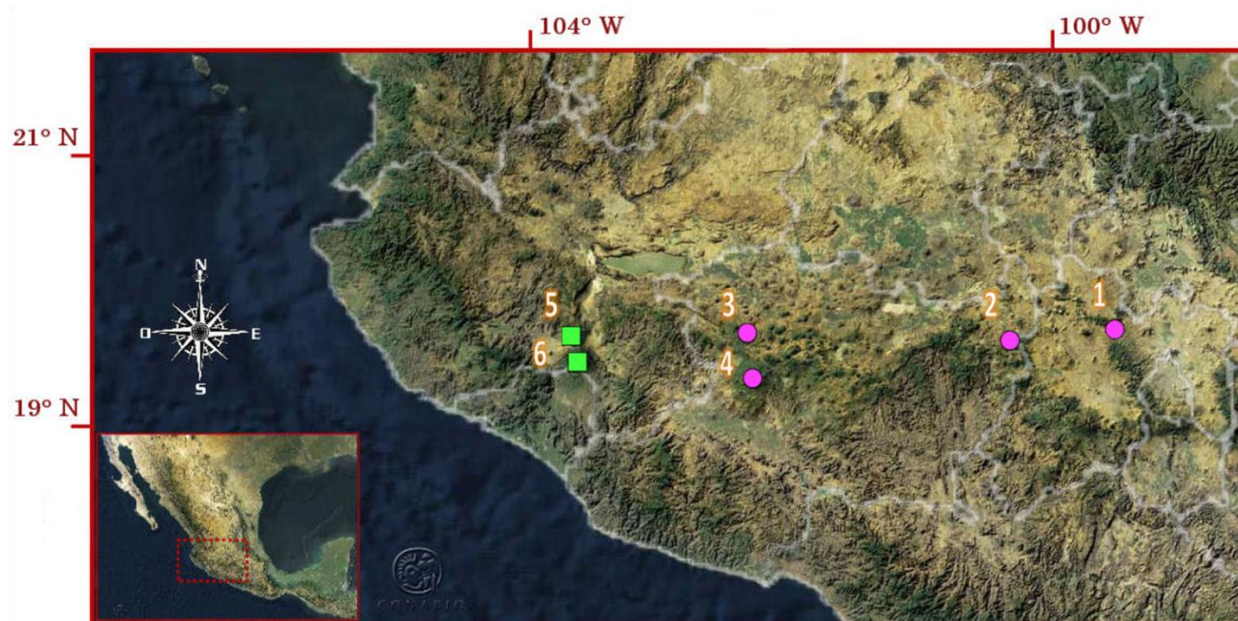


Fig. 6. Distribución geográfica del roedor *Nelsonia goldmani*. *Nelsonia goldmani goldmani* (círculos): 1) Parque Natural “Las Peñas”, 2) Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca santuario “Sierra Chincua”, 3) Cerro Patambán y 4) Parque Nacional “Pico de Tancitaro”; *Nelsonia goldmani cliftoni* (cuadros): 5) El Jazmín y 6) Parque Nacional “El Nevado de Colima”. Basado en el mapa satelital de CONABIO (2003).

Otra localidad donde habita este roedor es en la parte este de Michoacán en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca, Santuario “Sierra Chincua”, que se localiza en el Municipio de Angangueo y, forma parte del corredor Sierra Chincua-Campanario-Chívati-Huacal (INE, 1994). La vegetación que predomina en el área es el bosque de oyamel (*Abies religiosa*) con varias especies de *Senecio*, *Stevia monardaefolia* (Compositae), *Satureja macrostema*, *Salvia cardinalis* (Labiatae), además de *Acaena elongata* (Rosaceae; Glendinning, 1992).

La última localidad de la distribución geográfica de *N. goldmani* es en el Parque Natural “Las Peñas”. Esta localidad se encuentra ubicada cerca de Dexcaní Alto en el Municipio de Jilotepec, Estado de México y se localiza al norte de la zona central del ENT. Este parque presenta cañadas profundas y barrancos prolongados, donde las porciones más altas están cubiertas por vegetación xerófila y varias especies de gramíneas. En las partes bajas de los cañones se encuentra una vegetación que mantiene mayor humedad que en las partes altas. El área en general está cubierta por espeso bosque de encino (*Quercus* sp.) con pequeños parches de oyamel (*Abies* sp.) y también está caracterizada por tener pequeñas zonas de bosque mesófilo de montaña (Engstrom *et al.*, 1992; Carleton *et al.*, 2002).

Engstrom *et al.* (1992) analizaron las relaciones sistemáticas de *Nelsonia* considerando la variación en caracteres craneales y de pelaje, las que distinguieron a *N. neotomodon* del noroeste con respecto a *N. g. cliftoni* y *N. g. goldmani* del sureste. Hipotetizaron que la mayoría de las muestras estudiadas pueden representar dos linajes monofiléticos diagnosticables dentro del género (*N. neotomodon* y *N. goldmani*), colocando al taxón *cliftoni* como una subespecie de *N. goldmani* basándose en diferencias en el color del pelaje, siendo *N. g. cliftoni* más pálido y más amarillento dorsal y lateralmente (Fig. 7). Aunque cranealmente son muy similares, *N. g. cliftoni* tiene el rostro significativamente más largo que *N. g. goldmani*. Dichas características en conjunto definieron a estas subespecies. Si bien puede ser controversial este criterio, el bajo número de ejemplares examinados (17; Engstrom *et al.*, 1992), lo hace aún más.

La hipótesis propuesta por Engstrom, *et al.*, (1992) se basa en que la divergencia de las muestras del noroeste (*N. neotomodon*) y las del sureste (*N. goldmani*), es el resultado de una disrupción histórica de flujo génico y una subsiguiente anagénesis, en vez de una adaptación local a las actuales condiciones ambientales. Aunque no existen medidas de las relaciones genéticas entre las poblaciones, las características morfológicas y la ausencia de evidencia de hibridación sugiere que pertenecen a dos clados distintos, de tal manera que los datos moleculares obtenidos de *N. goldmani* comparados con ejemplares de *N. neotomodon* podrían dar un indicio de la divergencia genética entre las poblaciones y apoyar la monofilia de *N. goldmani*.

En el escenario geográfico, Engstrom *et al.* (1992) argumentaron que la distribución de *N. neotomodon* en la Sierra Madre Occidental, y al oeste del Eje Neovolcánico de *N. g. cliftoni*, corresponde al patrón de distribución neártica descrita para algunos insectos de montaña que habitan en ambientes templados y húmedos, arriba de los 1700 m de altitud (Halfpter, 1987). Liebherr (1991) identificó la divergencia entre escarabajos de la Sierra Madre Occidental y las montañas del sur (incluyendo el ENT), indicando dos clados que concuerdan con la barrera geográfica que existe para algunos de estos taxones cerca de la región de contacto entre el sur de la Sierra Madre Occidental y el oeste del ENT en Nayarit y el centro de Jalisco, donde las elevaciones raramente exceden los 2000 m de altitud y los ambientes húmedos son raros o ausentes.



Fig. 7. Arriba un ejemplar de una hembra subadulta de *Nelsonia goldmani goldmani* CNMA 46292 colectado el 16 de octubre del 2010 en el Parque Natural “Las Peñas”, Estado de México. Abajo un ejemplar de una hembra adulta de *Nelsonia goldmani cliftoni* CNMA 46290 colectado el 14 de diciembre del 2011 en el Parque Nacional “El Nevado de Colima”, Jalisco. Fotografías: Miguel Ángel León Tapia.

Es importante señalar que ningún ejemplar de *Nelsonia* ha sido colectado en los ambientes de Nayarit y centro de Jalisco, lo que sugiere que la correspondencia con la distribución de los insectos implica que la diferenciación de *N. neotomodon* y *N. goldmani* puede resultar del mismo efecto vicariante que fragmentó las distribuciones de otros organismos de montaña de relativamente baja dispersión. Por lo anterior se sugiere que *N. g. cliftoni* está restringida geográficamente a las montañas cercanas a la zona geográfica de El Jazmín y a El Nevado de Colima al sur de Jalisco y norte de Colima, además de que pueda estar aislada de *N. g. goldmani* en las montañas de Michoacán por las cuencas de los Ríos Tepalcatepec y Tuxpan, parte del valle de Zapotlán y Sayula y la Sierra del Tigre, ya que los lugares más altos corresponden a las altitudes más bajas donde se registra *Nelsonia* (Genoways y Jones, 1968). Sin embargo, es muy probable que por las mismas razones de altitud y urbanización las otras poblaciones de *N. goldmani* se encuentren aisladas entre ellas, como la población del centro del ENT (ver Fig. 6) que parece estar totalmente aislada de las demás poblaciones por las zonas bajas, con mayor aridez que llegan del norte del Estado de México hasta el límite con el estado de Michoacán, lo que podría sugerir el límite este de la distribución geográfica de la especie.

La presencia de las barreras geográficas en el ENT se han sugerido para otras especies endémicas, como con el roedor *Baiomys musculus* (Amman y Bradley, 2004) y la serpiente *Crotalus tancitarensis* (Alvarado-Díaz y Campbell, 2004); de modo que probablemente restrinjan el flujo génico que limiten su distribución. A partir de estos resultados, probablemente el flujo génico entre las poblaciones de *N. goldmani* esté interrumpido.

En todo caso, los estudios realizados con *Nelsonia* son muy escasos y su inclusión en los análisis es ignorada en muchas publicaciones, esto principalmente se atribuye al complicado proceso para la obtención de las muestras (Bradley *et al.*, 2007). En consecuencia, los ejemplares en las colecciones biológicas son escasos, los que ocasiona una ausencia de otros estudios que sustenten su arreglo taxonómico. Además, no existen estudios que analicen la variación genética poblacional, ni la divergencia y las relaciones filogenéticas con los miembros de los roedores que se han propuesto que son los más cercanos filogenéticamente hablando (los géneros *Hodomys*, *Neotoma* y *Xenomys*). De tal manera que sería importante conocer la historia evolutiva de *N. goldmani* e indagar acerca de algunos de los procesos que afectaron la estructura de sus poblaciones; si esto se lleva a cabo utilizando herramientas moleculares y considerando que la categoría de riesgo dentro de la NOM-059 de *N. goldmani* es de “protección especial”

(SEMARNAT, 2010), ello permitiría también incursionar en las implicaciones para la conservación genética de la especie.

Por lo tanto, si se considera la información morfológica y distribución geográfica actual, es posible generar una hipótesis en la que la información genética indique que existe una división de *Nelsonia* en dos linajes monofiléticos: *N. neotomodon* al norte y *N. goldmani* al sur. Las muestras de *N. goldmani* estarían representadas por dos grupos de haplotipos distinguibles como las subespecies *N. g. goldmani* y *N. g. cliftoni*, dado que sus poblaciones probablemente se encuentran aisladas geográficamente y presentan una interrupción histórica de flujo génico (Fig. 8; Engstrom *et al.*, 1992). Como la diversidad biológica dentro de las especies incluye la variación genética (Moritz, 1994; Qiu-Hong *et al.*, 2004; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009), entonces es factible que la genealogía de sus haplotipos en relación a su distribución geográfica muestre que existe una divergencia genética entre las poblaciones de la especie. Entonces, el conocimiento de las relaciones geográficas entre los haplotipos de sus poblaciones ayudaría a entender la situación taxonómica de la especie, su patrón de distribución actual y su historia evolutiva.



Fig. 8. Distribución geográfica de *Nelsonia neotomodon* (estrellas), *Nelsonia goldmani cliftoni* (cuadros) y *Nelsonia goldmani goldmani* (círculos) y la hipótesis filogenética propuesta para la relación entre los haplotipos de sus poblaciones.

Hipótesis

Se propone que:

- El taxón *N. goldmani* forma un grupo monofilético, comparten el mismo ancestro común inmediato.
- Las muestras de *N. goldmani* presentan una divergencia genética intraespecífica establecida por la fragmentación de su distribución geográfica.

Objetivo general

- Efectuar un análisis filogenético molecular de *N. goldmani* utilizando dos marcadores mitocondriales que ayuden a reconstruir una hipótesis sobre su historia evolutiva.

Objetivos particulares

- Determinar si todas las muestras de *N. goldmani* forman un grupo monofilético utilizando como marcadores moleculares los genes citocromo b (*Cytb*) y citocromo oxidasa subunidad 1 (*COI*) y conocer su ubicación filogenética con respecto a los miembros de la subfamilia Neotominae.
- Examinar la información genética generada con las muestras de la distribución geográfica conocida de *N. goldmani* para indagar acerca de su historia evolutiva general.
- Con la información filogenética generada, reconocer la existencia de dos grupos distinguibles que sugieran la existencia de las subespecies *N. g. goldmani* y *N. g. cliftoni*.
- Aportar información sobre la variación y divergencia genética intraespecífica en *N. goldmani* que contribuyan al conocimiento y conservación de la especie.

Materiales y métodos

Muestreo taxonómico

Trabajo de campo

Para la colecta de los ejemplares de *N. goldmani* se visitaron todas las localidades reportadas de la distribución de la especie, a excepción del Cerro Patambán (o Cerro Uripitijuata) en Michoacán, además de algunas localidades donde podría ser probable encontrar esta especie, ya que reunían varias características de su hábitat como altitud, clima, vegetación y humedad; estas últimas fueron en el Parque Nacional Sierra de Manantlán en Jalisco, Capácuaro y Parque Natural Los Azufres en Michoacán (Fig. 9).

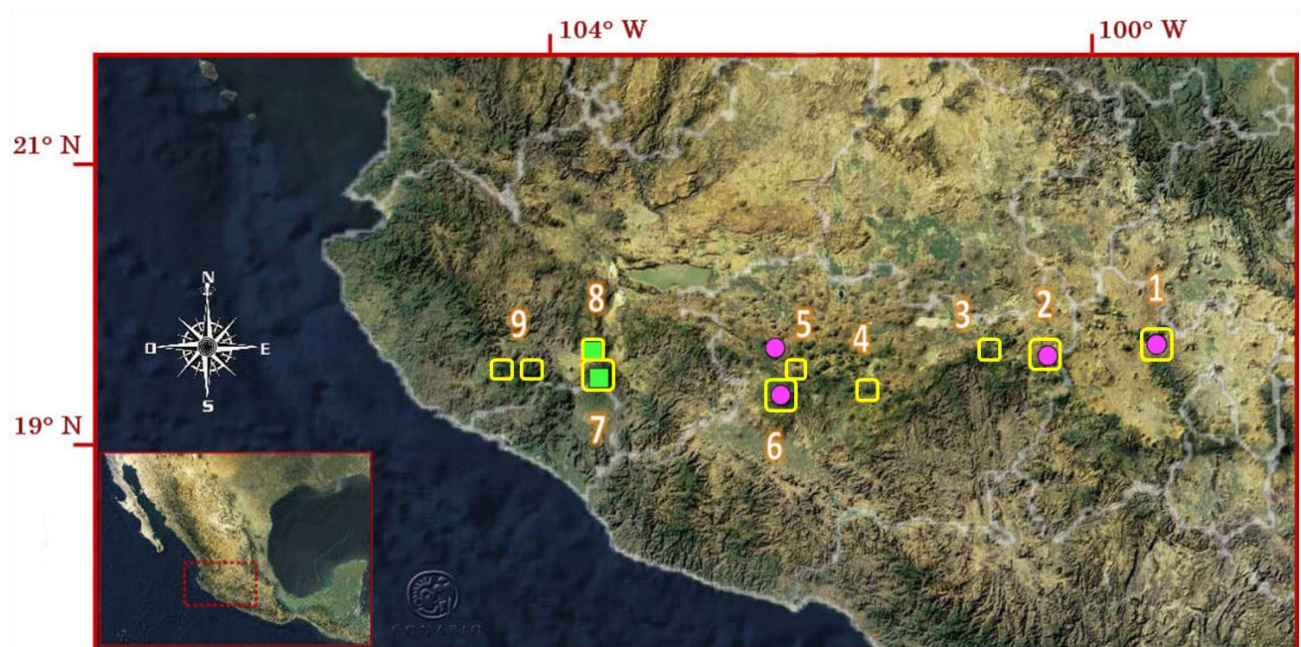


Fig. 9. Localidades donde se realizaron las salidas al campo. En el Estado de México: 1) Parque Natural “Las Peñas”, en Michoacán; 2) Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca Santuario “Sierra Chincua”, 3) Parque Natural “Los Azufres”, 4) Cerro Zirahuén, 5) Capácuaro, 6) Parque Nacional “Pico de Tancitaro”, y en Jalisco: 7) Parque Nacional “El Nevado de Colima”, 8) El Jazmín y 9) Reserva de la Biosfera “Sierra de Manantlán”.

Todos los especímenes fueron obtenidos, manipulados y procesados de acuerdo a las normas aprobadas por la American Society of Mammalogists (Kelt *et al.*, 2010; Sikes *et al.*, 2011), la colecta de los ejemplares fue bajo los permisos de colector científico expedido por la SEMARNAT para Fernando A. Cervantes FAUT-0002 y cada ejemplar colectado fue notificado a la SEMARNAT para su ingreso en la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología, UNAM.

Búsqueda de ejemplares y solicitud de muestras en colecciones biológicas

Se realizó una búsqueda en línea con la página de CONABIO en las Colecciones biológicas registradas en México (http://www.conabio.gob.mx/informacion/acttax/doctos/colecciones_cientificas.html) y en la página de MaNIS para las colecciones de Estados Unidos (<http://manisnet.org/>), además de consultas bibliográficas (López-Wilchis y López; 1998, 1999, 2000) y comunicación personal con los curadores de algunas colecciones de México y Estados Unidos para tener acceso a la base de datos y encontrar posibles ejemplares de *N. goldmani*.

Una vez obtenida la información de los ejemplares de *N. goldmani*, se solicitaron muestras de tejido y de fragmentos de piel de algunos ejemplares de México y Estados Unidos. Estas solicitudes fueron realizadas formalmente de la Colección Nacional de Mamíferos hacia cada una de las Colecciones de México y Estados Unidos con todos los requisitos particulares solicitados. Además de los permisos nacionales e internacionales requeridos por cada institución con la finalidad de realizar el acopio de tejidos de algunos de los ejemplares de las localidades faltantes y que junto con las muestras colectadas en campo, representaran todas las localidades de la distribución de *N. goldmani*.

Además, una vez obtenida la comunicación personal con los curadores de las colecciones de Estados Unidos, se les pidió información adicional sobre las localidades de colecta como parte de la bitácora personal de campo que ayudaran a aumentar las posibilidades de capturar a esta especie.

Protocolos de laboratorio

Extracción de DNA

El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido fresco o de los fragmentos de piel de los ejemplares de las colecciones biológicas usando los kits DNeasy (Qiagen) y AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen), siguiendo los protocolos del fabricante. Para las muestras históricas se utilizaron los protocolos con algunas pequeñas modificaciones que consisten en lavados previos a la extracción de DNA a partir de pieles. La integridad del DNA de cada muestra se visualizó en un transiluminador (Hofer™ MacroVue™ Dual-intensity UV) en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR® Save DNA Gel Stain (Invitrogen).

Para la extracción de DNA a partir de las pieles de los ejemplares de las colecciones biológicas, se utilizó un fragmento de aproximadamente 1 mm² al que se le hicieron al menos tres lavados previos con la solución STE (Hillis *et al.*, 1996), usando 200 µl de la solución incubando 20 minutos a 56°C por lavado para remover algunas sustancias de fumigación e hidratar las pieles.

Amplificación y secuenciación

La amplificación de los marcadores mitocondriales *COI* (654 pb) y *Cytb* (1143 pb) se llevaron a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (por sus siglas en inglés; Saiki *et al.*, 1988) usando oligonucleótidos específicos; para las muestras de piel donde la cantidad de DNA es baja y usualmente degradada, se usaron oligonucleótidos internos disponibles en la literatura para el gen *Cytb*, así como uno diseñado para este proyecto, mientras que para el marcador *COI* se diseñaron para este estudio varios oligonucleótidos internos ya que no existían en la literatura (Cuadro 2). Éstos fueron diseñados manualmente bajo las secuencias generadas de *N. neotomodon* (CNMA 39038) y *N. goldmani* (CNMA 46291) para los marcadores *Cytb* y *COI* siguiendo los requerimientos básicos recomendados por la literatura (Mitsubishi, 1996) mediante la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., 2013) disponible en línea (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). La combinación de los oligonucleótidos (Fig. 10) dependió de la calidad del DNA en cada muestra.

Las reacciones de PCR consistieron en tubos con una cantidad final de 25 µl con los siguientes concentraciones: 17.75 µl de agua desionizada (H₂O), 2.5 µl de solución búfer 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 µl/ml), 10 µM de cada dNTP, 10 µM de cada primer, 1.25 µl de MgCl₂ 20x (30 mM), 0.25 µl de Taq polimerasa (5 u/µl; Quiagen) y aproximadamente 1 µl de DNA molde para las muestras frescas (concentración estimada sobre un gel de agarosa al 1%).

