



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

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA**

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL TEPORINGO (*Romerolagus diazi*) Y SUS GÉNEROS
HERMANOS, A TRAVÉS DE MARCADORES FILOGENÓMICOS COMO LOS
ELEMENTOS ULTRACONSERVADOS.**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**“A NEW HYPOTHESIS ON THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG THE
LEPORIDS USING ULTRACONSERVED ELEMENTS AS PATHWAY FOR REVELING
Romerolagus POSITION”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

YOLANDA ESTEFANIA CANO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ALEJANDRO VELÁZQUEZ MONTES
Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, UNAM

DRA. ALICIA MASTRETTA YANES
CONACYT-CONABIO

DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Facultad de Ciencias, UNAM

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL TEPORINGO (*Romerolagus diazi*) Y SUS GÉNEROS
HERMANOS, A TRAVÉS DE MARCADORES FILOGENÓMICOS COMO LOS
ELEMENTOS ULTRACONSERVADOS.**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**“A NEW HYPOTHESIS ON THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG THE
LEPORIDS USING ULTRACONSERVED ELEMENTS AS PATHWAY FOR REVELING
Romerolagus POSITION”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

YOLANDA ESTEFANIA CANO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ALEJANDRO VELÁZQUEZ MONTES
Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, UNAM
DRA. ALICIA MASTRETTA YANES
CONACYT-CONABIO
DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Facultad de Ciencias, UNAM

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE, 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD (IIES-M)

OFICIO CPCB/555/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de abril de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** de la alumna **CANO SÁNCHEZ YOLANDA ESTEFANIA** con número de cuenta **517007765** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: **“A NEW HYPOTHESIS ON THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG THE LEPORIDS USING ULTRA CONSERVED ELEMENTS AS PATHWAY FOR REVELING *Romerolagus* POSITION”**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **“ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL TEPORINGO (*Romerolagus diazi*) Y SUS GÉNEROS HERMANOS, A TRAVÉS DE MARCADORES FILOGENÓMICOS COMO LOS ELEMENTOS ULTRA CONSERVADOS”**, ambos realizados bajo la dirección del **DR. JOSÉ ALEJANDRO VELÁZQUEZ MONTES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente:	DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER
Vocal:	DRA. FLOR DEL CARMEN RODRÍGUEZ GÓMEZ
Vocal:	DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRÍQUEZ
Vocal:	DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Secretaria:	DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de junio de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial, por el apoyo financiero adicional a través del programa PAEP para la realización de las estancias de investigación de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para realizar los estudios de maestría.

A la Secretaría de Desarrollo Institucional de la UNAM, a cargo del Dr. Alberto Ken Oyama, quien aportó los recursos financieros para llevar a cabo las visitas a los museos en Estados Unidos y las secuenciaciones.

Al Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental de la UNAM, quien también contribuyó con apoyo logístico y financiero a través del Dr. Alejandro Velázquez.

De forma muy especial, agradezco a mi tutor, el Dr. Alejandro Velázquez Montes y a los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa, Dra. Livia León Paniagua y Dra. Alicia Mastretta Yanes por las valiosísimas aportaciones, el apoyo incondicional brindado y la paciencia para llevar a buen término la etapa final de este posgrado.

Agradecimientos personales

Agradezco infinitamente a la Dra. Flor Rodríguez, quien me acompañó desde el día 0 de este proyecto de manera desinteresada y sin la que no hubiera logrado concluirlo, este proyecto también es tuyo.

Al Dr. Adam Ferguson por todo el apoyo para realizar mi estancia en el Field Museum; por abrirme su colección y ayudarme a conseguir todas las muestras disponibles alrededor de los Estados Unidos en tiempo récord. Al Dr. Kevin Feldheim por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todas las herramientas para realizar mis experimentos.

Al Dr. Luis Ruedas quien fue parte fundamental en la última etapa de la integración del artículo, el cual no vería la luz sin sus grandes aportaciones.

A mi jurado por el interés, apoyo y crítica, necesarios para la realización de este trabajo. Agradezco el privilegio de tenerlos como sínodos.