Cuadro 2. Nombre de los 32 oligonucleótidos utilizados y sus secuencias para la amplificación y secuenciación de los marcadores *COI* y *Cytb* en las muestras del género *Nelsonia*. El código de ambigüedad de la IUPAC es usado para los sitios degenerados.

| Gen | Nombre | Secuencia 5' → 3' | Referencia |
|-------------------------------------|---|---|---|
| Citocromo b (Cytb) | MVZ-03 | GCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-04 | GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-05 | CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-06 | GCTGTGTCTGATGTGTAGTGTAT | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-07 | AACCCCATCTAACATTTTCWTCYTGATG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-10 | TATGAGCCGTAGTARAKKCTC | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-11 | CCTCCGTAGCCACAYWTGYCG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-16 | AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-17 | ACCTCCTAGGAGAYCCAGAHAAAYT | Smith & Patton, 1999 |
| | MVZ-23 | TACTCTTCTCCACGAAACMGNTC | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-26 | AGATCTTTGATTGTGTAGTAGGGGT | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-35 | TCTCAGAAACCTGRAAYATYGG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-39 | CAYTTACTATTTYTHCAYGARAC | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-45 | ACMACHATAGCMACAGCATTCGTAGG | Smith & Patton, 1993 |
| | MVZ-47 | AGAAATWAYHCCGCAAYC | Comunicación personal con Patton, 2011 |
| | CNMAF01 | CAGCAAATCCACTCAAYACTC | Diseñado en este proyecto |
| | H15915 | GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGA | Irwin <i>et al.</i> , 1991 |
| L15775 | GTAAAACGACGGCCATACATGAATTGGAGGACAACCAGT | Irwin <i>et al.</i> , 1991 | |
| citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) | VF2_t1 | TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |
| | FishF2_t1 | TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |
| | FishR2_t1 | CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |
| | FR1d_t1 | CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |
| | CNMACOIF2 | TCTATAGTWGAAGCAGGAGCTGG | Diseñado en este proyecto |
| | CNMACOIF3 | AATAAATAATATAAGYTTYTGACTYC | Diseñado en este proyecto |
| | CNMACOIR1 | AGAARATGGTTAGGTCTACTGAAGC | Diseñado en este proyecto |
| | MNeIF1 | ATTACYACYATCATCAATATAAAAACC | Comunicación personal con Ivanova, 2011 |
| | CNMACOIR2 | GTGGTTTTATATTGATGATRGTRGT | Diseñado en este proyecto |
| | CNMACOIR3 | GTAGRAGTCARAARCTTATATTATT | Diseñado en este proyecto |
| | CNMACOIF4 | GRTTTGGTAAATGATTAGTYCC | Diseñado en este proyecto |
| | CNMACOIR4 | ARTACGGCTGTRATGAGWACTG | Diseñado en este proyecto |
| | LepF1_t1 | TGTA AACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |
| | LepR1_t1 | CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA | Ivanova <i>et al.</i> , 2007 |

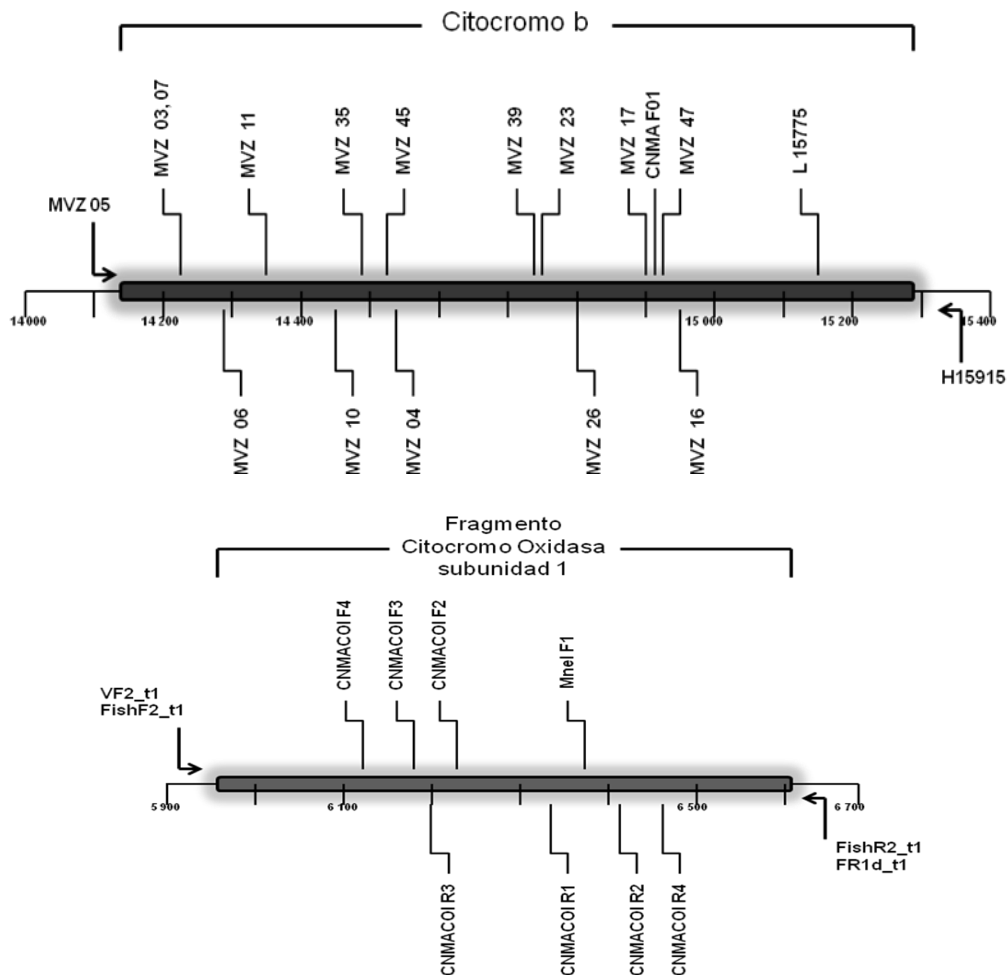


Fig. 10. Diagrama de la posición de los oligonucleótidos usados para la amplificación y secuenciación de los marcadores mitocondriales *Cytb* (basado de Smith & Patton, 1993) y del fragmento de *COI* para el género *Nelsonia*.

Estas amplificaciones se realizaron en un termociclador Maxygen Gradient (Therm-1001) con los siguientes parámetros para el marcador *COI*: 94°C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, alineación de 40 s a 52°C y extensión de 72°C por 1 minuto y una extensión de 10 minutos a 72°C (Ivanova *et al.*, 2007). Las condiciones de amplificación para el gen *Cytb* fueron: 92°C por 15 s, seguido de 39 ciclos de 15 s a 92°C, 60 s a 50-55°C y 70 s a 72°C, por último una extensión de 4 min a 72°C (Edwards y Bradley, 2002). Los productos de PCR fueron purificados usando el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) ó AxyPrep™ PCR Clean up (Axygen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con los mismos oligonucleótidos de la amplificación mediante el kit de secuenciación Big Dye (ABIPRISM, Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron en un volumen total de 12 µl con los siguientes volúmenes: 1 µl de Terminador ready reaction mix, 3 µl de búfer 2.5x, 1 µl de oligonucleótidos y 6 µl del producto purificado, mientras los ciclos de la reacción se llevaron a cabo en un termociclador GenAmp 9700 (Applied Biosystems) con 25 ciclos de 5 min a 96°C, 10 s a 96°C, 5 s a 50°C y 4 min a 60°C. Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados usando sephadex (50 mg) en columnas Centri-sep (Princeton Separations P/N CS-901). Posteriormente las purificaciones fueron enviadas a un secuenciador de 16 capilares 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del Instituto de Biología de la UNAM para la generación del gráfico con las secuencias de nucleótidos (electroferograma) en las dos direcciones para cada fragmento amplificado, los electroferogramas obtenidos con baja calidad no fueron tomados en cuenta y el fragmento fue amplificado y secuenciado nuevamente hasta obtener datos confiables.

Análisis de los datos

Los electroferogramas de cada fragmento amplificado fueron revisados visualmente para la generación de la secuencia consenso para cada marcador. De tal manera que las secuencias fueron editadas, ensambladas y alineadas usando el programa BioEdit versión 7.0.7.0 (Hall, 1999). Posteriormente para verificar la autenticidad de cada secuencia de cada marcador molecular se realizó un BLAST para compararlas con las disponibles en el portal de GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Se sabe que el trabajo de laboratorio con muestras de piel antiguas es complicado, principalmente por la autenticidad de las secuencias, por lo que las precauciones sugeridas por la literatura para la obtención de las secuencias fueron estrictamente tomadas en cuenta. Por ejemplo, privilegiar extracciones de DNA independientes por especie y localidad, reacciones de PCR independientes por localidad, nuevas extracciones en muestras complicadas para amplificar, nuevas reacciones de PCR y reacciones de secuenciación en muestras divergentes, la existencia de la relación inversa entre la longitud de fragmentos obtenidos por PCR y edad de la muestra, y amplificación de fragmentos no muy pequeños, entre otras (Su *et al.*, 1998; Hofreiter *et al.*, 2001;

Sefc et al., 2006; Martínková y Searle, 2006; Wandeler, 2007; Montiel y García-Sívoli, 2007; Dubey *et al.*, 2009).

Además de las secuencias generadas, para ampliar el muestreo taxonómico, se utilizaron secuencias del marcador *COI* descargadas de Bold Systems (<http://www.barcodinglife.com/>); todas las secuencias a excepción de siete pertenecen a ejemplares de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) que fueron procesadas en la Universidad de Guelph en Canadá como parte de un proyecto de Código de Barras, mientras que las secuencias para el gen *Cytb* fueron descargadas del portal de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las subfamilias de roedores de la familia Muridae incluidas fueron Neotominae, Sigmodontinae y Tylomyinae. El apéndice 1 muestra los números de catálogo de la CNMA y los números de acceso para las secuencias en GenBank.

Para evaluar los niveles de diferenciación entre las secuencias de cada marcador se estimó la distancia genética con el modelo de sustitución de ADN Kimura 2 parámetros (Kimura 1980) utilizando el programa MEGA versión 5.10 (Tamura *et al.*, 2011). El modelo Kimura 2 parámetros fue seleccionado para hacer las distancias genéticas generadas comparables con las de otros roedores (Bell *et al.*, 2001; Edwards y Bradley, 2002; Amman y Bradley, 2004).

Como el gen citocromo b y el marcador citocromo oxidasa subunidad 1 son codificantes (Irwin *et al.*, 1991; Griffiths, 1997; Wu *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001), antes de realizar los análisis filogenéticos se empleó para cada gen una prueba para conocer la saturación de bases ya que se sabe que si existe una mayor probabilidad de cambios múltiples en una sola posición nucleotídica podría equivaler a falsas señales e inferencias filogenéticas (Griffiths, 1997). La prueba consistió en colocar en una gráfica las diferencias no corregidas entre los pares de secuencias de los taxones (distancia de las secuencias “p”) contra las distancias corregidas con el modelo Kimura-2 (Kimura, 1980) para cada posición del codón y para transiciones y transversiones por separado y así evaluar si existe saturación para alguna sustitución, de tal forma que si los puntos de las distancias corregidas caen por debajo de la posición de los puntos en las distancias no corregidas indican cambios múltiples y por lo tanto, la saturación se alcanza cuando la divergencia entre las distancias de las secuencias alcanzan un máximo (asíntota) y no continúan en crecimiento.

Complementariamente para justificar un análisis concatenado con los dos marcadores moleculares, se realizó un análisis de heterogeneidad calculando el índice de disparidad (ID) para

cada gen en MEGA versión 5.10 (Tamura *et al.*, 2011), para evaluar la probabilidad de rechazar la hipótesis nula de que las secuencias han evolucionado con el mismo patrón de sustitución, una prueba de Monte Carlo de 1,000 réplicas fue utilizada para estimar los valores de $p=0.05$ (Kumar y Gadagkar, 2001).

Esta prueba compara la diferencia en la composición de bases observada entre pares de secuencias con la diferencia composicional de bases que se esperaría si las secuencias estuvieran evolucionando bajo equilibrio, de tal manera que dos secuencias que son perfectamente homogéneas tendrán un valor ID de cero, mientras valores más altos reflejarán un aumento en la composición de bases entre las secuencias (Rosenberg y Kumar, 2003). Los valores de p menores de 0.05 entre los pares de secuencias fueron considerados significantes (homogéneas), y por último, el número de pares de secuencias que mostraron diferencias significativas se contó para cada gen. Complementariamente, el modelo Kimura 2 parámetros se utilizó para comparar las tasas de sustitución por sitio entre los dos genes.

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo para cada marcador y las dos secuencias concatenadas, todas las posiciones de los codones fueron utilizadas en los análisis. Como fue recomendado por Barriel y Tassy (1998) se utilizó más de un grupo externo para los análisis filogenéticos, usando las cuatro secuencias de la subfamilia Sigmodontinae (Apéndice 1), todos los árboles fueron enraizados con este grupo.

Análisis de Parsimonia- El análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizó empleando una búsqueda heurística con intercambio de ramas tree bisection and reconnection (TBR), usando 1000 replicas de adición de secuencias al azar, eliminando los sitios no informativos mediante el programa PAUP* versión 4.0b (Swofford, 2002). Las posiciones nucleotídicas fueron tratadas según los resultados de la prueba de saturación de bases, los gaps presentes por la ausencia de amplificación fueron tratados como datos faltantes. Posteriormente con los árboles igualmente parsimoniosos se realizó un árbol de consenso estricto, los valores de soporte nodal se obtuvieron mediante un análisis de bootstrap que consistió en 1000 pseudoréplicas (Felsenstein, 1985), cada

una consistió en una búsqueda heurística con 100 replicas de adición de taxones al azar e intercambio de ramas por TBR para generar el árbol con los valores de soporte nodal.

Selección del Modelo Evolutivo- Se identificaron los mejores modelos evolutivos para cada conjunto de datos usando el criterio de información de Akaike (Akaike, 1973; Posada y Buckley, 2004) mediante el programa jModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012).

Análisis de Máxima Verosimilitud- Se llevaron a cabo 10,000 inferencias rápidas de bootstrap y una posterior búsqueda minuciosa de la topología con la mayor verosimilitud mediante el programa RaxML7.0.4 con el modelo GTR debido a que sólo implementa éste.

Análisis Bayesiano- Como complemento se realizó únicamente para los datos concatenados un análisis de Inferencia bayesiana con el programa MrBayes versión 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) usando los mejores modelos evolutivos de cada partición de datos con los parámetros separados. El análisis de las cadenas de Markov consistieron en dos corridas independientes de 10^7 generaciones en las cuales los árboles fueron muestreados cada 10^3 generaciones. Una vez que la convergencia fue alcanzada y determinada con el programa Tracer versión 1.5.0 (Rambaut y Drummond, 2003), la etapa de burnin se estimó visualmente, y con los árboles restantes se construyó un árbol de consenso de regla de la mayoría para generar el soporte nodal con las probabilidades posteriores.

Estimación del tiempo de divergencia- para estimar el tiempo de divergencia de las muestras del género *Nelsonia* se utilizó el programa *BEAST versión 1.6.0 (Drummond y Rambaut, 2007). El análisis fue llevado a cabo usando un árbol previo debido a que en varios análisis independientes utilizando un árbol inicial al azar no se alcanzaban convergencia en las corridas y se generaban topologías diferentes con inconsistencias grandes. De esta manera, se utilizó el árbol generado con el programa Mr. Bayes con los datos concatenados como el árbol inicial en el análisis. Este árbol fue calibrado usando el estimado del origen de los Neotominos por Steppan *et al.* (2004) el cual consideró un mínimo de 7 y máximo de 11 millones de años para el origen de este grupo. El análisis usó un reloj relajado con una distribución lognormal permitiendo variación de tasas entre sitios. Dos análisis independientes se corrieron por 10^7 generaciones cada uno, muestreando cada 10^3 generaciones. Los estadísticos de convergencia fueron revisados en Tracer versión 1.5.0 (Rambaut y Drummond, 2003) y el árbol de consenso fue generado con los 20×10^3 árboles usando TreeAnnotator versión 1.6.0 (Rambaut y Drummond, 2009) después de la eliminación del 10% como burnin.

Resultados

Muestreo taxonómico

Trabajo de campo

En total se obtuvieron cinco ejemplares de *N. goldmani* en 21 salidas al campo durante los años 2010 al 2012; dos ejemplares de *N. g. goldmani* colectados el 16 de octubre de 2010 que corresponden a la localidad de Jilotepec, Estado de México (CNMA 46291 y CNMA 46292) y tres ejemplares de *N. g. cliftoni*, uno colectado el 14 de diciembre de 2011 (CNMA 46290) y dos colectados en diciembre del 2012 (Fac 4611 y Fac 4620) dentro del Nevado de Colima, Jalisco.

Ejemplares depositados en colecciones biológicas

Como resultado de la búsqueda, sólo se encontraron en colecciones de México dos ejemplares de *N. g. goldmani* en la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA), y la captura reportada de dos ejemplares de *N. g. goldmani* en el Cerro de San Marcos en Michoacán y depositados en el INIFAP de Uruapan (Orduña *et al.*, 2000), sin embargo al contactar con el director de esa institución no se obtuvo ninguna información sobre la ubicación ni del número de catálogo de tales ejemplares. Por otro lado, en las Colecciones de Estados Unidos se encontraron 35 ejemplares en diferentes colecciones, donde se incluye el registro de una nueva localidad no reportada antes de dos ejemplares de *N. g. goldmani* depositados en la California Academy of Sciences (CAS; Apéndice 2).

Los dos ejemplares fueron colectados en el centro de Michoacán al sur de Pátzcuaro, dentro del área conocida como “Cuenca del Lago de Zirahuén” en los municipios de Santa Clara del Cobre y una pequeña porción de Pátzcuaro. Esta área se encuentra definida por serranías, lomeríos y cadenas montañosas que la circundan por completo (Cerros El Frijol, Burro, Janamo, Zimbicho, La Tapada, Cofradía y Zirahuén) que alcanzan altitudes de hasta 3 000 metros. La vegetación que predomina es el bosque de pino (*Pinus leiophylla*, *P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. levoniana*), bosque de oyamel (*Abies religiosa*), bosque de encino (*Quercus*

castanea, *Q. crassipes*, *Q. dysophylla*, *Q. laurina*, *Q. obtusata*, *Q. rugosa*), mientras el bosque mesófilo de montaña es el tipo de vegetación con el área más reducida y discontinua (Pérez-Calix, 1996).

Por otra parte, se lograron obtener un total de 17 muestras históricas de los ejemplares depositados en colecciones biológicas de Estados Unidos que representan toda la distribución geográfica de *N. goldmani* conocida hasta ahora, además se obtuvieron dos ejemplares de la especie hermana *N. neotomodon* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Colecciones Biológicas de México y Estados Unidos de donde se obtuvieron las muestras históricas de *Nelsonia goldmani* y *Nelsonia neotomodon* para este estudio.

| Especie | Colección | Acrónimo | Número Voucher | Localidad | Fecha de colecta | Preservación | |
|---|---|----------|----------------|--|------------------------------|-----------------|------|
| <i>Nelsonia goldmani</i> | Florida Museum of Natural History | UFMNH | 20979 | Sierra Chincua, Michoacán | 13-marzo-1985 | Isopropanol | |
| | California Academy of Sciences | CAS | 151587 | Pátzcuaro, Michoacán | 31-agosto-1959 | Piel | |
| | | | 151588 | | 30-agosto-1959 | Piel | |
| | | | | 125601 | Cerro Patambán | 30-enero-1903 | Piel |
| | | | | 125602 | (Uripitijahua), Michoacán | 30-enero-1903 | Piel |
| | | | | 125604 | | 02-febrero-1903 | Piel |
| | National Museum of Natural History | USNM | | 125814 | Parque Nacional | | |
| | | | | 125815 | Pico de | 23-febrero-1903 | Piel |
| | | | | 125816 | Tancítaro, | 23-febrero-1903 | Piel |
| | | | | 125817 | Michoacán | 24-febrero-1903 | Piel |
| <i>Nelsonia goldmani</i> <i>cliftoni</i> | Louisiana State University Museum of Zoology | LSUMZ | 10455 | Parque Nacional El Nevado de Colima, Jalisco | 22-junio-1965 | Piel | |
| | Natural History Museum of Los Angeles County | LACM | 037736 | Parque Nacional El Nevado de Colima, Colima y Jalisco | 12-abril-1968 | Piel | |
| | | | 037737 | | 12-abril-1968 | Piel | |
| | | | | 011536 | | 09-julio-1959 | Piel |
| | | | | 011537 | | 07-julio-1959 | Piel |
| Natural History Museum, University of Kansas | UK | | 109440 | El Jazmín, Jalisco | 21-octubre-1966 | Piel | |
| | | | 111953 | | 08-febrero-1967 | Piel | |
| <i>Nelsonia neotomodon</i> | Colección Nacional de Mamíferos | CNMA | 39038 | El Taray, Suchíl, Durango | 04-agosto-1995 | Piel | |
| | CIIDIR Durango | CIIDIR | CRD3737 | Guachochi, Chihuahua | 12-noviembre- 2002 | Fresco | |

Análisis de los datos

En total se obtuvieron 22 secuencias (17 de muestras históricas y cinco recientes) de *N. goldmani* del gen citocromo b (*Cytb*; 1143 pb) y 21 de citocromo oxidasa subunidad 1 (*COI*; 650 pb), debido a que la muestra USNM 125815 de *N. g. goldmani* no se pudo amplificar para este gen. También se obtuvieron las dos secuencias de la especie hermana *N. neotomodon* para los dos genes. Se ha reportado que el éxito en las amplificaciones de muestras históricas no siempre es del 100%, ya que la tasa de éxito en las amplificaciones de los fragmentos varía entre los ejemplares de cada colección biológica (Su *et al.*, 1999; Martínková y Searle, 2006; Wandeler *et al.*, 2007). No obstante, en este trabajo se logró amplificar el 98% de las muestras.

En las secuencias de los dos marcadores no se detectó ninguna inserción ni delección, tampoco se encontró la presencia de codones de terminación. La frecuencia nucleotídica para las secuencias de *Nelsonia* del gen *COI* fue de 29.4% A, 23.8% C, 16.8% G y 30% T, mientras que para el gen *Cytb* fueron de 34% A, 28% C, 12% G y 26% T. La divergencia genética promedio con el modelo Kimura 2 parámetros entre las secuencias de *N. neotomodon* y *N. goldmani* fue de 8.32% en el gen *COI* y de 9.13% para *Cytb*. Por otro lado, el intervalo de divergencia genética dentro de *N. goldmani* fue de 0-14.77% para el gen *COI* y de 0-15.73% para *Cytb* (Apéndice 3); los valores más altos de divergencia se presentan entre las secuencias de los ejemplares de *N. g. cliftoni* y las de *N. g. goldmani*.

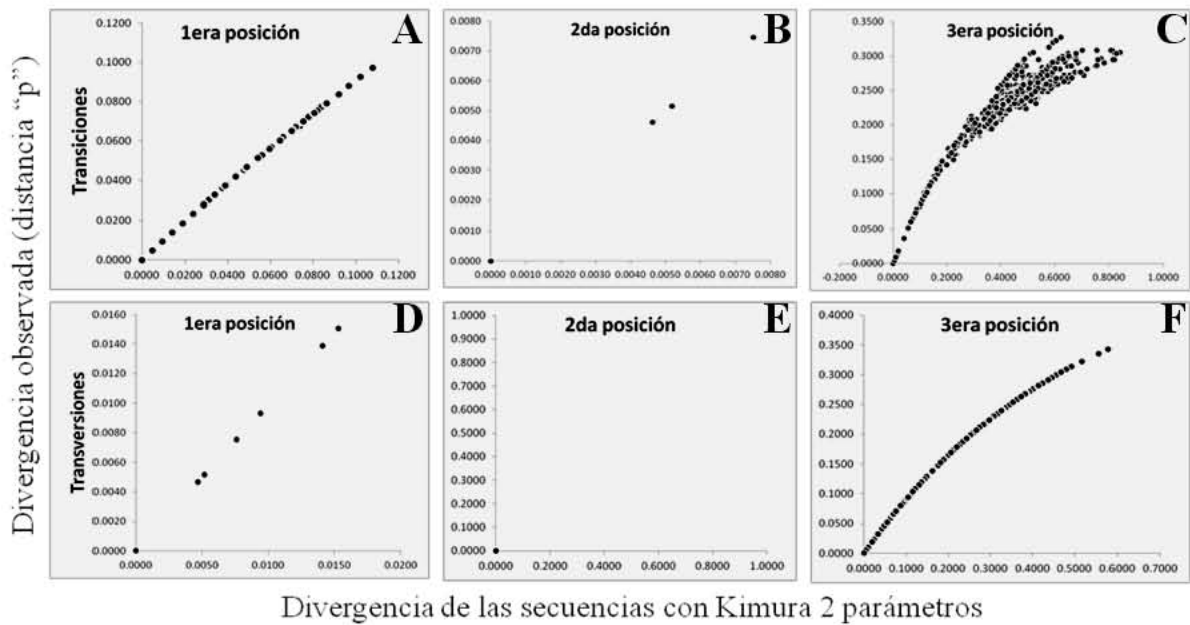
Para el análisis completo con las secuencias bajadas de genbank se tuvieron 51 secuencias de citocromo b y 50 de citocromo oxidasa subunidad 1 que en total sumaron 1793 caracteres, este muestreo representa a tres de las cuatro subfamilias de los Múridos en México; 3 géneros de la subfamilia Sigmodontinae, 8 géneros para Neotominae y 3 de Tylomyinae (Apéndice 1). La divergencia entre las secuencias con el modelo Kimura 2 parámetros se muestra en el apéndice 3, y la composición estadística de las secuencias para ambos genes se resume en el cuadro 4.

Cuadro 4. Composición estadística de las secuencias de *Nelsonia goldmani* y otros móridos muestreados en diferentes posiciones de codones para los genes citocromo oxidasa subunidad 1 y citocromo b.

| Parámetro | Citocromo oxidasa subunidad 1 | | | | Citocromo b | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|---------|------------|-----------|-------------|-----------|------------|-----------|
| | Primera | segunda | Tercera | Total | primera | Segunda | Tercera | Total |
| Longitud pares de bases | 217 | 217 | 217 | 651 | 381 | 381 | 381 | 1143 |
| Sitios variables: número (%) | 41 (16.5) | 0 (0) | 208 (83.5) | 249 (100) | 152 (26.2) | 73 (12.6) | 355 (61.2) | 580 (100) |
| Sitios informativos: número (%) | 36 (15.4) | 0 (0) | 198 (84.6) | 234 (100) | 124 (24.4) | 47 (9.3) | 336 (66.3) | 507 (100) |
| Porcentaje promedio de A | 25.8 | 15.2 | 45.7 | 28.9 | 30.7 | 20.7 | 45.3 | 32.2 |
| Porcentaje promedio de C | 23.7 | 28.2 | 21.8 | 24.6 | 24.1 | 24.3 | 35.2 | 27.9 |
| Porcentaje promedio de G | 31.2 | 14.2 | 4.6 | 16.7 | 22.0 | 12.9 | 2.0 | 12.3 |
| Porcentaje promedio de T | 19.3 | 42.4 | 27.9 | 29.9 | 23.2 | 42.1 | 17.5 | 27.6 |

La prueba para la saturación de bases dio como resultado tendencias lineales para las primeras posiciones en las transiciones (Fig. 11A y 11G) como en las transversiones (Fig. 11D y 11J) para los dos marcadores, la segunda posición de *Cytb* formó nuevamente una tendencia lineal para transiciones y transversiones (Fig. 11H y 11K) y para la segunda posición en transiciones y transversiones en *COI* es muy conservador (11B y 11E). Para las terceras posiciones en las transversiones (Fig. 11F, 11L) se encontró una tendencia lineal que sugiere que no existen sustituciones múltiples. Sin embargo, para los dos marcadores en las transiciones de la tercera posición (Fig. 11C, 11I), como se esperaba, mostraron una leve desviación de la tendencia lineal. Se sabe que en el genoma mitocondrial las transiciones ocurren en una tasa más alta que las transversiones, en particular en las terceras posiciones (Brown *et al.*, 1982; Moritz *et al.*, 1987; Miyamoto y Boyle, 1989; Griffiths, 1997), por lo que las tendencias en las transiciones del tercer codón para los dos genes se consideraron como bajo nivel de saturación. Se ha demostrado que las sustituciones en las terceras posiciones son filogenéticamente informativas siempre y cuando las secuencias sean moderadamente saturadas (Yoder *et al.*, 1996; Poux y Douzery 2004), por lo tanto, en los análisis se usaron todas las posiciones del codón y se les asignó el mismo peso a todos los cambios.

Citocromo oxidasa subunidad 1



Citocromo b

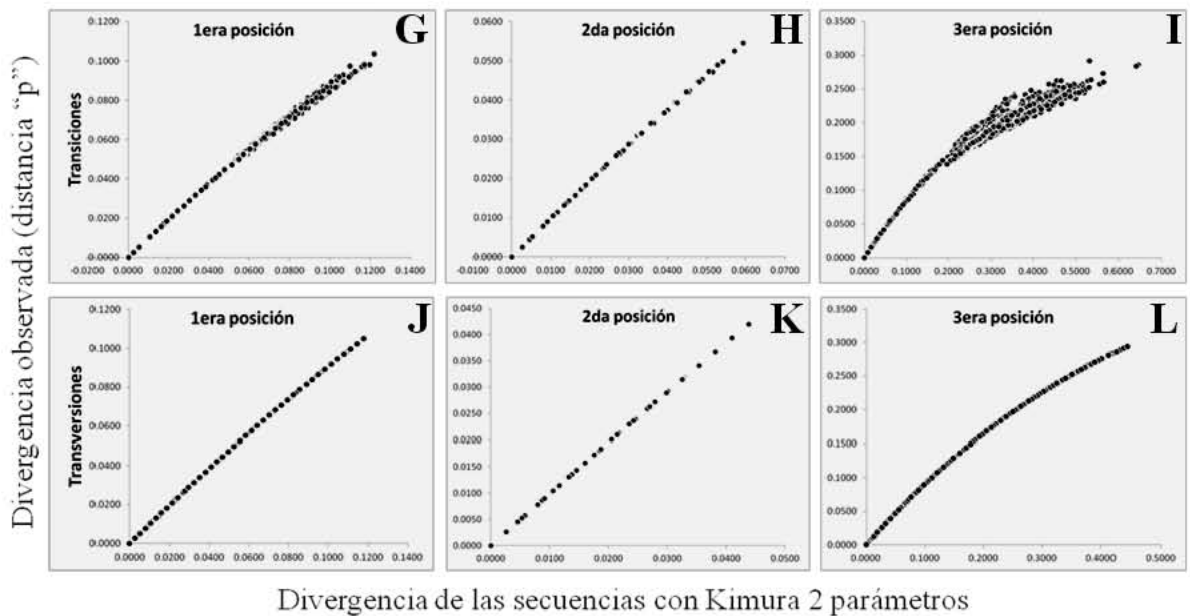


Figura 11. Prueba de saturación de bases en seis particiones para el gen citocromo oxidasa subunidad 1 (Arriba; A-F) y citocromo b (Abajo G-L). La distancia observada (distancia "p") en pares entre las secuencias dentro de cada partición fue graficada contra la distancia en pares entre las secuencias con el modelo Kimura 2 parámetros. Para el gen citocromo oxidasa sub unidad 1; transiciones en la primera (A), segunda (B) y tercera posición (C), transversiones en la primera (D), segunda (E) y tercera posición (F), y para el gen citocromo b; transiciones en la primera (G), segunda (H) y tercera posición (I), transversiones en la primera (J), segunda (K) y tercera posición (L).

Por otro lado, con el índice de disparidad se encontró que el 27.5% de los pares de secuencias en el gen citocromo oxidasa subunidad 1 son significativamente diferentes (heterogéneos) contra el 27.8% en las secuencias del gen citocromo b. Esto indica que los dos genes tienen frecuencias nucleotídicas similares y disminuye la probabilidad de inferencias filogenéticas erróneas debido a esta causa (Rosenberg y Kumar, 2003). Además, la comparación de las tasas de sustitución por sitio entre los dos marcadores indicó que son similares, al menos entre las secuencias del género *Nelsonia* (Fig. 12). Por lo tanto, un análisis combinado de las dos particiones de datos fue justificado (Huelsenbeck *et al.*, 1996).

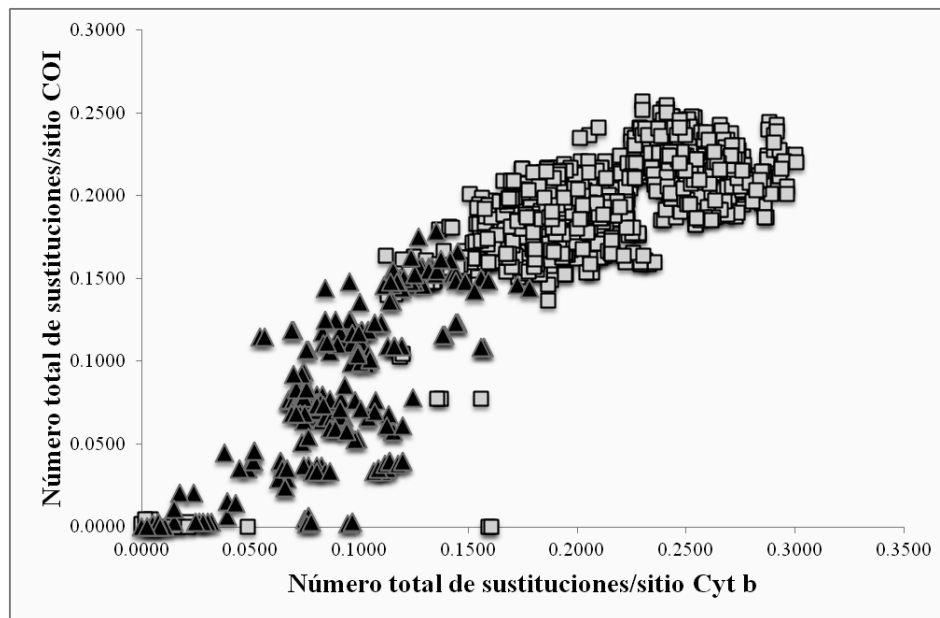


Figura 12. Comparación de las tasas de sustitución por sitio entre el marcador citocromo oxidasa subunidad 1 y citocromo b utilizando el modelo Kimura 2 parámetros. Los triángulos son la comparación entre las secuencias del género *Nelsonia* y los cuadrados la comparación entre las secuencias de los taxones restantes (subfamilias Sigmodontinae, Tylomyinae y Neotominae; Apéndice 1).

Análisis filogenético

Citocromo oxidasa subunidad I (COI)

Para el análisis de parsimonia, en total 417 caracteres fueron excluidos de la matriz dejando 234 caracteres informativos para el análisis (cuadro 3). La búsqueda heurística dio como resultado seis árboles más parsimoniosos (1,317 pasos, índice de consistencia= 0.3166, índice de retención= 0.7107), el árbol de consenso estricto con valores de bootstrap se muestra en la figura 13.

Tres clados fueron identificados: clado I que consistió en *N. neotomodon* y *N. goldmani*, clado II que comprendió a 7 géneros de la subfamilia Neotominae (*Neotoma*, *Xenomys*, *Hodomys*, *Peromyscus*, *Osgoodomys*, *Reithrodontomys* y *Scotinomys*), y el clado III que contuvo a los géneros *Tylomys* y *Ototylomys* de la subfamilia Tylomyinae. El género *Baiomys* no se agrupó con ningún clado, sino fue la rama hermana de los clados I y II, de la misma manera *Nyctomys* fue la rama hermana de los clados I, II y la rama *Baiomys*.

El clado I forma un grupo monofilético con respecto a los diferentes grupos externos aunque con un bajo soporte bootstrap (59%), mientras que el subclado que representa a *N. goldmani* formó un grupo monofilético fuertemente soportado (99%) al igual que *N. neotomodon* (100%). Dentro del grupo *N. goldmani* resalta un subclado formado por las muestras de la subespecie *N. g. cliftoni* que tienen un soporte del 99%.

La selección del modelo evolutivo mediante el criterio de información de Akaike mostró que el modelo GTR+I+G fue el más adecuado. Los parámetros encontrados para el análisis de máxima verosimilitud fueron: frecuencia de bases estimadas de los datos (A: 0.289041, C: 0.245577, G: 0.166765, T: 0.298617), una proporción de sitios invariables (I= 0.596544), una desigual distribución de tasas de sustitución en los sitios variables (G= 1.622323) y los seis diferentes tipos de sustitución (A↔C: 8.910263, A↔G: 38.014172, A↔T: 20.888623, C↔G: 0.000017, C↔T: 121.914256, G↔T: 1.000000).

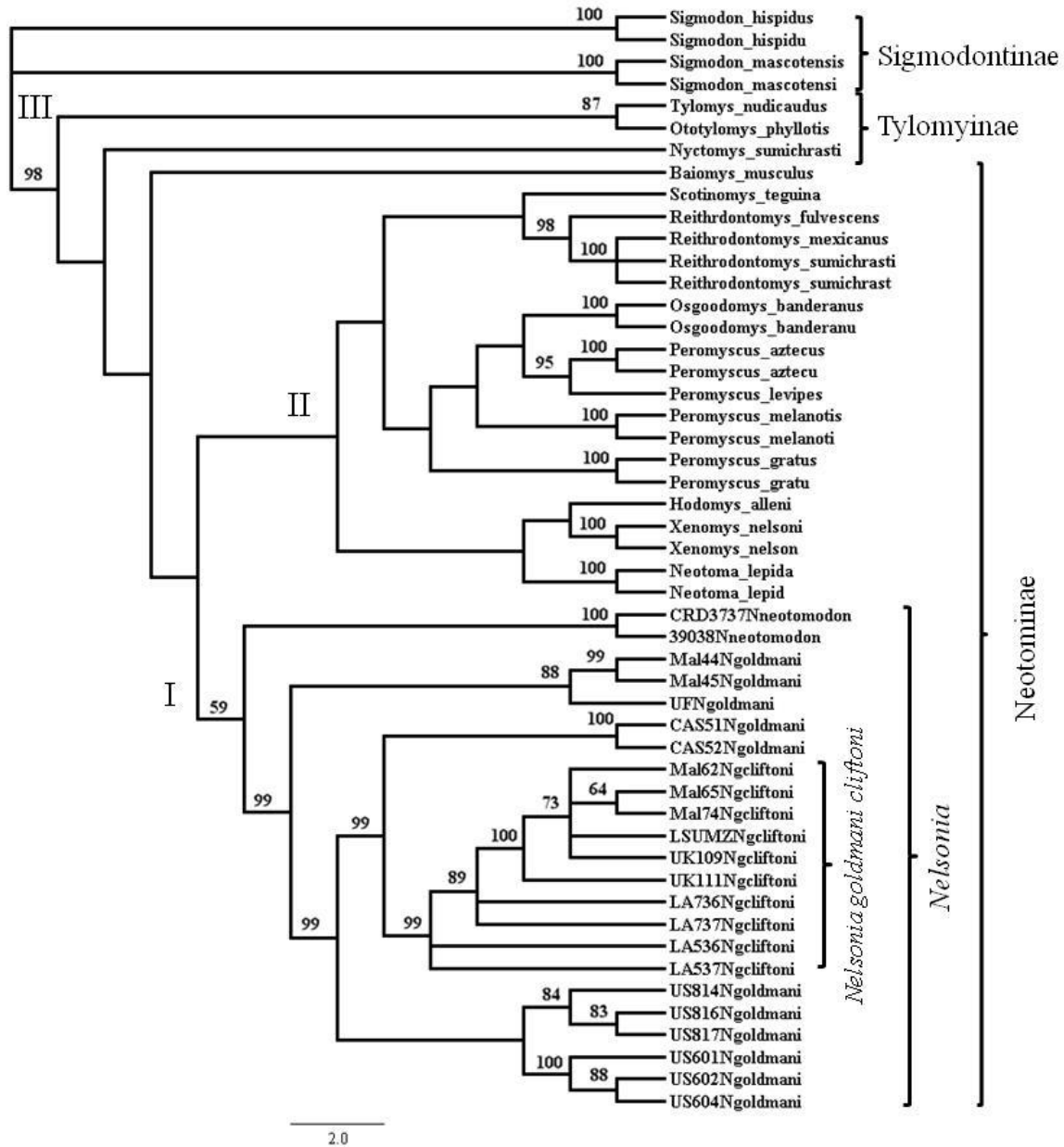


Figura 13. Árbol de consenso estricto (máxima parsimonia) del gen citocromo oxidasa subunidad generado con las muestras de *Nelsonia*. Los valores de apoyo de bootstrap mayores del 50% se encuentran arriba de cada rama.

La topología con este análisis fue muy parecida a la obtenida con máxima parsimonia (Fig. 14), el clado I fue idéntico conteniendo a *N. neotomodon* y *N. goldmani* con un soporte de bootstrap mayor al de máxima parsimonia (77%), pero con menor soporte para el clado de *N. goldmani* (91%). El clado III también fue idéntico, sin embargo el clado II obtenido en el análisis de máxima parsimonia no se recuperó con máxima verosimilitud, ya que el género

Reithrodontomys fue el grupo hermano de el clado I y los géneros *Hodomyx*, *Xenomys* y *Neotoma* y a su vez el género *Scotinomys* fue el grupo hermano de todos los anteriores. Una diferencia notable obtenida con este análisis es que el subclado que contiene a los géneros *Hodomyx*, *Xenomys* y *Neotoma* se une como clado hermano de *Nelsonia* con un soporte de 37%.

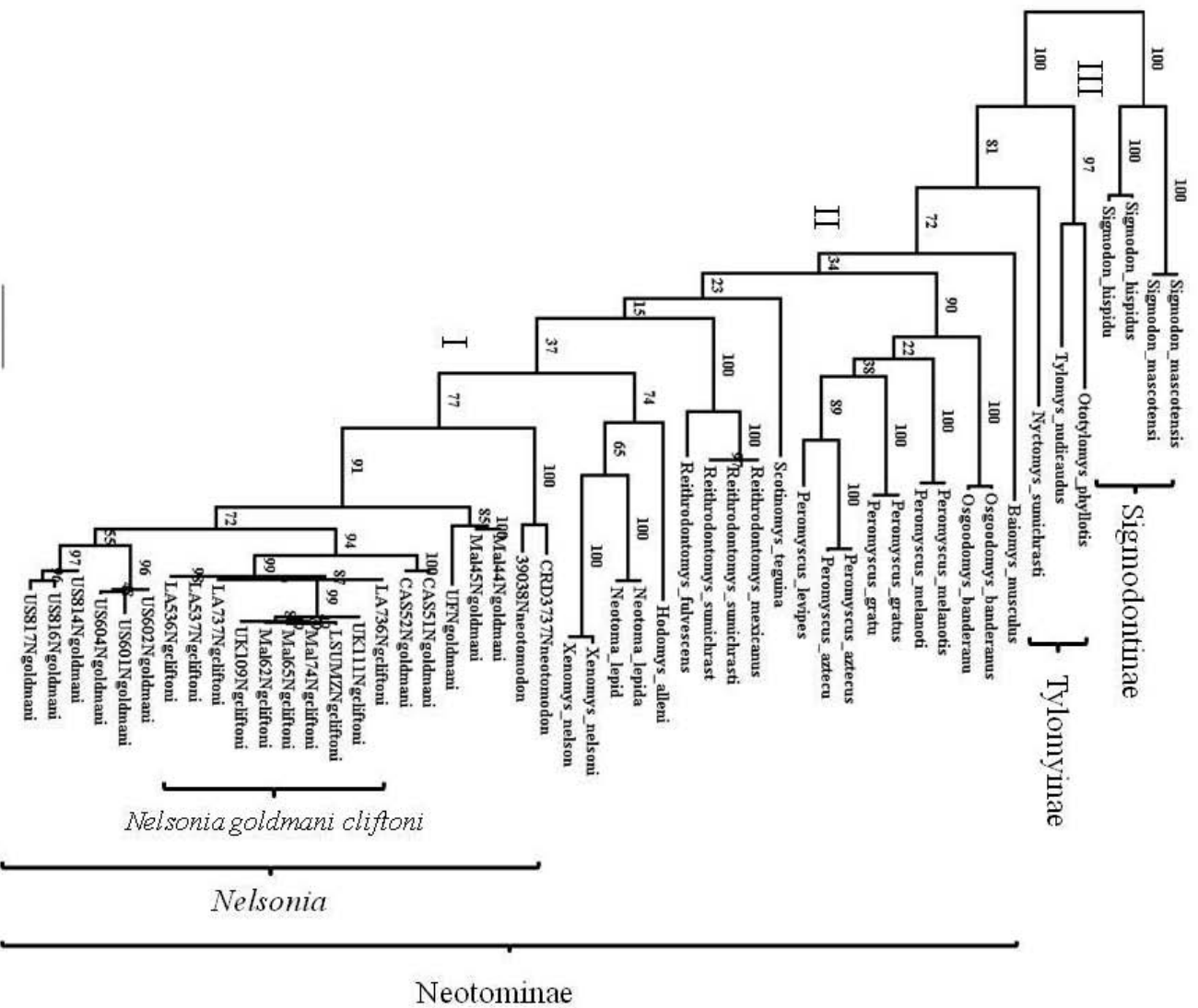


Figura 14. Topología obtenida con el análisis de máxima verosimilitud del gen citocromo oxidasa subunidad I generado con las muestras de *Nelsonia*. Los valores de apoyo de bootstrap se encuentran arriba de cada rama.