A mis papás y a Frida y Chema por nunca dudar de mi capacidad y estar siempre presentes, gracias por los ánimos y por el apoyo incondicional de todo tipo.

A mis compañeros del CIGA por caminar juntos, dándonos ánimo. A los chicos del cubil que me recibieron con los brazos abiertos.

A toda mi familia y amigos que nunca dejaron de echarme porras.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
A new hypothesis on the phylogenetic relationships among the leporids using ultraconserved elements as pathway for reveling <i>Romerolagus</i> position.	21
DECLARATIONS.....	22
ABSTRACT	24
KEYWORDS	24
INTRODUCTION	25
ACKNOWLEDGEMENTS	41
FUNDING	42
REFERENCES	43
DISCUSIÓN GENERAL.....	52
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA.....	56

RESUMEN

Los lagomorfos son un orden de mamíferos con una distribución mundial, incluye 12 géneros y 108 especies separadas en 2 familias vivientes; Ochotonidae (picas) y Leporidae (conejos y liebres). Se han realizado numerosos intentos moleculares y morfológicos para resolver su filogenia, sin embargo, los resultados siguen siendo debatidos. El objetivo de esta investigación fue establecer una filogenia robusta de los lepóridos. Nos centramos en la posición de la especie en peligro de extinción *Romerolagus diazi* debido a la dificultad para ubicarla dentro del árbol evolutivo. Se obtuvieron muestras correspondientes a al menos una especie de los 12 géneros que componen el orden Lagomorpha, de museos e instituciones en México y los Estados Unidos. Los Elementos Ultraconservados (UCEs) fueron capturados y secuenciados. Se realizó una filogenia de máxima verosimilitud con un total de 4,195 loci capturados y 59,112 sitios informativos. La filogenia recuperó y sostuvo las relaciones entre Ochotonidae y Leporidae, separando los dos clados. *Pronolagus rupestris* y *Nesolagus timminsi* fueron recuperados como el primer grupo lepórido divergente. Se recuperaron cuatro especímenes de *R. diazi* que aparecen como hermanos del resto de los Leporidae lo que en general concuerda con filogenias previas. Los resultados demostraron ser exitosos para desentrañar una filogenia robusta con altos valores de soporte en cada clado del orden Lagomorpha, lo que permitió aclarar relaciones filogenéticas previamente indefinidas. Esta información nos permite seguir utilizando colecciones de museos de todo el mundo para completar toda la filogenia de los lagomorfos.