Citocromo b (Cytb)

Bajo el criterio de parsimonia, 636 caracteres fueron excluidos en el análisis dejando 507 caracteres informativos (cuadro 4). La búsqueda heurística dio como resultado cuatro árboles igualmente parsimoniosos (2,868 pasos, índice de consistencia= 0.3243, índice de retención= 0.6439), el árbol de consenso estricto fue construido con los cuatro árboles (Fig. 15).

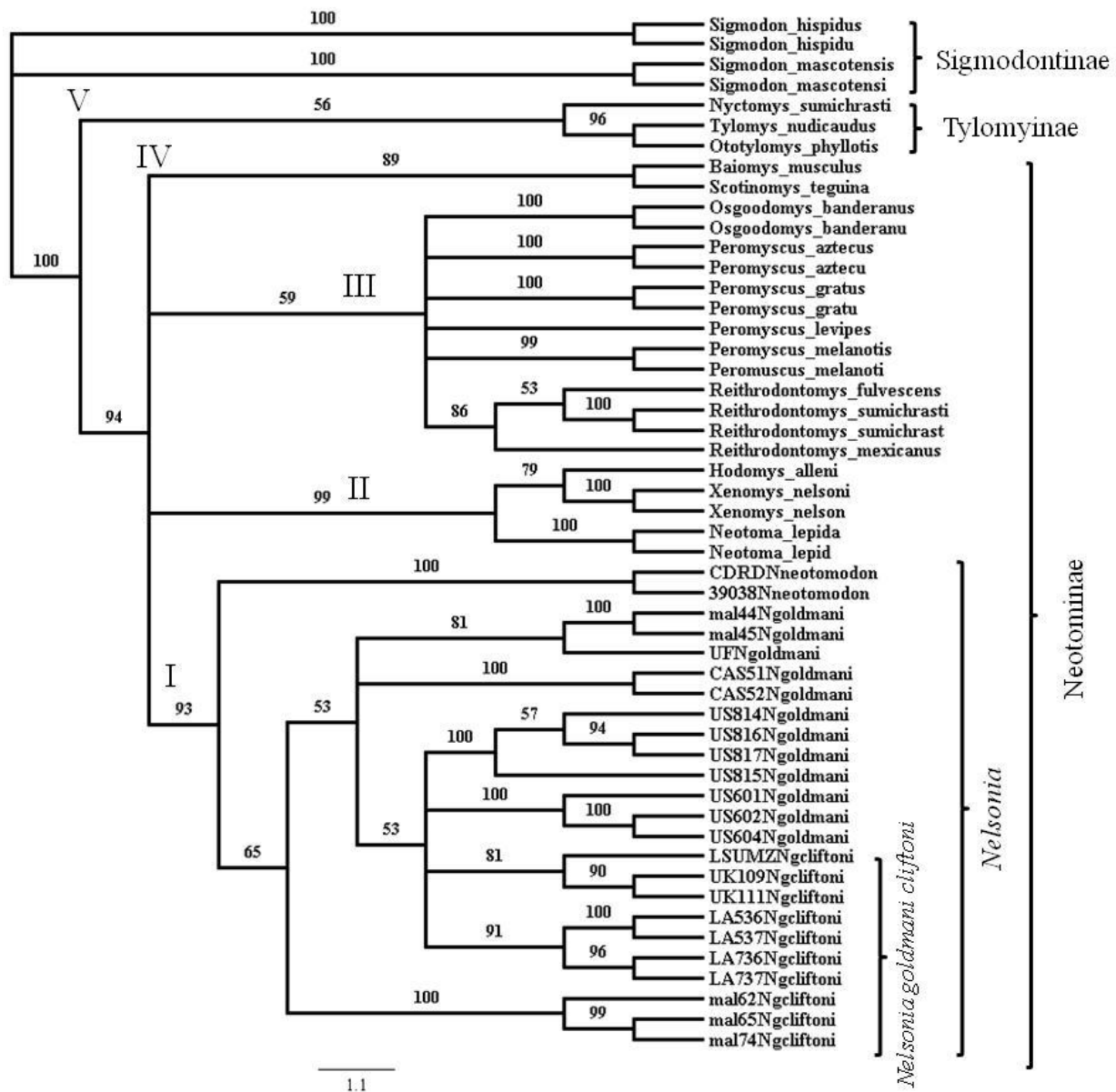


Figura 15. Árbol de consenso estricto (máxima parsimonia) generado con los cuatro árboles más parsimoniosos del gen citocromo b con las muestras de *Nelsonia*. Los valores de apoyo de bootstrap se encuentran arriba de cada rama.

En este análisis se identificaron cinco clados, cada clado consistió de diferentes taxones comparados con el análisis de *COI* a excepción del clado I. El clado I está representado nuevamente por *N. neotomodon* y *N. goldmani* soportados por un 93%, y las dos especies separadas en dos subclados, donde *N. goldmani* tiene un soporte bajo de bootstrap (65%). Por otro lado, la topología dentro del grupo *N. goldmani* fue diferente al análisis con *COI* ya que se encontraron politomías con ejemplares de las dos subespecies, además de que los ejemplares de *N.g. cliftoni* no se agruparon en un solo clado como en los análisis anteriores.

La relación filogenética entre los clados I, II, III y IV no se encuentran resueltos debido a una politomía, los clados II y III contienen a los taxones donde estaba representado el clado II en el análisis de máxima parsimonia en el análisis con *COI* con excepción de *Scotinomys* que ahora se agrupó con *Baiomys* formando el clado IV en este análisis, por último *Nyctomys* se agrupó con *Tylomys* y *Ototylomys* formando el grupo V.

El modelo evolutivo seleccionado mediante el criterio de información de Akaike fue TIM2+I+G, sin embargo debido a que RAxML no implementa modelos con cuatro tipos de sustitución, no fue posible implementar el modelo evolutivo seleccionado por lo que se tuvo que utilizar el modelo GTR+I+G. Este modelo fue el segundo mejor modelo seleccionado por el criterio de Akaike, además de que fue conveniente escoger este modelo sobreparametrizado ya que se han demostrado menos efectos negativos, en especial con la familia de modelos GTR (Rannala, 2002; Lemmon and Moriarty, 2004; Huelsenbeck y Rannala 2004). Los parámetros encontrados fueron: frecuencia de bases estimadas de los datos (A: 0.322308, C: 0.278968, G: 0.123032, T: 0.275692), una proporción de sitios invariables (I= 0.426970), una desigual distribución de tasas de sustitución en los sitios variables (G= 1.072296) y los seis diferentes tipos de sustitución (A↔C: 5.308974, A↔G: 8.545458, A↔T: 2.908716, C↔G: 1.007505, C↔T: 27.920520, G↔T: 1.000000).

La topología generada fue similar a la obtenida con el análisis de parsimonia (Fig. 16), aunque difiere en que el clado IV se agrupa como grupo hermano del nodo de los clados I y II, el clado III hermano con respecto a los clados I, II y IV, y dentro de éstos, el clado II se ubica como grupo hermano del clado I con un muy bajo soporte (57%), sin embargo la diferencia más importante es que dentro del clado de *Nelsonia* (clado I; soportado por un 99%) no se separan los subclados que corresponden a cada especie, por lo que las relaciones entre ellos no son claras. El

clado V agrupa a los géneros *Nyctomys*, *Tylomys* y *Ototylomys* como en el análisis de Parsimonia.

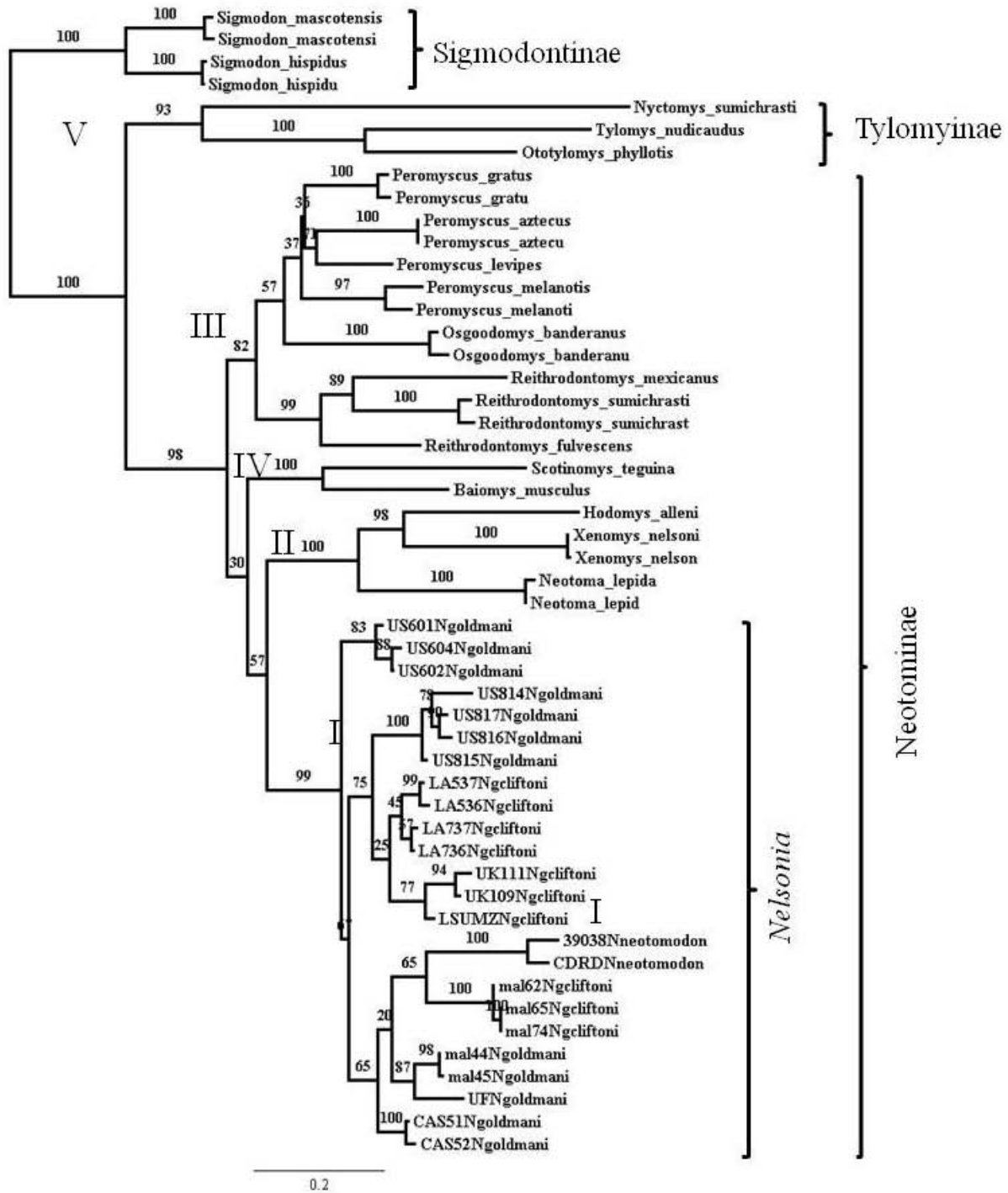


Figura 16. Topología obtenida con el análisis de máxima verosimilitud del gen citocromo b con las muestras de *Nelsonia*. Los valores de apoyo de bootstrap se encuentran arriba de cada rama.

Análisis concatenado (COI/ Cytb)

La combinación de los dos marcadores resultó en 1794 sitios alineados. En el análisis de parsimonia, 1053 sitios fueron excluidos dejando 741 caracteres informativos. El árbol de consenso estricto fue construido (Fig. 17) con los 3 árboles igualmente parsimoniosos obtenidos (4,232 pasos, índice de consistencia= 0.3183, índice de retención= 0.6627).

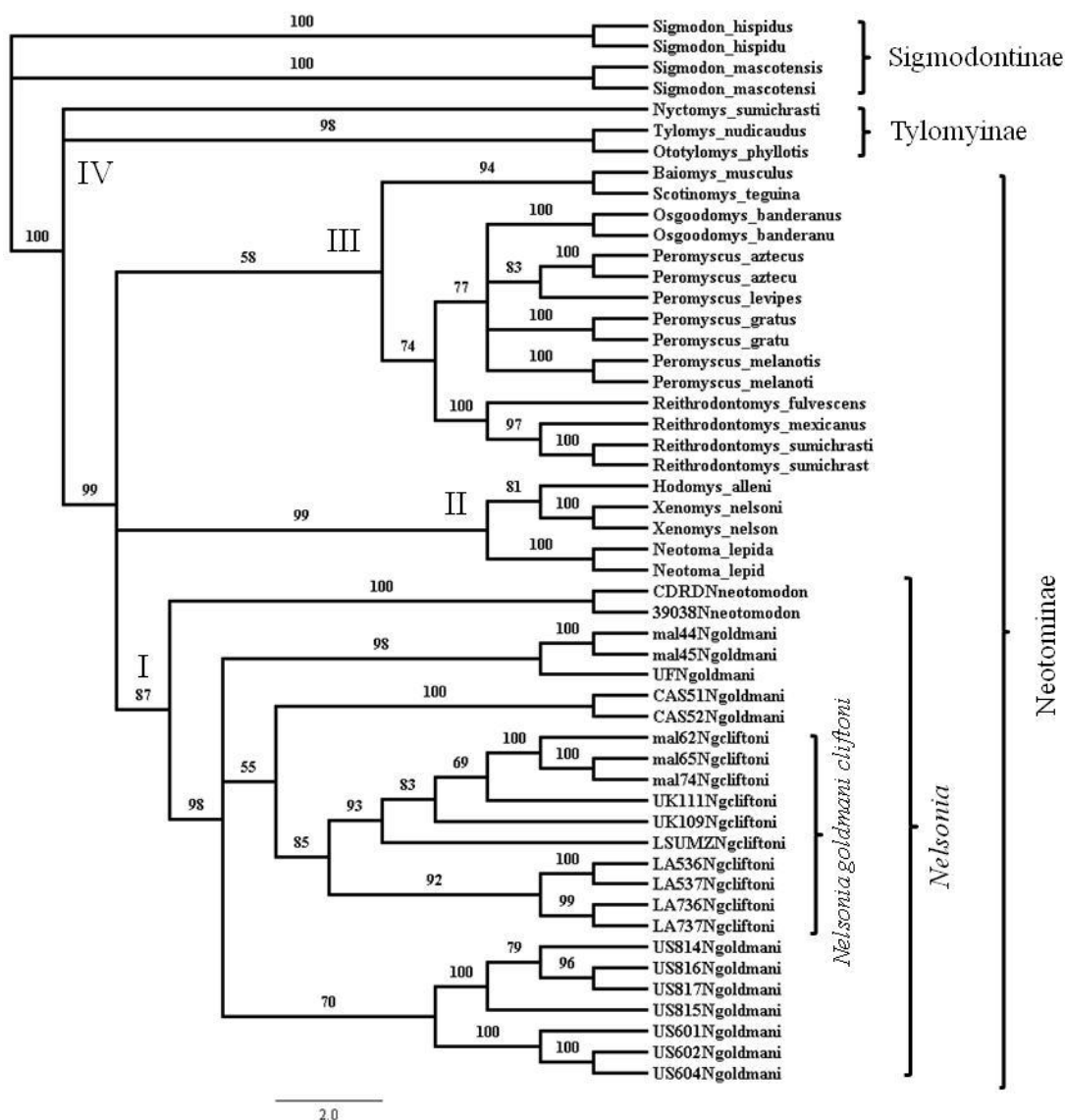


Figura 17. Árbol de consenso estricto generado con el análisis de máxima parsimonia con los datos marcadores concatenados de citocromo b y citocromo oxidasa subunidad 1 con las secuencias de *Nelsonia*. Los valores de apoyo de bootstrap se muestran en cada rama.

Cuatro clados fueron detectados, aunque con algunas diferencias con las topologías obtenidas con los datos separados. El clado I, II y III formaron una politomía como en el análisis de parsimonia del gen *Cytb*, sin embargo las relaciones filogenéticas entre los géneros *Baiomys* y *Scotinomys* fueron más estrechas con los géneros *Peromyscus*, *Osgoodomys* y *Reithrodontomys* formando el clado III. Los géneros *Tylomys* y *Ototylomys* fueron nuevamente agrupados en el clado IV y *Nyctomys* formó una politomía con el clado IV y el clado mayor que contiene la politomía de los clados I, II y III.

La monofilia del clado I (*Nelsonia*) fue soportada por un valor de bootstrap del 87%, separando a las dos especies. Las muestras de *N. goldmani* formaron un grupo monofilético soportado por el 98%, sin embargo, la topología dentro de este subclado muestra relaciones filogenéticas no resueltas, aunque se rescata un clado que incluye todas las muestras de la subespecie *N. g. cliftoni* soportadas por un 85%.

El análisis para la selección del modelo evolutivo dio como resultado que TIM2+I+G fue el más adecuado para los datos concatenados. Sin embargo, al igual que con los datos de *Cytb*, el segundo modelo seleccionado fue GTR+I+G, y por lo tanto, fue implementado para el análisis de máxima verosimilitud. Los parámetros encontrados en el análisis fueron: frecuencia de bases estimadas de los datos (A: 0.310399, C: 0.267014, G: 0.138688, T: 0.283899), una proporción de sitios invariables (I= 0.491500), una desigual distribución de tasas de sustitución en los sitios variables (G= 1.24381) y los seis diferentes tipos de sustitución (A↔C: 7.283147, A↔G: 13.658916, A↔T: 5.456624, C↔G: 1.077801, C↔T: 41.867854, G↔T: 1.000000). Para el análisis bayesiano se utilizó el modelo GTR+I+G para el gen *COI* y TIM2+I+G para *Cytb*.

La topología resultante del análisis Bayesiano y verosimilitud fue similar aunque los valores de soporte nodal variaron (Fig. 18). Esta topología fue similar a la obtenida con el análisis de parsimonia a excepción de que se resuelven las relaciones filogenéticas de algunos clados como pasa entre los clados I, II y III, y el clado que contiene los géneros *Tylomys*, *Ototylomys* y *Nyctomys* que se agruparon en un solo clado (V), por otro lado el clado IV que incluye los géneros *Baiomys* y *Scotinomys* que se encontraban en el clado III del análisis de parsimonia formaron el clado IV en estos análisis. El clado II está conformado con los mismos taxones que en el análisis anterior, pero se agrupó como grupo hermano del clado I (*Nelsonia*) con un soporte de bootstrap del 79% y una probabilidad posterior de 1.

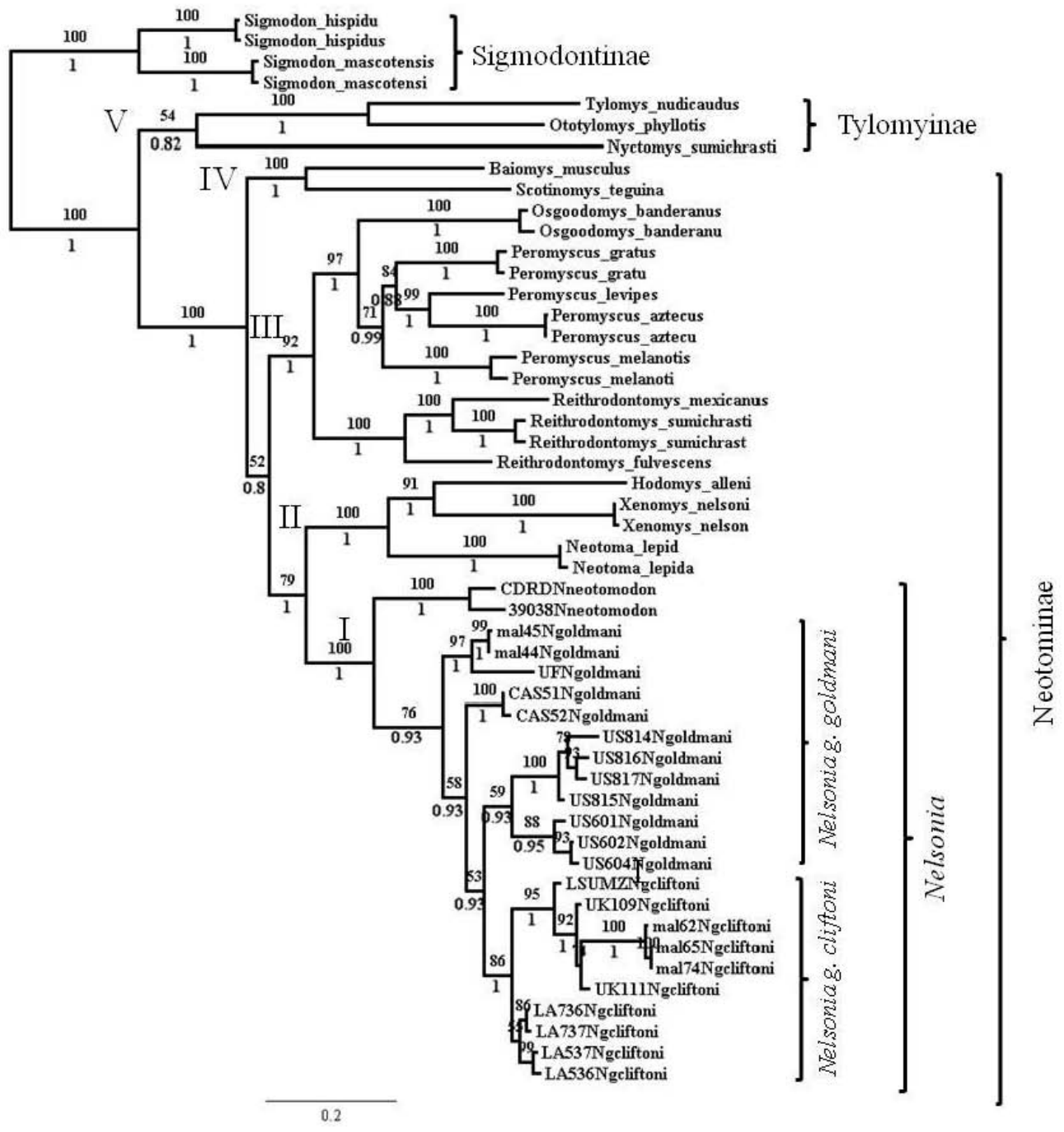


Figura 18. Topología obtenida para *Nelsonia* mediante el análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana con los datos concatenados. Los valores de probabilidad posterior se encuentran debajo y los de bootstrap se encuentran arriba de cada rama en el árbol de máxima verosimilitud.

El género *Nelsonia* tuvo el soporte nodal más alto de todos los análisis (100% de bootstrap y 1 de probabilidad posterior) separando a las dos especies en dos clados independientes, donde el clado *N. goldmani* tuvo un soporte del 76% y 0.93. Dentro de este grupo se obtuvieron cuatro principales clados donde se volvieron a agrupar en un subclado todas las muestras de la subespecie *N. g. cliftoni* y las muestras de la subespecie *N. g. goldmani* se agrupan en subclados que corresponden a la posición geográfica de los ejemplares (Fig. 19).

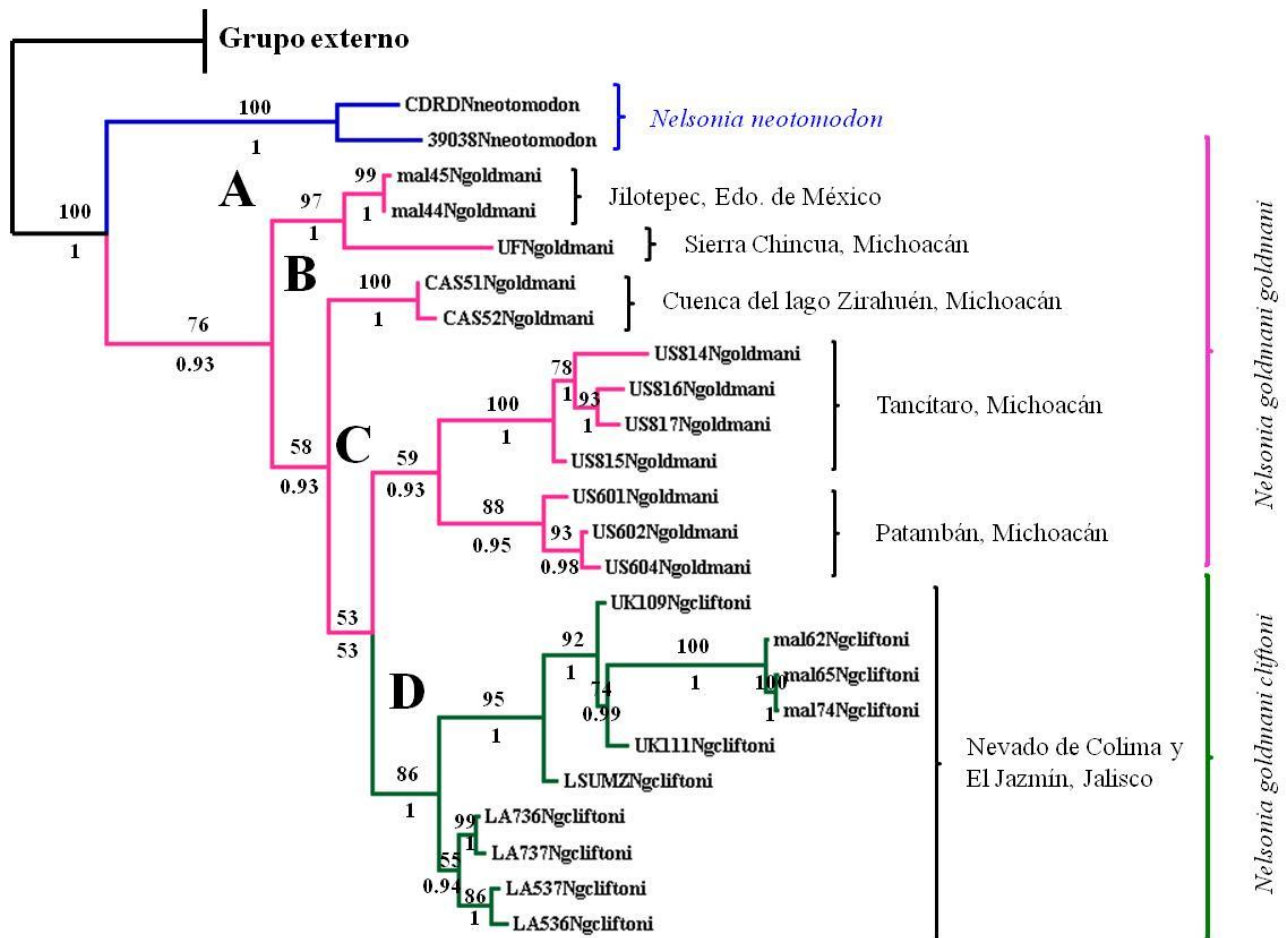


Figura 19. Acercamiento de la topología de la figura 18 para las poblaciones de *Nelsonia goldmani* con el análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana con los genes citocromo b y citocromo oxidasa subunidad 1 concatenados. El clado de color azul corresponde a las muestras de *N. neotomodon*, los clados rosas a las muestras de la subespecie *N. goldmani goldmani* y el clado de color verde a las muestras de la subespecie *N. goldmani cliftoni*. Los números en las ramas representan los valores de bootstrap (arriba) y probabilidad posterior (abajo).

Estimación del tiempo de divergencia

Los estimados promedio de divergencia (Fig. 20) mostraron que el género *Nelsonia* se separó de los demás miembros de la tribu Neotomini hace 6.52 millones de años (Ma), mientras que la divergencia entre *N. neotomodon* y *N. goldmani* fue hace 4.76 Ma. Por otro lado, los estimados de divergencia entre los clados de la especie *N. goldmani* ocurrieron durante el Plioceno y Pleistoceno.

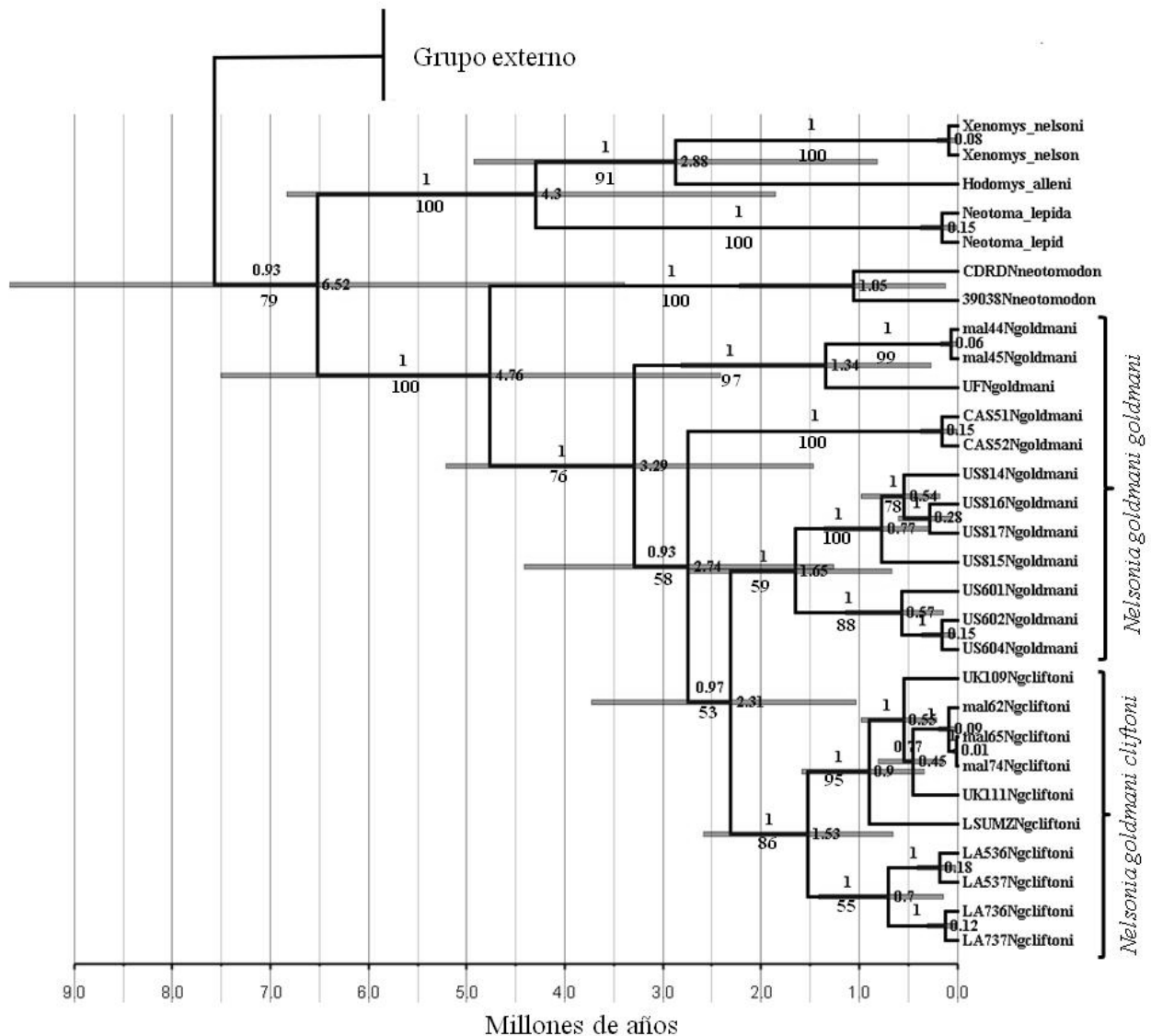


Figura 20. Tiempo de divergencia del género *Nelsonia* y de los clados asociados a las poblaciones de *Nelsonia goldmani*. Los números en las ramas representan los valores de probabilidad posterior (arriba) y de bootstrap (abajo). Los números en los nodos es la divergencia estimada promedio (millones de años) calculada en el análisis con BEAST. Las barras grises muestran los intervalos de credibilidad del 95%.

Discusión

*Importancia del conocimiento de *Nelsonia goldmani**

En las pocas publicaciones que se han realizado sobre el género *Nelsonia* se menciona frecuentemente que las dos especies (*N. neotomodon* y *N. goldmani*) son muy raras en las áreas de muestreo con respecto a otros roedores (Hooper, 1954; Genoways y Jones, 1968; Engstrom, 1983; Glendinning, 1992; Engstrom *et al.*, 1992; García-Mendoza y López-González, 2005) lo que trae como consecuencia que en las colecciones biológicas existan escasos ejemplares. Por ejemplo, nuestros resultados de la búsqueda de los ejemplares en las colecciones biológicas de México y Estados Unidos mostraron que existen 45 ejemplares de *Nelsonia neotomodon*, y ahora con los ejemplares capturados en este estudio, también 45 ejemplares de *Nelsonia goldmani* (Apéndice 2) a pesar de que se han realizado muestreos intensivos en los últimos años dentro del área de distribución de *N. goldmani*.

Estas dos especies y en especial *N. goldmani* son pobremente conocidas, por lo que la preservación y la inclusión de cada nuevo ejemplar a una colección biológica es de valor incalculable. Esto es porque, no sólo representa material disponible para análisis morfológicos y moleculares como el presente estudio, si no es un aporte a las series de especímenes que pueden servir para estudiar, por ejemplo: patrones de crecimiento, ontogenia y coloración de pelo, sin dejar a un lado la información que pueda surgir durante su colecta como el conocimiento de ciclos reproductivos, de estacionalidad y sus requerimiento de hábitat (Patterson, 2002) de la que *N. goldmani* presenta escasa o nula información. Por lo tanto, los cinco ejemplares capturados para este estudio, aunque pocos, son una contribución de gran valor para el conocimiento de esta especie ya que aumentan la información sobre *N. goldmani* que es una herramienta para motivos de inventarios y de medidas para su conservación.

Inclusive, *N. goldmani* se encuentra en la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059) en la categoría de “protección especial”, porque la especie o sus poblaciones podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que el gobierno de México determinó la necesidad de propiciar su recuperación y conservación (SEMARNAT, 2010). Por otro lado, la International Union for Conservation of Nature (IUCN)

clasifica a este roedor como “endangered” (en peligro de extinción), debido a que su distribución geográfica es menor a 500 km² y sus poblaciones se encuentran severamente fragmentadas por la disminución de la calidad y extensión de su hábitat (IUCN, 2012).

Por otro lado, las muestras de colecciones biológicas son un recurso valioso de DNA cuando el muestreo de tejido fresco no es posible (por ejemplo, Culver *et al.*, 2000; Payne y Sorenson, 2002) como lo fue en este estudio. Destaca, en este caso, que se tuvo acceso a 17 ejemplares históricos de los cuales 7 corresponden a la serie tipo colectada hace más de 100 años y cuyo DNA fue extraído y evaluado exitosamente. Este número de ejemplares representa casi la mitad de todos los ejemplares disponibles de la especie hasta el momento incluidos en colecciones biológicas de México y Estados Unidos (Apéndice 2).

Se sabe que el trabajo en el laboratorio con este tipo de muestras es técnicamente complicado, principalmente con la autenticidad de las secuencias, por lo que las precauciones sugeridas por la literatura para la obtención de las secuencias consenso fueron estrictamente tomadas en cuenta (Su *et al.*, 1998; Hofreiter *et al.*, 2001; Sefc *et al.*, 2006; Martíňková y Searle, 2006; Wandeler, 2007; Montiel y García-Sívoli, 2007; Dubey *et al.*, 2009). Con esto se trató de disminuir, en lo posible, los artefactos involucrados con el uso de este material biológico en los análisis filogenéticos para conocer la posición filogenética de *N. goldmani*.

Posición filogenética del género Nelsonia

Los datos generaron árboles de genes con diferentes topologías sin diferencias importantes con las particiones de datos por separado, la mayoría de las cuales mostraron un bajo soporte nodal. Sin embargo esto no es nuevo, particularmente con los roedores de la familia Cricetidae que a pesar del amplio interés por su clasificación los resultados sobre este tema no han sido consistentes. Por lo tanto, resulta que la monofilia y la composición de linajes no permanezcan resueltos, especialmente con los miembros de la subfamilia Neotominae. Por ejemplo, el número de subfamilias, tribus y géneros reconocidos de cricétidos varían entre autores (ver cuadro 1; Hooper y Musser, 1964; Carleton, 1980; Musser y Carleton, 2005; Reeder *et al.*, 2006; Miller y Engstrom, 2008), lo que se atribuye a que los estudios moleculares han encontrado amplias incongruencias entre filogenias de genes individuales. Esto se debe a que algunas particiones de

datos proveen evidencia insuficiente para establecer o refutar hipótesis filogenéticas, especialmente en marcadores nucleares conservados en los cuales existen pocos caracteres derivados (Rokas *et al.*, 2003; Jansa y Weskler, 2004; Reeder *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2007; Miller y Engstrom, 2008; Dávalos *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de las limitantes de los marcadores utilizados los datos generados con los marcadores *Cytb* y *COI* parecen adecuados para resolver los objetivos planteados en este estudio.

Bajo este esquema, las diferencias encontradas con los datos separados entre los árboles de los genes de este estudio no son grandes y presentan valores de soporte nodal muy bajos (Figs. 13, 14, 15 y 16). Sin embargo, en todos los análisis las muestras del género *Nelsonia* permanecen como grupo monofilético con altos valores de soporte para *Cytb* (Fig. 15 y 16) y moderados para *COI* (Fig. 13 y 14). Por otro lado, en el análisis con los datos concatenados (Fig. 17 y 18) no se encontraron tasas de evolución desiguales (Fig. 12) y composición de bases heterogéneas entre los dos marcadores, por lo que se considera que la concatenación de las dos particiones de datos debe proveer mayor información para generar hipótesis filogenéticas.

En este contexto el árbol de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana obtenido con la concatenación de las dos particiones de datos fue el que tuvo mayor similitud con estudios moleculares previos, ya que en los dos árboles se encontraron los clados resueltos con valores altos de soporte nodal (Fig. 18). La topología obtenida con el análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana concuerda con otras hipótesis propuestas con diferentes marcadores moleculares, como con los genes concatenados mitocondriales y nucleares *Cytb/DMP1/y Fgb-17* (Reeder *et al.*, 2006) y los genes *Cytb/IRBP/y GHR* (Miller y Engstrom, 2008) donde se encuentra la misma topología obtenida para Neotominae y Tylomyinae; similarmente, los datos obtenidos en este estudio permiten recuperar los clados que corresponden a las subfamilias Tylominae y Neotominae, las cuales contienen los subclados que corresponden a las tribus Baiomyini, Neotomini y Reithrodontomini (ver cuadro 1; Miller y Engstrom, 2008). Solamente hubo una excepción, el clado que contiene los taxones *Baiomys* y *Scotinomys* (tribu Baiomyini), que se encuentran de manera basal a *Peromyscus*, *Osgoodomys* (tribu Peromyscini), *Reithrodontomys* (Reithrodontomini) y *Neotoma*, *Hodomys*, *Xenomys* y *Nelsonia* (Neotomini), lo que no concuerda con los estudios anteriores, ya que la tribu Baiomyini se propone como grupo hermano de las tribus Peromyscini y Reithrodontomini (Carleton, 1980; Musser y Carleton, 2005; Reeder *et al.*, 2006; Miller y Engstrom, 2008).

Bajo esta situación, la topología detectada con el análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana parece resolver mejor las relaciones filogenéticas de la subfamilia Neotominae y es la que mejor concuerda con algunos estudios previos con datos morfológicos (Carleton, 1980; Musser y Carleton, 2005) y moleculares (Reeder *et al.*, 2006; Miller y Engstrom, 2008); por esta razón se estima que la topología obtenida con el análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana es la más adecuada para seleccionarla como base para generar posteriores hipótesis e interpretaciones.

Existe evidencia morfológica que sugiere la inclusión del género *Nelsonia* en la tribu Neotomini (Carleton, 1980; Musser y Carleton, 2005). Sin embargo, el análisis de caracteres morfológicos primitivos (Hooper y Musser, 1964) y datos en su cariotipo (Engstrom y Bickham, 1983) indican una afinidad con el grupo de los peromiscinos (Cuadro 4). Probablemente esto es porque el género *Nelsonia* ha sido ignorado en la mayoría de revisiones (Reeder *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2007) por la gran dificultad para obtener muestras en campo, esto aporta poca información que sustente su afinidad taxonómica con Neotomini y al grupo de los peromiscinos.

En todos los casos los resultados obtenidos con los árboles de genes en este estudio demuestran que el género *Nelsonia* es monofilético, teniendo valores de soporte de bajo a moderado (*COI*; Fig. 13 y 14) hasta altos (*Cytb*; Fig. 15 y 16) analizando las particiones de datos por separado, mientras que con los datos concatenados se tienen valores altos que apoyan la monofilia del género (Fig. 17 y 18). Por otro lado, las relaciones filogenéticas del género *Nelsonia* con respecto a los demás grupos no fueron completamente resueltos con las particiones de datos. Sin embargo, en los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana se mantiene el género *Nelsonia* como grupo hermano de los géneros *Neotoma*, *Hodomys* y *Xenomys* formando la tribu Neotomini con un valor de bootstrap moderado (79%) y una probabilidad posterior de 1 (Fig. 18). Este arreglo taxonómico coincide con el propuesto por Carleton (1980) y Musser y Carleton (2005) y concuerda con la idea generada por Hooper (1954) y posteriormente por Carleton (1980) de que el género *Nelsonia* morfológica, ecológica y geográficamente, retiene caracteres ancestrales para el grupo.

Aunque el agrupamiento de *Nelsonia* como grupo hermano con respecto a los demás géneros de la tribu Neotomini está soportado moderadamente por un 79% en el análisis de máxima verosimilitud, se ha demostrado en otros estudios moleculares con los miembros de la subfamilia Neotomini que la inclusión de nuevos caracteres, como por ejemplo genes nucleares,

pueden no afectar la topología obtenida. Sin embargo, se ha notado que los valores de soporte para los clados aumentan (Reeder *et al.*, 2006; Miller y Engstrom, 2008), por lo que quizá la inclusión de nuevos datos moleculares aumenten la robustez de la hipótesis generada en este estudio.

Variación genética en Nelsonia goldmani

Bajo el contexto de que los árboles generados con los datos concatenados resuelven mejor las relaciones filogenéticas, las muestras de *N. neotomodon* y *N. goldmani* se separan en dos clados distintos, manteniéndose todos los ejemplares de *N. goldmani* como grupo monofilético con valores altos de soporte nodal (98% en parsimonia, 100% en máxima verosimilitud y 1 en inferencia bayesiana), Asimismo, las distancias genéticas obtenidas muestran que existe una distancia promedio grande entre los ejemplares de *N. neotomodon* y *N. goldmani* (15.2% para el gen *COI* y 13.3% para el gen *Cytb*), lo que para mamíferos apoya la noción de que representan dos taxones bien diferenciados.

Por otro lado, las muestras en las poblaciones de *N. goldmani* mostraron un soporte de su monofilia de 76% en máxima verosimilitud y 0.93 en el análisis bayesiano, con una distancia genética promedio de 7% en el marcador *COI* (valor más alto 14.77 %) y 8.4% para *Cytb* (valor más alto 15.73 %). En esta topología (Fig. 19) cada población formó un clado distinto donde las localidades del límite oeste de *N. goldmani*, que corresponde a la subespecie *N. g. cliftoni*, se reunieron en un solo clado (clado D; Fig. 19) el cual no fue el grupo hermano de las muestras de la subespecie *N. g. goldmani*, lo que difiere con la hipótesis propuesta al inicio de nuestro estudio.