ABSTRACT

Lagomorpha is an order of mammals with a worldwide distribution, includes 12 genera and 108 species separated into two living families, Ochotonidae (pikas) and Leporidae (rabbits and hares). Numerous molecular and morphological attempts have been pursuit to solve the phylogeny of lagomorphs; yet outcomes are still contested. The aim of this research was to establish a robust phylogeny of leporids. We focus on the position of the Endangered *Romerolagus diazi*, due to its difficulty of being placed in the evolutionary tree. We obtained samples corresponded from at least one species of the 12 genera that comprise the order Lagomorpha, from museums and institutions in Mexico and the United States. Ultraconserved elements (UCEs) were captured and sequenced. Maximum-likelihood phylogeny was performed with a total of 4,195 loci captured and 59,112 informative sites. The phylogeny recovered and supported the relationships between Ochotonidae and Leporidae, separating the two clades. *Pronolagus rupestris* and *Nesolagus timminsi* were retrieved as the first-diverging leporid group. Four specimens from *R. diazi* were retrieved and appears as sister to the rest of the Leporidae and generally matched with previously declared phylogenies. The results proved successful to unravel a robust phylogeny with high support values in every clade of the order Lagomorpha, which allowed clarifying previously undefined phylogenetic relationships. This information allows us to continue utilizing collections from museums around the world to complete the entire Lagomorpha phylogeny.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los lagomorfos son un orden compuesto por mamíferos herbívoros de tamaño pequeño y mediano, distribuidos alrededor del planeta habitando casi todos sus biomas (tundra, pastizales, áreas boscosas y desiertos). Este orden incluye 12 géneros y 108 especies separadas en 2 familias vivientes; Ocotonidae, representada únicamente por el género *Ochotona* Link, 1795 (picas) que está compuesto por 34 especies; y Leporidae (conejos y liebres) integrado por 11 géneros y 74 especies (Burgin et al. 2018; Ruedas et al. 2018). El interés por resolver la historia evolutiva de los lagomorfos y en especial de los lepóridos, ha producido numerosos estudios moleculares y morfológicos sin lograr un consenso total (Hackländer et al. 2008). El problema reside particularmente en la naturaleza extremadamente conservadora de la variación morfológica en los lepóridos (Wible 2007; Ge et al. 2015), junto con una radiación explosiva y en gran parte simultánea de los principales linajes existentes (Flynn et al. 2014). Uno de los ejemplos más claros es que los diferentes conjuntos de datos moleculares y morfológicos siguen siendo contradictorios entre sí. De acuerdo a Sparwel et al. (2019), la única constante entre estos conjuntos de datos, es la posición de la liebre de roca roja africana, *Pronolagus rupestris* A. Smith, 1834 como el taxón basal lepórido en los estudios moleculares (Halanych y Robinson 1999; Yamada et al. 2002; Kriegs et al. 2010; Sparwel et al. 2019), aunque en ocasiones se ubica como el taxón hermano del conejo de Amami, *Pentalagus furnessi* Stone, 1900 (p. ej., Stoner et al. 2003); el conejo de Bunyoro, *Poelagus marjorita* St. Leger, 1932 (p. ej., Matthee et al. 2004; Robinson y Matthee 2005) o el conejo rayado, género *Nesolagus* Forsyth-Major, 1899 (p. ej., Ge et al. 2013).

El registro fósil, sugiere a Asia como el centro de origen de los lagomorfos hace aproximadamente 45 millones de años (Ma) lo que corresponde al período del Eoceno Temprano (Dawson 1958, 1981; Averianov 2001; Rose et al. 2008; Ge et al. 2013), aunque los datos recientemente publicados por Rose et al. (2018) sugieren un origen aún más antiguo basado en depósitos de material del Eoceno temprano (hace aproximadamente 53 Ma) en Guyarat al oeste de la India central. Halanych y Robinson (1999), basados en datos de ADNr del gen 12S, estimaron la divergencia entre el conejo europeo *Oryctolagus* Lilljeborg, 1874 y *Lepus* Linnaeus, 1758 (liebres y conejos) hace aproximadamente 12 a 16 Ma; mientras que Su y Nei (1999), por el contrario, estimaron que la radiación de los lepóridos actuales tuvo lugar

aproximadamente hace 21.9 Ma (\pm 3,8 Ma), considerado el Mioceno Tardío como el momento crítico en esta cladogénesis en el que la subfamilia evolucionó (Ge et al. 2015), con la aparición del lepórido extinto †*Alilepus* (Dawson 1958, 1981) y supuestamente ocurrió por medio de radiaciones rápidas y por la dicotomía entre *Oryctolagus* y *Lepus* (Halanych y Robinson 1999; Robinson y Matthee 2005; Flynn et al. 2014; Silva et al. 2019).

La hipótesis de las relaciones evolutivas entre los lagomorfos y más específicamente de los lepóridos, ha sido entonces propuesta y modificada a través de los años. Dice (1929) propuso una de las primeras taxonomías, basada en el patrón de esmalte del primer premolar inferior (P_3), dividiendo a la familia Leporidae en tres subfamilias: 1) Palaeolaginae, que incluye a los existentes *Romerolagus* Merriam, 1896 (el conejo de los volcanes o zacatuche), *Pronolagus* Lyon, 1904 y *Pentalagus* Lyon, 1904 junto con los extintos †*Allolagus* y †*Palaeolagus*; 2) Archaeolaginae, compuesta por dos taxones actualmente extintos: †*Hypolagus* y †*Archaeolagus*; y 3) Leporinae, incluyendo el existente *Brachylagus* Miller, 1990 (conejo pigmeo), *Caprolagus* Blyth, 1845 (liebre hispida), *Lepus*, *Oryctolagus* y *Sylvilagus* (conejo cola de algodón). Este arreglo hecho por Dice (1929) y luego apoyado por Corbet (1983), no incluye una hipótesis filogenética, aunque señaló que las tres subfamilias “se presume, indican una serie filogenética independiente” (Dice 1929:340). Dawson (1981) basado en el trabajo original de Hibbard (1963), reafirmó a *Nesolagus* y *Brachylagus* como un grupo hermano y basal a tres linajes evolutivos, con *Romerolagus diazi* Ferrari-Pérez in Diaz, 1893 y el extinto †*Pratilepus* siendo identificados en un clado basal a todos los lepóridos existentes restantes. Los dos linajes restantes incluían por un lado a *Lepus*, *Oryctolagus*, *Caprolagus* y *Sylvilagus*, mientras que el linaje restante (hermano del anterior, ver Hibbard 1963:11) incluía *Pronolagus* y *Pentalagus*. En su estudio concluyó que son cuatro linajes discretos que no tienen resolución filogenética entre ellos y con datos morfológicos conflictivos hasta esa fecha. Dawson (1981) coincidió en gran medida con la hipótesis de relaciones propuesta por Hibbard (1963). Posteriormente, Corbet (1983) al examinar 23 caracteres morfológicos de todos los géneros existentes de lepóridos, organiza a *Pentalagus*, *Pronolagus* y añade a *Bunolagus* Thomas, 1929 (conejo ribereño de Sudáfrica) dentro de la subfamilia Palaeolaginae y separa a *Romerolagus* añadiéndolo a Leporinae con el resto de los géneros lepóridos.

Averianov (1999), llevó a cabo un análisis cladístico utilizando 29 caracteres morfológicos, un geográfico y un cariotípico, incluyendo todos los géneros lepóricos conocidos con el extinto †*Archaeolagus* como exogrupo, dando como resultado un árbol compuesto por un total de 13 clados que no indican el soporte en sus nodos, incluyendo taxones existentes y extintos dentro del nuevo suborden Neolagomorpha, el ancestro más reciente de *Lepus*, *Ochotona* y †*Palaeolagus*, así como de todos sus descendientes. Presenta también los nuevos órdenes Ochotonida, Leporida y las tribus Notolagini y Bunolagini; y finalmente relaciona a *Pronolagus* y *Bunolagus* como géneros hermanos de *Pentalagus*; *Caprolagus* hermano de *Poelagus* y *Oryctolagus* de *Lepus*.

En el año 1999, Halanych y Robinson analizaron secuencias del gen 12S y *Cytb* para reconstruir las relaciones evolutivas de once géneros lepóricos, de los cuales 8 son monotípicos. Con lo anterior, encontraron que las secuencias del gen *Cytb* carecían de valor filogenético debido a altas tasas de sustitución de nucleótidos en los sitios sinónimos; a partir de las secuencias del gen 12S, resolvieron que *Pronolagus* se localiza como género hermano del resto de los lepóricos y a partir de esta separación, el resto de los lepóricos se originan de manera casi instantánea durante una rápida radiación, basándose en la ausencia de sinapomorfías en los datos paleontológicos y citogenéticos.

Más tarde, en 2003, Stoner y colaboradores utilizaron un enfoque de superárbol (combinando árboles filogenéticos en lugar de datos primarios); analizaron el significado adaptativo de los patrones de coloración en los lagomorfos, utilizando información sobre la coloración y la ecología del comportamiento de las especies, así como descripciones y fotografías adicionales, obteniendo árboles con muy baja precisión, confirmando la incertidumbre histórica en la sistemática de los lagomorfos y revelando una falta general de consenso entre los estudios de origen; finalmente concluyen que es complicado interpretar las asociaciones entre coloración y variables ecológicas, especialmente en este contexto filogenético.