Los resultados muestran que existe una estructura filogeográfica con las muestras de *N. goldmani* donde las localidades individuales formaron grupos monofiléticos y presentaron un patrón muy claro (Fig. 19 y 21). El clado A del centro del ENT formó el grupo hermano de las demás poblaciones, estas poblaciones corresponden a las muestras del oeste de la distribución geográfica de *N. g. goldmani* (clados B y C; Fig. 19 y 21) y las muestras de la subespecie *N. g. cliftoni* (clado D; Fig. 19 y 21), las cuales formaron clados derivados recientes. Aunque los valores de soporte nodal varían e incluso en algunos casos probablemente podrían representar

politimías, la información generada sugiere la tendencia de que las muestras más antiguas de *N. goldmani* son las del centro del ENT (Fig. 19 y 21).

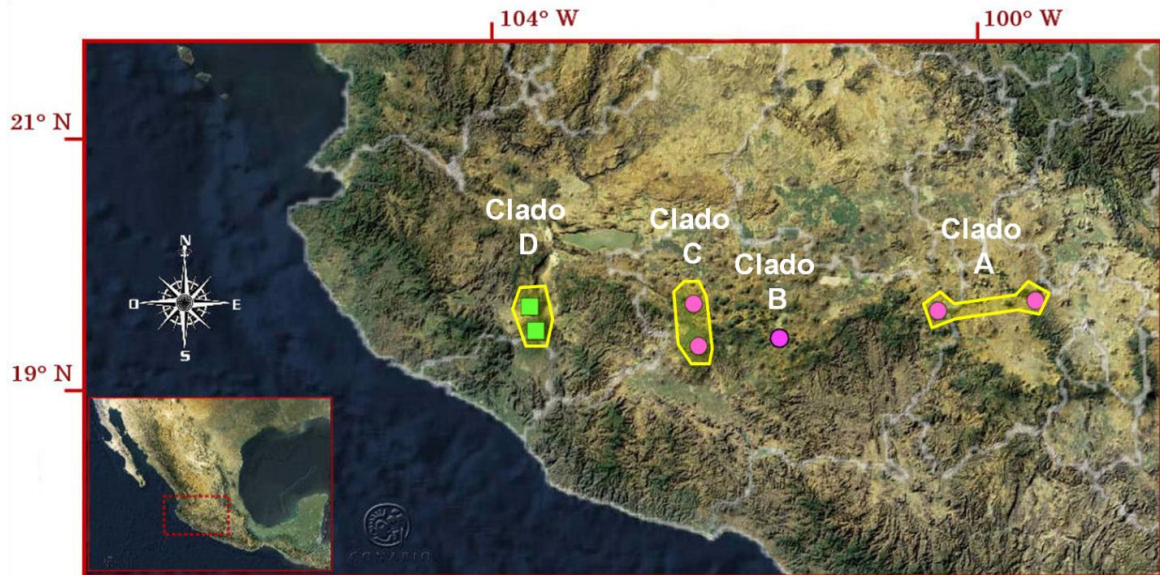


Figura 21. Clados asociados a las localidades de *Nelsonia goldmani* del centro-oeste del Eje Neovolcánico Transversal. Los círculos representan a las localidades reportadas de *N. g. goldmani* y los cuadros a *N. g. cliftoni*. Los polígonos amarillos indican los clados que se agruparon en el árbol de genes de la figura 19.

Las distancias genéticas entre los clados (Cuadro 5) muestran que existe una gran divergencia lo que también se ha encontrado en las poblaciones de otros roedores como las tuzas del ENT *Cratogeomys merriami*, *Cratogeomys tylorhynus*, *Cratogeomys gymnurus* (Demastes *et al.*, 2002), y los ratones *Baiomys*, *Neotoma*, *Reithrodontomys* y *Sigmodon* (Bell *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2002; Amman y Bradley, 2004; Carroll *et al.*, 2004), donde las muestras difieren de 6 a 13%, o como con el ratón *Nyctomys sumichrasti* en las que incluso las muestras llegaron a ser parafiléticas (Corley *et al.*, 2011). En el caso de *N. goldmani* la distancia genética entre los clados es similar y las muestras de cada población se agruparon en clados distintos, por lo que la filogenia encontrada podría estar reflejando el grado de estructuración geográfica de las poblaciones de esta especie ya que se ha visto que partes del ENT sirven como barrera al flujo génico (Amman y Bradley, 2004).

Cuadro 5. Divergencia promedio de las secuencias con el modelo Kimura 2 parámetros entre los clados de las muestras de *Nelsonia goldmani*. Los valores debajo de la diagonal corresponden a la divergencia del marcador citocromo b y los valores arriba de la diagonal a citocromo oxidasa subunidad 1.

| | Clado A | Clado B | Clado C | Clado D |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| Clado A | | 7.6 | 7.7 | 10.9 |
| Clado B | 7.2 | | 7.4 | 5.8 |
| Clado C | 9.8 | 9.3 | | 9.8 |
| Clado D | 8.8 | 8.0 | 9.8 | |

Por otro lado, la topología en los análisis filogenéticos muestra que solamente los clados de Patambán y Tancíaro (clado C) y el clado de *N. goldmani cliftoni* (clado D) son recíprocamente monofiléticos; las muestras de la cuenca del lago Zirahuén (clado B) forman el grupo hermano de los clados anteriores, y a su vez, los ejemplares de Sierra Chincua y de Jilotepec (clado A) forman el grupo hermano de todas las demás muestras (Fig. 19 y 21).

En la descripción de *N. g. cliftoni* (Genoways y Jones, 1968) se reportaron varias diferencias craneales con respecto a *N. g. goldmani*, lo que apoyaba la idea de que existieran dos subespecies. Sin embargo, Engstrom *et al.* (1992) demostraron que tales diferencias se debían a la comparación de muestras de ejemplares jóvenes de *N. g. goldmani* con muestras de ejemplares adultos de *N. g. cliftoni*; la única diferencia significativa entre ellos fue que *N. g. cliftoni* tiene una longitud mayor del rostro. Otra característica que es distintiva de *N. g. cliftoni* es su coloración más parda del pelaje dorsal y lateral. No obstante, se ha demostrado con estudios de otros ratones (Hoekstra *et al.*, 2005) y conejos (Stoner *et al.*, 2003) que este carácter está fuertemente relacionado con el color del sustrato, por lo que la morfología craneal, el tamaño corporal y la coloración del pelaje pueden variar en respuesta a los tipos de suelo y abundancia de nutrientes disponibles (Demastes *et al.*, 2002; Stoner *et al.*, 2003; Hoekstra *et al.*, 2005). De modo que, la plasticidad fenotípica de *N. goldmani* podría explicar mejor estas diferencias que la inclusión de una subespecie con base en estas características, sin embargo otros estudios posteriores más completos y detallados podrán apoyar o refutar esta hipótesis.

Aspectos biogeográficos

La separación de *N. neotomodon* y *N. goldmani* en dos grupos monofiléticos y la gran distancia genética encontrada entre ellos concuerdan con la hipótesis generada por Engstrom *et al.* (1992) basada en datos morfológicos. Esta propuesta establece que la principal discriminación de estos dos grupos se basa en la presencia/ausencia de la escotadura anterorbital; su ausencia en *N. neotomodon* se consideró por Carleton (1980) como condición plesiomórfica con respecto a su presencia en *N. goldmani*. Esta hipótesis concuerda con los resultados de este estudio ya que el clado *N. neotomodon* fue el grupo hermano de todas las muestras de *N. goldmani*.

Engstrom *et al.* (1992) encontraron que en *N. neotomodon* existe un patrón de incremento en la anchura de la placa zigomática de las muestras de norte a sur de *N. neotomodon* y que la coloración de pelo se degrada hasta llegar a la de *N. goldmani*. Por lo tanto ellos proponen la idea de que la divergencia de las dos especies de *Nelsonia* son el resultado de un efecto vicariante (Engstrom *et al.*, 1992). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis aunque sólo se incluyeron dos muestras de *N. neotomodon* que provienen del límite norte de su distribución geográfica (Chihuahua y Durango). Sin embargo, es necesario comparar los haplotipos de estas muestras con los del centro y sur de la Sierra Madre Occidental y evaluar si existe un patrón genético similar al incremento de la anchura de la placa zigomática en *N. neotomodon*. Esta información ayudaría a examinar si hubo desplazamientos históricos de las poblaciones de norte a sur. Además, la inclusión y el análisis de las muestras de *N. neotomodon* del sur de la Sierra Madre Occidental como son las de las localidades del Norte de Jalisco y Aguascalientes confirmarían la monofilia o parafilia de *N. neotomodon* mediante la variación genética de sus haplotipos.

La información generada con datos paleontológicos de mamíferos en México, además de la geológica, climática, de mapas topográficos y potenciales de vegetación apoya la idea de desplazamientos históricos a través de la Sierra Madre Occidental. Por lo anterior se ha propuesto que esta extensión de montañas ha funcionado como corredor histórico que facilitó procesos de dispersión de norte a sur, lo que sugiere que varias especies de mamíferos colonizaron las montañas de Arizona y otras localidades del suroeste de Estados Unidos de América y posteriormente se introdujeron a las montañas de Sonora, Chihuahua y Durango. Por tanto la Sierra Madre Occidental pudo haber funcionado como ruta de dispersión durante el Pleistoceno,

principalmente por la presencia de periodos de mayor humedad y vegetación idónea en altas elevaciones (Ceballos *et al.*, 2010; Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010).

A partir de datos geológicos se ha propuesto que el ENT logró su individualización como unidad geológica entre el Mioceno temprano y el Mioceno medio hace aproximadamente 25-17 Ma (Ferrari *et al.*, 1999; Gómez-Tuena *et al.*, 2005). Se ha propuesto que el ENT fue formado en varias etapas en una progresión oeste-este que comenzó en el oeste hace aproximadamente 23 Ma y terminó hace 2.5 Ma (Becerra, 2005). Esta condición fue consumada a través de una rotación en sentido contrario de las agujas de reloj y su actividad volcánica comenzó desde su etapa más temprana hace aproximadamente 7-11 Ma (Ferrari *et al.*, 2000). De manera muy sintética la historia geológica del ENT se puede dividir en cuatro episodios principales: 1) la instauración de un arco en el Mioceno medio y tardío (~19-10 Ma), 2) el episodio máfico del Mioceno tardío (~11-5 Ma), 3) el episodio sílico de finales del Mioceno tardío y Plioceno temprano (~7.5-5 Ma), y 4) la reinstauración de un arco a partir del Plioceno tardío (~3.5 Ma; Gómez-Tuena *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que la parte oeste del ENT está asociada con la Sierra Madre Occidental y podría representar una vieja formación geológica que pudo haberse formado en el Cretácico que se desarrolló durante el Oligoceno y el Mioceno temprano (Ferrari, 1999; Marshall y Liebherr, 2000; Corona *et al.*, 2007). Incluso se ha propuesto que probablemente la formación del ENT podría haber provocado el establecimiento de los biomas modernos en el oeste y el centro de México (Becerra, 2005). En este contexto, Engstrom *et al.* (1992) sugirieron la divergencia entre *N. neotomodon* y *N. goldmani* ocurrió en el Mioceno o antes, lo que sería congruente con el cambio de vegetación y clima posteriores a la individualización del ENT (Moreno-Letelier y Piñero, 2009). Esto podría apoyar la idea de que ocurrió evento vicariante entre *N. neotomodon* y *N. goldmani*.

Nuestros datos revelaron que el género *Nelsonia* divergió de los demás Neotominos hace aproximadamente 6.52 millones de años (Fig. 20), lo que corresponde a la época del Mioceno tardío. Así mismo, la divergencia entre *N. neotomodon* y *N. goldmani* se estima que ocurrió hace 4.76 millones de años que corresponde al inicio del Plioceno. Sin embargo, si la variación genética de *N. neotomodon* presentan un patrón parecido al de la anchura de la placa zigomática, al incluir muestras del sur la variación haplotípica sería menor con respecto a las muestras de *N. goldmani* del ENT. Por lo tanto, el tiempo de divergencia podría reducirse; no obstante, también

se ha encontrado que otras especies de mamíferos pudieron haber divergido en el mismo intervalo geológico. Tal es el caso del género de roedores *Habromys*, el cual pudo haberse originado en el Plioceno, y varias de sus especies se diversificaron durante el Pleistoceno debido a las fuertes oscilaciones climáticas del periodo (León-Paniagua, *et al.*, 2007). Sin embargo, es necesario todavía documentar evidencias que relacionen el origen y la dinámica de la Sierra Madre Occidental y el ENT con el evento de especiación entre *N. goldmani* y *N. neotomodon*.

El desarrollo geológico del ENT pudo haber tenido un impacto importante en la diversificación de taxones montanos, debido a que el levantamiento pudo haber creado nuevas barreras geográficas y nuevos hábitats (Ceballos *et al.*, 2010; Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010). Esto pudo haber afectado en la diversificación de las poblaciones de *N. goldmani*, reflejadas en las distancias genéticas grandes encontradas entre las poblaciones. Además tomando en cuenta las dramáticas fluctuaciones ambientales y climáticas registradas durante el Pleistoceno que causaron los desplazamientos cíclicos altitudinales de arriba hacia abajo y en expansiones de los bosques de pino-encino (Martin y Harrell, 1957; Van Devender, 1990; McDonald, 1993) que pudieron haber repercutido en expansiones en la distribución geográfica de *N. goldmani* ocurridos durante los periodos glaciales y aislamientos posteriores de las zonas altas en los periodos interglaciales (Moreno-Letelier y Piñero, 2009). Las fragmentaciones subsecuentes posglaciales de los bosques montanos (Van Devender, 1990) pudieron haber causado el aislamiento de varias especies (McCormack *et al.*, 2008), lo que pudo haber interrumpido también el flujo génico entre las poblaciones de *N. goldmani*, como probablemente sucedió con otras especies dentro de la zona como otros roedores (Sullivan *et al.*, 1997, 2000; Demastes *et al.*, 2002; Amman y Bradley, 2004; Hafner *et al.*, 2005; León-Paniagua *et al.*, 2007), pinos (Rodríguez-Banderas *et al.*, 2009), insectos (Anducho-Reyes *et al.*, 2008), y reptiles (Alvarado-Díaz y Campbell, 2004; Zaldivar-Riverón *et al.*, 2005; Bryson *et al.*, 2011).

La época del Plioceno en donde el género *Habromys* pudo haberse originado concuerda con el posible aislamiento de las poblaciones de *N. goldmani*, ya que comenzó con el clado de Jilotepec y Sierra Chincua que divergió hace 3.29 millones de años de las demás localidades de acuerdo los resultados (Fig. 20). El tiempo de divergencia de las demás poblaciones de *N. goldmani* se encuentra a finales del Plioceno y principios del Pleistoceno, siendo la más antigua la cuenca del Lago Zirahuén hace 2.74 millones de años, tiempo que concuerda con los fuertes

cambios climáticos glaciales e interglaciales que a su vez modificaron la distribución geográfica de mamíferos y de otros organismos (Ceballos *et al.*, 2010).

La hipótesis propuesta al inicio de este trabajo se basaba en que la parte oeste del ENT pudo estar conectada con la Sierra Madre Occidental, y por lo tanto las muestras basales de *N. goldmani* se encontrarían en esta zona. Sin embargo lo que se encontró es que las muestras más antiguas son las del centro del ENT. Otras especies de mamíferos han sido confinadas al centro del ENT como son *Habromys delicatulus* y *H. schmidlyi* (León-Paniagua, *et al.*, 2007). De tal manera que la compleja historia geológica, la gran heterogeneidad topográfica y ambiental del ENT además de una serie de eventos como oscilaciones climáticas, actividad volcánica y respuestas bióticas a estos cambios (Demastes *et al.*, 2002; Ceballos *et al.*, 2010; Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2010), indudablemente influenciaron el origen y la distribución de *N. goldmani* lo que hace su historia evolutiva compleja.

Conservación de Nelsonia goldmani

Los roedores han sido considerados como modelos interesantes en la biología evolutiva, al menos en las especies más comunes, sin embargo se tiene raramente interés en su estado de conservación (Amori y Gippoliti, 2003a). La taxonomía actual de los roedores parece estimular una baja valoración de la diversidad del grupo debido a la confusión de las relaciones evolutivas de algunos grupos y el pobre conocimiento acerca de sus relaciones filogenéticas como es el caso con *Nelsonia*.

Desde el punto de vista de conservación, tal linaje antiguo (comparado con los demás géneros de su tribu) y pobremente representado en las colecciones biológicas revela obviamente prioridades para su conservación. No obstante, la carencia de estudios que propician el escaso conocimiento de *N. goldmani* y la falta de información detallada sobre el estado de sus poblaciones, provoca dificultades para determinar hasta qué punto esta especie y algunas otras se encuentran en peligro de extinción (Amori y Gippoliti, 2003b). Por ejemplo, la International Union for Conservation of Nature (IUCN) la califica en Peligro de Extinción (endangered), mientras que la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059) la considera como “protección especial”. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las poblaciones de

N. goldmani pueden encontrarse genéticamente fragmentadas y aisladas desde hace un periodo largo de tiempo. Además de que los ejemplares de esta especie se encuentran en pequeñas zonas donde la actividad humana puede influir en la desaparición de los microhábitats donde *N. goldmani* se encuentra. De tal manera que probablemente la categoría de Protección Especial para esta especie podría elevarse a “amenazado” ya que son congruentes con el Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER; SEMARNAT, 2010).

El presente estudio tiene una gran importancia para identificar regiones caracterizadas por localidades genéticamente aisladas de *N. goldmani*. Esto debería dirigir los esfuerzos de conservación en zonas que probablemente mantienen características únicas de las poblaciones, si diferentes taxones son encontrados a seguir el mismo patrón (Escalante, 2003). Por ejemplo, de las poblaciones identificadas hasta ahora de *N. goldmani*, únicamente El Nevado de Colima, Pico de Tancítaro y Sierra Chincua se encuentran como áreas naturales protegidas por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Sin embargo El Jazmín, Patambán, la cuenca del lago Zirahuén y Las Peñas no cuentan con ningún tipo de protección, además de que su fauna es muy poco conocida. De estas localidades destaca el Parque Natural “Las Peñas” en el Estado de México, ya que representa la localidad del clado más antiguo y el límite este de la distribución geográfica de *N. goldmani*. Además, esta localidad se encuentra aislada por zonas bajas de temperaturas más altas y representa la única localidad reportada para un taxón endémico: el roedor *Habromys delicatulus* (León-Paniagua *et al.*, 2007).

Esta zona ha sido escasamente explorada, desde el punto de vista de diversidad de mamíferos y otros grupos, por lo que debería ponerse especial atención a esta localidad en el futuro. En este caso la información generada en este estudio con *N. goldmani* representa una herramienta más para tomar en cuenta la importancia de esta zona que beneficiaría estos taxones raros que pueden considerarse como áreas de refugio y endemismo para algunos otros organismos pequeños y proveen una oportunidad para detectar y proteger de otro modo, áreas desprotegidas con la ausencia de organismos más atractivos o carismáticos.

Conclusiones

- El género *Nelsonia* es un grupo monofilético que pudo haberse originado a finales del Mioceno y representa el grupo hermano de los demás géneros de la tribu Neotomini, según las evaluaciones moleculares.
- Las especies *N. goldmani* y *N. neotomodon* forman clados monofiléticos y pudieron haber divergido a inicios del Plioceno.
- La notable divergencia genética dentro de *N. goldmani* refleja un nivel de estructuración filogeográfica debido a la concordancia de los clados encontrados en los análisis filogenéticos y al aislamiento geográfico de las localidades que probablemente comenzó a finales del Plioceno y durante el Pleistoceno.
- Las dos subespecies de *N. goldmani* no formaron dos clados separados, pues el clado *N. g. cliftoni* derivó de un ancestro compartido con las muestras del oeste de *N. g. goldmani* por lo que las características morfológicas que se consideraron para distinguir a la subespecie *N. g. cliftoni* pueden deberse a plasticidad fenotípica o adaptación local.
- Es necesario enfocar mayor interés y fomentar la conservación de *N. goldmani*, así como promover la protección de las áreas donde habitan sus poblaciones, donde resalta el Parque Natural “Las Peñas” ya que representa la localidad del clado más antiguo y el límite este de la distribución geográfica de *N. goldmani* y muy probablemente podría representar el área donde divergió esta especie. Además, esta zona alberga un taxón único de esta área, el ratón *Habromys delicatulus*.

Literatura citada

- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Second International Symposium on Information Theory (P. N. Petrov and F. Csaki, eds.). Akad. Kiado, Budapest. 267-281.
- Alvarado-Díaz, J., Campbell J. A., 2004. A new montane rattlesnake (viperidae) from Michoacán México. *Herpetologica*, 60(2); 281-286.
- Amman, B. R., Bradley R. D., 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae) evidence for a genetic subdivision in *B. musculus*, *Journal of Mammalogy*, 85(1); 162-166.
- Amori, G., Gippoliti, S., 2003a. How do rodent systematics affect conservation priorities? In: Rats, mice and people. Rodent biology and management: 112–114 (G. R. Singleton, L. A. Hinds, C. J. Krebs, D. M. Spratt, Eds.). Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Amori, G., Gippoliti, S., 2003b. A higher-taxon approach to rodent conservation priorities for the 21st century. *Animal Biodiversity and Conservation* 26(2); 1-18.
- Anducho-Reyes, M. A., Cognato, A. I., Hayes, J. L., Zuniga, G., 2008. Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49; 930-940.
- Arbogast, B. S., Kenagy, G. J., 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28(7); 819-825.
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Barriel, V., Tassy, P., 1998. Rooting with multiple outgroups: consensus versus parsimony. *Cladistics* 14; 193-200.
- Becerra, J. X., 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102; 10919-10923.
- Bell, D. M., Hamilton, M. J., Edwards, C. W., Wiggins, L. E., Martínez, R. M., Strauss, R. E., Bradley R. D., Baker, R. J., 2001. Patterns of karyotypic megaevolution in Reithrodontomys: evidence from a cytochrome-b phylogenetic hypothesis. *Journal of Mammalogy* 82(1); 81-91.
- Bradley, R. D., Baker, R. J., 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82; 960-973.
- Bradley, R. D., Durish, N.D., Rogers, D. S., Miller, J. R., Engstrom, M. D., Kilpatrick, C. W., 2007. Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: Evidence from mitochondrial cytochrome-b sequences, *Journal of Mammalogy*, 88(5); 1146-1159.
- Brown, M. W., Prager, E. M., Wang, A., Wilson, A. C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18; 239-255.

- Bryson, R. W., Murphy, R. W., Lathrop, A., Lazcanp-Villareal, D., 2011. Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography* 38; 697-710.
- Carleton, M. D., 1980. Phylogenetic relationships in neotomine-peromyscine rodents (Muroidea) and a reappraisal of the dichotomy within New World Cricetinae. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan Press*, 157; 1-146.
- Carleton, M. D., Sánchez, O., Urbano-Vidales, G., 2002. A new species of *Habromys* (Moroidea: Neotominae) from México, with generic review os species definitions and remarks on diversity patterns among Mesoamerican small mammals restricted to humid montane forests. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115(3); 488-533.
- Carleton, M. D., Musser, G. G., 2005. Order Rodentia. In: Wilson, Don E. and Reeder, D. M., *Mammal Species of the World, Third Edition*. The Johns Hopkins University Press, pp.745-752.
- Carroll, D. S., Peppers, L. L., Bradley, R. D., 2004. Molecular systematics and phylogeography of the *Sigmodon hispidus* species group. *Contribuciones Mastozoológicas en Homenaje a Bernardo Villa (Sanchez-Cordero V. y R. A. Medellín Eds.) Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, Mexico*, pp. 85-98.
- Ceballos, G., J., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R. A., Domínguez-Castellanos, Y., 2005. Lista actualizada de los mamíferos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 9; 21-71.
- Ceballos, G., Arroyo-Cabrales, J., Ponce, E., 2010. Effects of Pleistocene environmental changes on the distribution and community structure on the mammalian fauna of Mexico. *Quaternary Research* 73; 464-473.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9; 1657-1659.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2003). México: Imagen desde el espacio. Conabio, México. Mosaico 2002 de imágenes Modis sin nubes del satélite Terra, bandas 1,4,3 (RGB), resolución espacial 250 metros, sobre un modelo digital de terreno.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2008. Estudio previo justificativo para la recategorización del Parque Nacional Pico de Tancítaro como Área de Protección de Flora y Fauna. Michoacán, México 132 pp.
- Corley, M. S., Ordóñez-Garsa, N., Rogers, D. S., radley, R., 2011. Molecular evidence for parapyly in *Nictomys sumichrasti*: suport for a new genus of vesper mice?. *Occasional Papers, Museumm of Texas Tech University* 306; 1-10.
- Corona, A. M., Toledo, V. H., Morrone J. J., 2007. Does the Trans-mexican Volcanic Belt represent a natural biogeographical unit? An analysis of the distributional patterns of Coleoptera. *Journal of Biogeography*, 34; 1008-1015.
- Culver, M., Johnson, W. E., Pecon-Slattery, J., O'Brien, S. J., 2000. Genomic ancestry of the american puma (*puma concolor*). *Journal Heredity* 91; 186-197.

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., y Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9; 772.
- Dávalos, L.M., Cirranello, A.R., Geisler, J. H., Simmons, N. B., 2012. Understanding phylogenetic incongruence: lessons for phyllostomid bats. *Biological Reviews* 87; 991-1024.
- Demant, A., 1978. Características del Eje Neovolcánico Transmexicano y sus problemas de interpretación. Instituto de Geología, UNAM 2(2); 172-187.
- Demastes, J M., Spradling, T. A., Hafner, M. S., Hafner D. J., Reed, D. L., 2002. Systematics and phylogeography of pocket gophers in the genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(1); 144-154.
- Domínguez-Domínguez, O., Vázquez-Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32(1); 59-70.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., 2007. *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7; 214.
- Dubey, S., Michaux, J., Brünner, H., Hutterer, R., Vogel, P., 2009. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50; 633-641.
- Edwards, C. W., Bradley, R. D., 2001. Molecular phylogenetics of the *Neotoma floridana* species group. *Journal of Mammalogy*, 82(3); 791-798.
- Edwards, C. W., Bradley, R. D., 2002. Molecular systematics of the genus *Neotoma*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25; 489-500.
- Edwards, C. W., Fulhorst, C. F., Bradley, R. D., 2001. Molecular phylogenetics of the *Neotoma albigula* species group: further evidence of a paraphyletic assembles. *Journal of Mammalogy*, 82(2); 267-279.
- Engel, S. T., Hogan, K. M., Taylor, J. F., Davis, S. K., 1998. Molecular systematics and paleobiogeography of the south American rodents. *Society for Molecular Biology and Evolution*, 15(1); 35-49.
- Engstrom, M. D., Bickham, W J., 1983. Karyotype of *Nelsonia neotomodon*, with notes on the primitive karyotype of peromyscine rodents. *Journal of Mammalogy* 64(4); 685-688.
- Engstrom, M. D., Sánchez-Herrera O., Urbano-Vidales, G., 1992. Distribution, geographic variation, and systematic relationships within *Nelsonia* (Rodentia: Sigmodontinae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 105(4); 867-881.
- Escalante, T., Rodríguez G., Morrone J. J., 2004. The diversification of Neartic mammals in the Mexican transition zone, *Biological Journal of the Linnean Society* 83; 327-339.
- Escalante, T., Rodríguez G., Gámez N., León-Paniagua L., Barrera O., Sánchez-Cordero V., 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos, Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana, UNAM, México, D.F.

- Escalante, T., 2003. Determinación de prioridades en las áreas de conservación para los maíferos terrestres de México, empleando criterios biogeográficos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 74 (2); 211-237.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39; 783-791.
- Ferrari, L., López-Martínez M., Aguirre-Díaz G., Carrasco-Núñez G., 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27(4); 303-306.
- Ferrari, L., Pasquarè, G., Venegas-Salgado, S., and Romero-Rios, F., 1999, Geology of the western Mexican Volcanic Belt and adjacent Sierra Madre Occidental and Jalisco block, en Delgado-Granados, H., Aguirre-Díaz, G., and Stock, J. M., eds., *Cenozoic Tectonics and Volcanism of Mexico: Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper* 334.
- Ferrari, L., Conticelli, S., Vagelli, G., Petrone, C. M., Manetti, P., 2000. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318; 161-185.
- Ferrusquía-Villafranca, I., Arroyo-Cabrales, J., Martínez-Hernandez, E., Gama-Castro, J., Ruiz-González, J., Polaco, O., J., Jhonson, E., 2010. Pleistocene mammals of México: A critical review of regional chronofaunas, climate change response and biogeographic provinciality. *Quaternary International*, 217; 53-104.
- García-Mendoza, D. F., López-González, G. C., 2005. Diminutive woodrat (*Nelsonia neotomodon*) in Chihuahua, México. *The Southwestern Naturalist* 50(4); 530-506.
- García-Palomo, A., Macías, J. L., Garduño, V. H., 2000. Miocene to recent structural evolution of the Nevado de Toluca volcano region, central México. *Tectonophysics* 318; 281-302.
- Genoways, H. H., Jones, J. K., 1968. A new Mouse of the genus *Nelsonia* from Southern Jalisco, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 81; 97-100.
- Glendinning, J. I., 1992. Range extension for the diminutive woodrat, *Nelsonia neotomodon*, in the Mexican Transvolcanic range. *Southwestern Naturalist* 37(1); 92-93.
- Goldman, E. A., 1951. Biological investigations in Mexico. *Smithsonian miscellaneous collections* vol. 115, pp. 476.
- Gómez-Tuena, A., Orozco-Esquivel Ma. T., Ferrari L., 2005. Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, volumen conmemorativo del centenario, Temas Selectos de la Geología Mexicana LVII(3); 227-283.*
- Green, R. H., Young, R. C., 1993. Sampling rare species. *Ecological Applications* 3(2); 351-356.
- Griffiths, C. S., 1997. Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(3); 352-365.
- Hafner, M. S., Light, J. E., Hafner, D. J., Brant, S. V., Spradling, T. A., Demastes, J. W., 2005. Cryptic species in the Mexican pocket gopher, *Cratogeomys merriami*. *Journal of Mammalogy* 86; 1095-1108.

- Halffter, G., 1987. Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual Review of Entomology* 32; 95-114.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41; 95-98.
- Harrison, C. J. y Langdale, J.A., 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *The Plant Journal* 45; 561-572.
- Hedgren, O., Weslien, J., 2008. Detecting rare species with random or subjective sampling: a case study of red-listed saproxylic beetles in boreal Sweden. *Conservation Biology* 22(1); 212-215.
- Hillis, D. M., Moritz, G., Mable, B. K., 1996. *Molecular systematics*, Sinauer Associates 655 pp.
- Hoefreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kush, M., Pääbo, S., 2001. Ancient DNA. *Macmillan Magazines Ltd* 2; 353-359.
- Hoekstra, H. E., Krenz, J. G., Nachman, M. W., 2005. Local adaptation in the rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*): natural selection and phylogenetic history of populations. *Heredity* 94; 217-228.
- Hooper, T. E., 1954. A synopsis of the Cricetine rodent genus *Nelsonia*. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan Press*, 558: 1-12.
- Hooper, T. E., 1960. The glans penis in *Neotoma* (Rodentia) and allied genera. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan Press*, 618; 1-21.
- Hooper, E. T., Musser, G. G., 1964. The glans penis in neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of muroid rodents. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan Press*, 123; 1-57.
- Huelsenbeck, J. P., Bull, J. J., Cunningham, C. W., 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology and Evolution* 11; 152-158.
- Huelsenbeck, J. P., y Rannala, B., 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology* 53; 904-913.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. Mr. Bayes, a program for the Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17; 754-755.
- Instituto Nacional de Ecología, 1994. Programa de manejo de la Reserva Especial de la Biosfera Mariposa Monarca. SEDESOL, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2011. Atlas de México, estado actual del territorio: Relieve del Eje Neovolcánico. Acceso 15 de mayo 2012.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., Wilson, A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution* 2; 37-55.

International Union for Conservation of Nature, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <www.iucnredlist.org>.

Ivanova, N. V., Zemplak, T. S., Hanner, R. S., Hebert, P. D. N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7; 544-548.

Jansa, S. A., Weksler, M., 2004. Phylogeny of Murids rodents: relationships within and among major lineages as determinate by IRBP gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31; 256-276.

Kelt, D. A., M. S. Hafner, and The American Society of Mammalogists' ad oc Committee for Guidelines on handling rodents in the Field, 2010. Updated guidelines for protection of mammalogists and wildlife researchers from hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *Journal of Mammalogy* 91: 1524–1527.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16; 111-120.

Kumar, S., y Gadagkar, S., R., 2001. Disparity index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* 158; 1321-1327.

Lemmon, A. E., y Moriarty, E. C., 2004. The importance of proper model assumption in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 53; 265-277.

León-Paniagua, L., Navarro-Sigüenza, A. G., Hernández-Baños, B. E., Morales, J. C., 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia:Cricetidae:Neotominae) in the Mesoamerican highlands, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42; 653-664.

Liebherr, J. K., 1991. A general area cladogram for montane Mexico based on distributions in the platynine genera *Elliptoleus* and *Calathus* (Coleoptera: Carabidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 93; 390-406.

Longhofer, L. K., Bradley R. D., 2006. Molecular Systematics of the genus *Neotoma* based on DNA sequences from intrón 2 of the alcohol dehydrogenase gene. *Journal of Mammalogy*, 87(5); 961-970.

Lopez-Wilchis, R., Lopez, J. L., 1998. Los Mamíferos de México Depositados en Colecciones de Estados Unidos y Canadá, Universidad Autónoma Metropolitana, Vol. I, pp. 323.

Lopez-Wilchis, R., Lopez, J. L., 1999. Los Mamíferos de México Depositados en Colecciones de Estados Unidos y Canadá, Universidad Autónoma Metropolitana, Vol. II, pp. 469.

Lopez-Wilchis, R., Lopez, J. L., 2000. Los Mamíferos de México Depositados en Colecciones de Estados Unidos y Canadá, Universidad Autónoma Metropolitana, Vol. III, pp. 421.

McCormack, J. E., Peterson, A. T., Bonaccorso, E., Smith, T.B., 2008. Speciation in the highlands of Mexico: genetic and phenotypic divergence in the Mexican jay (*Aphelocoma ultramarina*). *Molecular Ecology*, 17; 2505-2521.

McDonald, J. A., 1993. Phytogeography and history of the alpine-subalpine flora of northeastern Mexico. *Biological diversity in Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press, New York, pp. 681-703.

Marshall, C. J., Liebherr, J. K., 2000. Cladistic biogeography of the Mexican Transition Zone *Journal of Biogeography*, 27; 203-216.

- Martin, P. S., Harrell, B. E., 1957. The Pleistocene history of temperate biotas in Mexico and Eastern United States. *Ecology* 38; 468-480.
- Martínková, N., y Searle, J. B., 2006. Amplification success rate of DNA from museum skin collections: a case study of stoats from 18 museums. *Molecular Ecology Notes* 6; 1014-1017.
- Merriam, C. H., 1897. *Nelsonia neotomodon*, a new genus and species of Murine rodent from México. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 11; 277-279.
- Merriam, C. H., 1903. Four new mammals, including a new genus (*Teanopus*), from México. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 16; 79-82.
- Miller, J. R., y Engstrom, M. D., 2008. The relationships of major lineages within peromyscine rodents: a molecular phylogenetic hypothesis and systematic reappraisal. *Journal of Mammalogy* 89(5); 1279-1295.
- Mitsubishi, M., 1996. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 10(5); 285-93.
- Miyamoto, M. M., y Boyle, S. M., 1989. The potencial importance of mitochondrial DNA sequence data to eutherian mammal phylogeny. En "The hierarchy of life: molecules and morphology in phylogenetic analysis", pp. 437-450. Elsevier Science, Amsterdam.
- Montiel, R., García-Sívoli, C., 2007. Los criterios de Autenticidad de AND antiguo y su uso en estudios poblacionales humanos. *Boletín Antropológico* 25(7); 215-229.
- Moreno-Letelier, A., Piñero, D., 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strombiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography* 36; 121-131.
- Moritz, C., Dowling, T. E., y Brown, W. M., 1987. Evolution in animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18; 269-292.
- Moritz, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review, *Molecular Ecology* 3; 401-411.
- Morrone, J. J., 2009. *Evolutionary biogeography: An integrative approach with case studies*. Columbia University Press, New York 301 p.
- Musser, G. G., Carleton, M. D. 2005. Superfamily Muroidea. Pp. 894–1531 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Orduña, T. C., Castro-Campillo, A., Ramirez-Pulido, J., 2000. Mammals from the Tarascan Plateau, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 4; 55-70.
- Palma, M., Romero, F. J., Velázquez, A., 2001. La cuenca de México: una revisión de su importancia biológica. *Biodiversitas* 6(37); 12-15.
- Patterson, D., B., 2002. On the continuing need for scientific collecting of mammals. *Journal of Neotropical Mammalogy* 9(2); 253-262.

- Payne, R. B., Sorenson, M. D., 2002. Museum collections as sources of genetic data. Alexander Koenig Research Institute and Museum of Zoology Proceedings, Vol. 2, Bonn, Germany.
- Pérez-Calix, E., 1996. Flora y Vegetación de la Cuenca del Lago de Zirahuén, Michoacán, México. Fascículo Complementario XIII, Publicaciones Institucionales SEP-CONACYT.
- Poux, C., Douzery, E. J. P., 2004. Primate phylogeny, evolutionary rate variations, and divergence times: a contribution from the nuclear gene IRBP. *American Journal of Physical Anthropology* 124; 1-16.
- Posada, D., and T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53:793-808.
- Posada, D., Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14; 817-818.
- Qiu-Hong, W., Hua, W., Tsutomu, F., Sheng-Guo, F., 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue?, *Electrophoresis* 25; 2165-2176.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., 2003. MCMC trace analysis tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edimburgh.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., 2009. TreeAnnotator v1.6.0: MCMC output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>. Acceso 3 de mayo 2013.
- Rannala, B., 2002. Identifiability of parameters in MCMC Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51; 754-760.
- Reeder, S. A., Darin, S. C., Edwards, C. W., Kilpatrick, C. W., Bradley, R. D., 2006. Neotomine-peromyscine rodent systematics based on combined analyses of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40; 251-258.
- Rodríguez-Banderas, A., Vargas-Mendoza, C. F., Buonamici, A., Vendramin, G. G., 2009. Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *Journal of Biogeography* 36; 1807-1820.
- Rokas, A., Williams, B. L., King, N., Carroll, S. B., 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425(23); 798-804.
- Rosenberg, M. S., y Kumar, S., 2003. Heterogeneity of nucleotide frequencies among evolutionary lineages an phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 20(4); 610-621.
- Rzedowski, J., Rzedowski, G. C., 1989. Sinopsis numérica de la flora fanerogámica del Valle de México. *Acta Botánica Mexicana* 8:15-30.
- Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. Erlich H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839); 487-491.

- SARH, 1993. Diagnóstico del Parque Nacional Nevado de Colima, Jalisco. Promotora Agropecuaria Universal, 90 pp.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales), 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental — Especies nativas de México de flora y fauna silvestres — Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio — Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010, 40 pp.
- Schmidt, T. R., Wu, W., Goodman, M., Grossman, L. I., 2001. Evolution of nuclear and mitochondrial encoded subunit interaction in cytochrome c oxidase. *Molecular Biology and Evolution* 18; 563-569.
- Sefc, K. C., Payne, P. B., Sorenson, M. D., 2007. Single base errors in PCR products from avian museum specimens and their effect on estimates of historical genetic diversity. *Conservation Genetics* 8; 879-884.
- Sikes, R., S., Gannon, W. L., and the Animal Care and Use of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild animals in research. *Journal of Mammalogy* 92(1); 809–823.
- Smith, M. F., Patton, J. L., 1993. The diversification of South American rodents: Evidence from mitochondrial sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of Linnean Society* 50; 149–177.
- Steppan, S. J., Adkins, R. M., Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence date estimates of rapid radiations in muroids rodents based on multiple nuclear genes. *Systematic Biology* 53; 533-553.
- Stoner, C J., Bininda-Emonds, O. R. P., Caro, T., 2003. The adaptative significance of coloration in lagomorphs. *Biological Journal of the Linnean Society* 79; 309-328.
- Su, B., Ying-Xiang, W., Hong, L., Wen, W., Yaping, Z., 1999. Phylogenetic study of complete cytochrome b genes in Musk Deer (Genus *Moschus*) using museum samples. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12(3); 241-249.
- Sullivan, J., Markert, J. A., Kilpatrick, C. W., 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46; 426-440.
- Sullivan, J., Arellano, E., Rogers, D. S., 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist* 155; 755-768.
- Swofford, D. L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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. *Molecular Biology and Evolution* 28; 2731-2739.
- Thompson, W. L., 2004. Sampling Rare or Elusive Species: Concepts, Designs, and Techniques for Estimating Population Parameters. Island Press, 429 pp.

Van Devender, T. R., 1990. Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. The last 40,000 years of biotic change, University of Arizona Press, Tucson, AZ. pp. 104–133.

Wandeler, P., Hoeck, E. A. P., Keller, L. F., 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 22(12); 634-642.

Wu, W., Schmidt, T. R., Goodman, M., Grossman, L. I., 2000. Molecular evolution of cytochrome c oxidase subunit 1 in primates: is there coevolution between mitochondrial and nuclear genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17; 294-304.

Yarza, D. T. E., 2003. Los volcanes del Sistema Volcánico Transversal. *Investigaciones Geográficas, Instituto de Geografía* 50; 220-234.

Yoder, A. D., Vilgalys, R., Ruvulo, M., 1996. Molecular evolutionary dynamics of cytochrome b in strepsirrhine Primates: the phylogenetic significance of third-position transversions. *Molecular Biology and Evolution* 13; 1339-1350.

Zaldivar-Riverón, A., Nieto-Montes de Oca, A., Lacleite, J. P., 2005. Phylogeny and evolution of dorsal pattern in the Mexican endemic lizard genus *Barisia* (Anguidae: Gerrhonotinae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43; 243-257.

Apéndice 1. Número de acceso en Genbank de los ejemplares de la familia Muridae utilizados en este estudio. Los números de catálogo corresponden únicamente a los procesados en el laboratorio de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA; fondo gris).

| No. Catálogo | Especies | Número de acceso GenBank | |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------|
| | | Cytb | COI |
| Subfamilia Sigmodontinae | | | |
| | <i>Sigmodon mascotensis</i> | AF425215 | JF492741 |
| | <i>Sigmodon mascotensis</i> | AF425216 | JF492740 |
| | <i>Sigmodon hispidus</i> | EU293757 | JF492721 |
| | <i>Sigmodon hispidus</i> | EU293756 | JF492707 |
| Subfamilia Neotominae | | | |
| CNMA 45236 | <i>Hodomys alleni</i> | AF186802 | HM422246 |
| CNMA 38586 | <i>Neotoma lepida</i> | DQ781254 | GU686266 |
| CNMA 38588 | <i>Neotoma lepida</i> | DQ781253 | Bold Systems |
| CNMA 42986 | <i>Xenomys nelsoni</i> | No disponible | GU686262 |
| CNMA 42991 | <i>Xenomys nelsoni</i> | No disponible | GU686264 |
| CNMA 42951 | <i>Osgoodomys banderanus</i> | EF989956 | GU686238 |
| CNMA 42974 | <i>Osgoodomys banderanus</i> | AF155383 | GU686239 |
| CNMA 40064 | <i>Peromyscus aztecus</i> | U89966 | GU686248 |
| CNMA 40068 | <i>Peromyscus aztecus</i> | U89967 | GU686232 |
| CNMA 44076 | <i>Peromyscus gratus</i> | AY376421 | GU686230 |
| CNMA 44071 | <i>Peromyscus gratus</i> | AY376422 | GU686228 |
| CNMA 40076 | <i>Peromyscus levipes</i> | DQ000477 | GU686241 |
| CNMA 44510 | <i>Peromyscus melanophrys</i> | EF989989 | GU686227 |
| CNMA 44512 | <i>Peromyscus melanophrys</i> | AY376424 | GU686225 |
| CNMA 3129 | <i>Reithrodontomys fulvescens</i> | AY859465 | HM422244 |
| CNMA 33619 | <i>Reithrodontomys mexicanus</i> | AY859450 | GU686252 |
| CNMA 40167 | <i>Reithrodontomys sumichrasti</i> | AF211910 | GU686256 |
| CNMA 40168 | <i>Reithrodontomys sumichrasti</i> | AF211913 | GU686250 |
| CNMA 45262 | <i>Baiomys musculus</i> | AF548490 | HM422245 |
| | <i>Scotinomys teguina</i> | AF108705 | JF446277 |
| Subfamilia Tylomyinae | | | |
| CNMA TUX608 | <i>Tylomys nudicaudus</i> | DQ179812 | Bold Systems |
| | <i>Ototylomys phyllotis</i> | DQ179814 | JQ600302 |
| | <i>Nyctomys sumichrasti</i> | AY195801 | JF444683 |

Apéndice 2. Colecciones Biológicas de México y Estados Unidos donde se encuentran depositados los ejemplares de *Nelsonia goldmani*.

| Colección | No. Voucher | Sexo | Estado | Localidad | Fecha de colecta | Colector | Preservación |
|---|--------------------|-------------|----------------|------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| Colección Nacional de Mamíferos | | CNMA | | | | | |
| | 27965 | Macho | Edo. de México | Jilotepec | 17-marzo-1986 | Oscar Sánchez | Piel y Esqueleto |
| | 19699 | Macho | Edo. de México | Jilotepec | 26-agosto-1982 | Oscar Sánchez | Piel y Esqueleto |
| Número de colecta personal Mal 44 | 46291 | Macho | Edo. de México | Jilotepec | 16-octubre-2010 | M. Ángel León T. | Piel y Esqueleto |
| Número de colecta personal Mal 45 | 46292 | Hembra | Edo. de México | Jilotepec | 16-octubre-2010 | M. Ángel León T. | Piel y Esqueleto |
| Número de colecta personal Mal 62 | 46290 | Hembra | Jalisco | Nevado de Colima | 14-diciembre-2011 | M. Ángel León T. | Piel y Esqueleto |
| Número de colecta personal Mal 65 | Fac4611 | Hembra | Jalisco | Nevado de Colima | 17-diciembre-2012 | M. Ángel León T. | Piel y Esqueleto |
| Número de colecta personal Mal 74 | Fac4620 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 22-diciembre-2012 | M. Ángel León T. | Piel y Esqueleto |
| Florida Museum of Natural History | | UFMNH | | | | | |
| | 20979 | Hembra | Michoacán | Sierra Chincua | 13-marzo-1985 | J. Glendinning | Isopropanol |
| California Academy of Sciences | | CAS | | | | | |
| | 151587 | Macho | Michoacán | Sur de Pátzcuaro | 31-agosto-1959 | R. Bandar | Piel y Esqueleto |
| | 151588 | Macho | Michoacán | Sur de Pátzcuaro | 30-agosto-1959 | R. Bandar | Piel y Esqueleto |
| National Museum of Natural History | | USNM | | | | | |
| | 125598 | Macho | Michoacán | Cerro Patambán | 29-enero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125599 | Macho | Michoacán | Cerro Patambán | 29-enero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125600 | Macho | Michoacán | Cerro Patambán | 30-enero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125601 | Macho | Michoacán | Cerro Patambán | 30-enero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125602 | Hembra | Michoacán | Cerro Patambán | 30-enero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125604 | Hembra | Michoacán | Cerro Patambán | 02-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125813 | Macho | Michoacán | Cerro Tancítaro | 22-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125814 | Hembra | Michoacán | Cerro Tancítaro | 22-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel |
| | 125815 | Macho | Michoacán | Cerro Tancítaro | 23-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125816 | Macho | Michoacán | Cerro Tancítaro | 24-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125817 | Hembra | Michoacán | Cerro Tancítaro | 24-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125818 | Macho | Michoacán | Cerro Tancítaro | 25-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| | 125819 | Hembra | Michoacán | Cerro Tancítaro | 25-febrero-1903 | E. Nelson y E. Goldman | Piel y Esqueleto |
| Harvard University, Museum of Comparative Zoology | | MCZ | | | | | |
| | 20156 | Hembra | Michoacán | Cerro Patambán | 31-enero-1903 | Nelson E. W. | Piel y Esqueleto |
| Louisiana State University Museum of Zoology | | LSUMZ | | | | | |
| | 10455 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 22-junio-1965 | A. L. Gardner | Piel y Esqueleto |

Continuación del Apéndice 2

| Natural History Museum of Los Angeles County | | LACM | | | | | |
|---|--------|---------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|--|
| 037736 | Macho | Colima | Nevado de Colima | 12-abril-1968 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 037737 | Macho | Colima | Nevado de Colima | 12-abril-1968 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 011536 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 09-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011537 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 07-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011538 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 07-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011539 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 03-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011540 | Hembra | Jalisco | Nevado de Colima | 10-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011541 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 10-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011542 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 27-junio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| 011543 | Macho | Jalisco | Nevado de Colima | 09-julio-1959 | W. J. Schaldach | Piel y Esqueleto | |
| Museum of Natural History, University of Kansas | | UK | | | | | |
| 109434 | Hembra | Jalisco | El Jazmín | 19-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 109435 | Macho | Jalisco | El Jazmín | 20-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 109436 | Hembra | Jalisco | El Jazmín | 20-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 109437 | Hembra | Jalisco | El Jazmín | 20-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 109438 | Hembra | Jalisco | El Jazmín | 20-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Cráneo | |
| 109440 | Macho | Jalisco | El Jazmín | 21-octubre-1966 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |
| 111953 | Macho | Jalisco | El Jazmín | 08-febrero-1967 | P. L. Clifton | Piel y Esqueleto | |

Apéndice 3. En la parte inferior izquierda distancias corregidas con el modelo Kimura 2 parámetros de los genes citocromo oxidasa subunidad 1 y citocromo b en las muestras de *Nelsonia*, en la parte superior derecha se muestra el número de cambios entre los pares de secuencias. El símbolo ? corresponde a la ausencia de datos debido a que no hubo amplificación de la muestra.

Citocromo oxidasa subunidad 1

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| 1 CRD3737Nneotomodon | | 28 | 79 | 79 | 93 | 88 | 88 | 85 | ? | 86 | 87 | 101 | 92 | 94 | 85 | 86 | 86 | 86 | 88 | 88 | 89 | 89 | 86 | 84 |
| 2 39038Nneotomodon | 0.0448 | | 85 | 85 | 99 | 87 | 87 | 84 | ? | 83 | 86 | 93 | 86 | 88 | 84 | 83 | 83 | 85 | 87 | 87 | 89 | 89 | 85 | 83 |
| 3 Mal44Ngoldmani | 0.1362 | 0.1480 | | 0 | 29 | 42 | 42 | 36 | ? | 41 | 39 | 57 | 48 | 50 | 69 | 70 | 70 | 68 | 45 | 45 | 47 | 47 | 70 | 63 |
| 4 Mal45Ngoldmani | 0.1362 | 0.1480 | 0.0000 | | 29 | 42 | 42 | 36 | ? | 41 | 39 | 57 | 48 | 50 | 69 | 70 | 70 | 68 | 45 | 45 | 47 | 47 | 70 | 63 |
| 5 UFNgoldmani | 0.1627 | 0.1750 | 0.0460 | 0.0460 | | 56 | 56 | 48 | ? | 43 | 42 | 52 | 63 | 63 | 85 | 86 | 86 | 84 | 61 | 61 | 63 | 63 | 86 | 79 |
| 6 CAS51Ngoldmani | 0.1546 | 0.1523 | 0.0683 | 0.0683 | 0.0920 | | 0 | 38 | ? | 44 | 47 | 51 | 45 | 47 | 45 | 46 | 46 | 46 | 21 | 21 | 23 | 23 | 46 | 39 |
| 7 CAS52Ngoldmani | 0.1546 | 0.1523 | 0.0683 | 0.0683 | 0.0920 | 0.0000 | | 38 | ? | 44 | 47 | 51 | 45 | 47 | 45 | 46 | 46 | 46 | 21 | 21 | 23 | 23 | 46 | 39 |
| 8 US814Ngoldmani | 0.1461 | 0.1442 | 0.0577 | 0.0577 | 0.0780 | 0.0611 | 0.0611 | | ? | 9 | 10 | 36 | 33 | 33 | 65 | 65 | 65 | 66 | 41 | 41 | 43 | 43 | 66 | 59 |
| 9 US815Ngoldmani | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| 10 US816Ngoldmani | 0.1482 | 0.1424 | 0.0660 | 0.0660 | 0.0695 | 0.0712 | 0.0712 | 0.0140 | ? | | 7 | 32 | 37 | 37 | 69 | 69 | 69 | 70 | 45 | 45 | 47 | 47 | 70 | 63 |
| 11 US817Ngoldmani | 0.1502 | 0.1484 | 0.0626 | 0.0626 | 0.0677 | 0.0764 | 0.0764 | 0.0155 | ? | 0.0108 | | 34 | 37 | 37 | 73 | 73 | 73 | 74 | 49 | 49 | 51 | 51 | 74 | 67 |
| 12 US601Ngoldmani | 0.1785 | 0.1618 | 0.0936 | 0.0936 | 0.0851 | 0.0833 | 0.0833 | 0.0577 | ? | 0.0511 | 0.0544 | | 13 | 13 | 73 | 73 | 73 | 74 | 49 | 49 | 51 | 51 | 74 | 67 |
| 13 US602Ngoldmani | 0.1611 | 0.1487 | 0.0782 | 0.0782 | 0.1042 | 0.0733 | 0.0733 | 0.0527 | ? | 0.0593 | 0.0594 | 0.0203 | | 2 | 65 | 65 | 65 | 66 | 41 | 41 | 43 | 43 | 66 | 59 |
| 14 US604Ngoldmani | 0.1658 | 0.1533 | 0.0821 | 0.0821 | 0.1048 | 0.0771 | 0.0771 | 0.0530 | ? | 0.0596 | 0.0597 | 0.0204 | 0.0031 | | 65 | 65 | 65 | 66 | 41 | 41 | 43 | 43 | 66 | 59 |
| 15 Mal62Ngcifltoni | 0.1480 | 0.1462 | 0.1167 | 0.1167 | 0.1458 | 0.0737 | 0.0737 | 0.1085 | ? | 0.1156 | 0.1231 | 0.1229 | 0.1088 | 0.1092 | | 1 | 1 | 1 | 24 | 24 | 21 | 21 | 1 | 3 |
| 16 Mal65Ngcifltoni | 0.1500 | 0.1442 | 0.1186 | 0.1186 | 0.1477 | 0.0754 | 0.0754 | 0.1085 | ? | 0.1156 | 0.1231 | 0.1229 | 0.1088 | 0.1092 | 0.0015 | | 0 | 2 | 25 | 25 | 22 | 22 | 2 | 4 |
| 17 Mal74Ngcifltoni | 0.1500 | 0.1442 | 0.1186 | 0.1186 | 0.1477 | 0.0754 | 0.0754 | 0.1085 | ? | 0.1156 | 0.1231 | 0.1229 | 0.1088 | 0.1092 | 0.0015 | 0.0000 | | 2 | 25 | 25 | 22 | 22 | 2 | 4 |
| 18 LSUMZNgclifltoni | 0.1500 | 0.1482 | 0.1148 | 0.1148 | 0.1438 | 0.0754 | 0.0754 | 0.1103 | ? | 0.1175 | 0.1250 | 0.1248 | 0.1107 | 0.1111 | 0.0015 | 0.0031 | 0.0031 | | 25 | 25 | 22 | 22 | 2 | 4 |
| 19 LA536Ngcifltoni | 0.1550 | 0.1527 | 0.0736 | 0.0736 | 0.1011 | 0.0333 | 0.0333 | 0.0662 | ? | 0.0729 | 0.0799 | 0.0798 | 0.0664 | 0.0666 | 0.0381 | 0.0397 | 0.0397 | 0.0397 | | 0 | 2 | 2 | 25 | 18 |
| 20 LA537Ngcifltoni | 0.1550 | 0.1527 | 0.0736 | 0.0736 | 0.1011 | 0.0333 | 0.0333 | 0.0662 | ? | 0.0729 | 0.0799 | 0.0798 | 0.0664 | 0.0666 | 0.0381 | 0.0397 | 0.0397 | 0.0397 | 0.0000 | | 2 | 2 | 25 | 18 |
| 21 LA736Ngcifltoni | 0.1571 | 0.1569 | 0.0771 | 0.0771 | 0.1048 | 0.0366 | 0.0366 | 0.0697 | ? | 0.0765 | 0.0835 | 0.0834 | 0.0699 | 0.0702 | 0.0332 | 0.0349 | 0.0349 | 0.0349 | 0.0031 | 0.0031 | | 0 | 22 | 15 |
| 22 LA737Ngcifltoni | 0.1571 | 0.1569 | 0.0771 | 0.0771 | 0.1048 | 0.0366 | 0.0366 | 0.0697 | ? | 0.0765 | 0.0835 | 0.0834 | 0.0699 | 0.0702 | 0.0332 | 0.0349 | 0.0349 | 0.0349 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0000 | | 22 | 15 |
| 23 UK109Ngcifltoni | 0.1500 | 0.1482 | 0.1186 | 0.1186 | 0.1477 | 0.0754 | 0.0754 | 0.1103 | ? | 0.1175 | 0.1250 | 0.1248 | 0.1107 | 0.1111 | 0.0015 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0397 | 0.0397 | 0.0349 | 0.0349 | | 2 |
| 24 UK111Ngcifltoni | 0.1479 | 0.1459 | 0.1067 | 0.1067 | 0.1356 | 0.0640 | 0.0640 | 0.0986 | ? | 0.1057 | 0.1131 | 0.1129 | 0.0989 | 0.0993 | 0.0047 | 0.0062 | 0.0062 | 0.0062 | 0.0286 | 0.0286 | 0.0238 | 0.0238 | 0.0031 | |

Continuación del Apéndice 3

Citocromo b

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|----|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| 1 | CDRDNneotomodon | | 42 | 119 | 120 | 129 | 121 | 121 | 175 | 151 | 153 | 160 | 140 | 146 | 149 | 119 | 125 | 125 | 130 | 141 | 137 | 134 | 138 | 124 | 129 |
| 2 | 39038Nneotomodon | 0.0380 | | 119 | 122 | 132 | 130 | 130 | 180 | 155 | 157 | 163 | 142 | 148 | 148 | 120 | 124 | 124 | 129 | 147 | 140 | 133 | 137 | 130 | 134 |
| 3 | mal44Ngoldmani | 0.1142 | 0.1145 | | 3 | 57 | 75 | 79 | 122 | 105 | 111 | 120 | 81 | 81 | 83 | 102 | 106 | 106 | 60 | 89 | 85 | 74 | 74 | 76 | 83 |
| 4 | mal45Ngoldmani | 0.1152 | 0.1176 | 0.0026 | | 57 | 77 | 81 | 122 | 105 | 111 | 120 | 81 | 81 | 83 | 105 | 109 | 109 | 62 | 91 | 87 | 76 | 76 | 75 | 82 |
| 5 | UFNgoldmani | 0.1238 | 0.1273 | 0.0517 | 0.0517 | | 76 | 80 | 131 | 115 | 114 | 120 | 100 | 106 | 106 | 117 | 121 | 121 | 91 | 112 | 112 | 107 | 111 | 102 | 107 |
| 6 | CAS51Ngoldmani | 0.1156 | 0.1255 | 0.0692 | 0.0711 | 0.0698 | | 10 | 119 | 92 | 98 | 105 | 77 | 87 | 93 | 84 | 88 | 88 | 79 | 87 | 85 | 81 | 83 | 80 | 81 |
| 7 | CAS52Ngoldmani | 0.1155 | 0.1254 | 0.0731 | 0.0750 | 0.0737 | 0.0088 | | 126 | 99 | 107 | 114 | 82 | 90 | 98 | 86 | 92 | 92 | 87 | 93 | 91 | 87 | 89 | 86 | 89 |
| 8 | US814Ngoldmani | 0.1725 | 0.1784 | 0.1155 | 0.1155 | 0.1248 | 0.1125 | 0.1198 | | 45 | 48 | 44 | 101 | 105 | 106 | 160 | 161 | 161 | 97 | 100 | 99 | 86 | 83 | 108 | 110 |
| 9 | US815Ngoldmani | 0.1466 | 0.1511 | 0.0983 | 0.0983 | 0.1084 | 0.0855 | 0.0925 | 0.0405 | | 28 | 26 | 76 | 89 | 90 | 140 | 141 | 141 | 86 | 77 | 73 | 62 | 60 | 95 | 93 |
| 10 | US816Ngoldmani | 0.1487 | 0.1532 | 0.1043 | 0.1044 | 0.1074 | 0.0914 | 0.1006 | 0.0433 | 0.0249 | | 17 | 80 | 93 | 94 | 143 | 144 | 144 | 90 | 85 | 84 | 78 | 74 | 98 | 93 |
| 11 | US817Ngoldmani | 0.1562 | 0.1596 | 0.1135 | 0.1135 | 0.1134 | 0.0983 | 0.1075 | 0.0396 | 0.0231 | 0.0150 | | 83 | 96 | 101 | 149 | 150 | 150 | 96 | 90 | 87 | 79 | 77 | 103 | 100 |
| 12 | US601Ngoldmani | 0.1354 | 0.1377 | 0.0748 | 0.0748 | 0.0935 | 0.0710 | 0.0760 | 0.0943 | 0.0699 | 0.0736 | 0.0766 | | 20 | 27 | 113 | 116 | 116 | 91 | 83 | 80 | 78 | 78 | 102 | 100 |
| 13 | US602Ngoldmani | 0.1420 | 0.1443 | 0.0747 | 0.0748 | 0.0995 | 0.0808 | 0.0838 | 0.0984 | 0.0826 | 0.0864 | 0.0894 | 0.0177 | | 9 | 119 | 122 | 122 | 90 | 94 | 91 | 87 | 87 | 103 | 103 |
| 14 | US604Ngoldmani | 0.1453 | 0.1443 | 0.0767 | 0.0767 | 0.0996 | 0.0867 | 0.0918 | 0.0994 | 0.0835 | 0.0875 | 0.0944 | 0.0241 | 0.0079 | | 122 | 125 | 125 | 92 | 98 | 97 | 87 | 87 | 107 | 107 |
| 15 | mal62Ngcliftoni | 0.1139 | 0.1152 | 0.0968 | 0.0999 | 0.1113 | 0.0781 | 0.0801 | 0.1562 | 0.1348 | 0.1383 | 0.1443 | 0.1070 | 0.1131 | 0.1163 | | 6 | 6 | 101 | 124 | 118 | 113 | 117 | 82 | 81 |
| 16 | mal65Ngcliftoni | 0.1204 | 0.1195 | 0.1010 | 0.1041 | 0.1155 | 0.0821 | 0.0861 | 0.1573 | 0.1358 | 0.1394 | 0.1454 | 0.1101 | 0.1163 | 0.1195 | 0.0053 | | 0 | 103 | 126 | 120 | 115 | 119 | 84 | 83 |
| 17 | mal74Ngcliftoni | 0.1204 | 0.1195 | 0.1010 | 0.1041 | 0.1155 | 0.0821 | 0.0861 | 0.1573 | 0.1358 | 0.1394 | 0.1454 | 0.1101 | 0.1163 | 0.1195 | 0.0053 | 0.0000 | | 103 | 126 | 120 | 115 | 119 | 84 | 83 |
| 18 | LSUMZNgcliftoni | 0.1248 | 0.1239 | 0.0546 | 0.0565 | 0.0844 | 0.0728 | 0.0807 | 0.0902 | 0.0794 | 0.0834 | 0.0892 | 0.0845 | 0.0835 | 0.0855 | 0.0949 | 0.0969 | 0.0969 | | 57 | 57 | 50 | 54 | 36 | 44 |
| 19 | LA536Ngcliftoni | 0.1359 | 0.1425 | 0.0823 | 0.0843 | 0.1051 | 0.0804 | 0.0864 | 0.0932 | 0.0707 | 0.0784 | 0.0833 | 0.0767 | 0.0875 | 0.0915 | 0.1181 | 0.1202 | 0.1202 | 0.0516 | | 12 | 32 | 34 | 70 | 73 |
| 20 | LA537Ngcliftoni | 0.1318 | 0.1352 | 0.0785 | 0.0804 | 0.1052 | 0.0786 | 0.0846 | 0.0922 | 0.0669 | 0.0775 | 0.0804 | 0.0738 | 0.0847 | 0.0906 | 0.1119 | 0.1140 | 0.1140 | 0.0516 | 0.0106 | | 28 | 30 | 70 | 69 |
| 21 | LA736Ngcliftoni | 0.1290 | 0.1279 | 0.0678 | 0.0698 | 0.1003 | 0.0748 | 0.0807 | 0.0794 | 0.0564 | 0.0717 | 0.0727 | 0.0719 | 0.0807 | 0.0806 | 0.1069 | 0.1090 | 0.1090 | 0.0451 | 0.0285 | 0.0249 | | 6 | 71 | 72 |
| 22 | LA737Ngcliftoni | 0.1332 | 0.1322 | 0.0678 | 0.0697 | 0.1043 | 0.0768 | 0.0827 | 0.0765 | 0.0546 | 0.0679 | 0.0708 | 0.0719 | 0.0807 | 0.0806 | 0.1110 | 0.1131 | 0.1131 | 0.0489 | 0.0304 | 0.0267 | 0.0053 | | 73 | 72 |
| 23 | UK109Ngcliftoni | 0.1188 | 0.1256 | 0.0701 | 0.0692 | 0.0954 | 0.0737 | 0.0795 | 0.1012 | 0.0883 | 0.0914 | 0.0962 | 0.0956 | 0.0965 | 0.1006 | 0.0760 | 0.0780 | 0.0780 | 0.0322 | 0.0640 | 0.0639 | 0.0650 | 0.0669 | | 17 |
| 24 | UK111Ngcliftoni | 0.1239 | 0.1296 | 0.0769 | 0.0759 | 0.1004 | 0.0747 | 0.0826 | 0.1032 | 0.0864 | 0.0865 | 0.0933 | 0.0936 | 0.0966 | 0.1007 | 0.0749 | 0.0769 | 0.0769 | 0.0395 | 0.0668 | 0.0630 | 0.0660 | 0.0660 | 0.0150 | |