Para el año 2004, Matthee et al., realizaron una supermatriz molecular a partir de genes ya existentes de los once géneros de lepóricos; a pesar de que concluyen que no fue posible llegar a un resultado certero sobre la historia filogenética de los lagomorfos, sus análisis de dispersión-vicarianza sugiere que la distribución geográfica actual, derivó a partir de un origen asiático (teniendo como ancestro a *Nesolagus* que posteriormente irradiaría hacia África dando lugar a *Poelagus* y *Pronolagus*) o norteamericano (teniendo como

descendientes a *Romerolagus*, *Lepus* y *Sylvilagus*) seguido de al menos 9 dispersiones y 5 eventos de vicarianza entre estos dos a través del Estrecho de Bering. El reloj molecular que calibraron indicó que la mayoría de los intercambios continentales ocurrieron entre los 9 y 14 Ma.

El primer análisis molecular completo de los Leporidae fue realizado por Robinson y Matthee (2005), este estudio fue basado en datos de ADN nuclear (ADNn) y ADN mitocondrial (ADNmt): cinco intrones nucleares, *Cytb* y 12S ARNr, caracteres morfológicos, así como datos biogeográficos de supuestos centros de origen de cada género, lo que resultó en un análisis de 5,483 pares de bases. A partir de la Supermatriz de datos y utilizando a la especie *Tamiasciurus hudsonicus* Erxleben, 1777 (ardilla roja americana) como grupo externo, obtuvieron un filograma que identificó dos clados principales, primero separando al género *Ochotona* del resto que contenía en el primer grupo al conjunto afroasiático de *Poelagus*, *Pronolagus* y *Nesolagus* hermano de los lepóridos existentes restantes. Este segundo grupo, se dividió en dos subclados con *Romerolagus* como grupo basal de ambos: los dos subclados consistían en *Lepus* por un lado seguido por un clado compuesto por *Oryctolagus* y *Bunolagus* como grupos hermanos junto a *Caprolagus* y *Pentalagus* en un clado derivado que incluía a *Brachylagus* y *Sylvilagus* como taxones hermanos. Robinson y Matthee (2005) concluyeron también que, si bien *Romerolagus diazi* es parte de un linaje antiguo con un tiempo de divergencia de 12.8 Ma, no hay evidencia filogenética para apoyar la subfamilia Palaeolaginae tal como la define Dice (1929).

Cinco años después, Kriegs y col. (2010) realizaron el primer estudio genómico basado en “cambios genómicos raros informativos” (RGCs, por sus siglas en inglés), tales como retrotransposones o elementos intercalados cortos (SINEs) específicos de los lagomorfos. Ellos incluyeron los géneros *Ochotona*, *Pronolagus*, *Oryctolagus*, *Bunolagus*, *Sylvilagus* y *Lepus* (cuatro especies en este último). Con respecto a Leporidae, concluyeron que *Pronolagus* era el taxón basal y grupo hermano de los lepóridos restantes.

Posteriormente, Kraatz y Sherratt (2016) analizaron datos morfométricos utilizando herramientas tridimensionales y digitales teniendo como uno de sus objetivos, estimar la historia evolutiva de los lepóridos, sin embargo, no tuvieron éxito debido a una baja señal filogenética y altos niveles de homoplasia en los atributos morfométricos de los lepóridos, perspectiva a la

que Ge et al. (2013) también habían llegado basado en un conjunto de datos similar.

Finalmente, Silva et al. (2019) analizaron datos moleculares de lepóridos recientemente generados y publicados con anterioridad (Matthee et al. 2004) centrándose en las relaciones entre las especies de *Sylvilagus* y utilizando árboles bifurcados y redes divididas con el objetivo de identificar regiones filogenéticas con politomías. Los autores concluyeron que una rápida radiación de los lepóridos en general, y durante la diversificación inicial del género *Sylvilagus* en particular, fue responsable de la dificultad para dilucidar las claras relaciones filogenéticas subyacentes a la radiación basal de estos grupos. Silva et al. (2019) encontraron inconsistencias en las relaciones entre géneros a través de los análisis, pero mostraron que todos los lepóridos están incluidos en una politomía lepórida basal.

Uno de los grupos que más llama la atención por su salto dentro de las hipótesis filogenéticas de los lepóridos propuestas a través de los años, es el género monotípico *Romerolagus*. La especie *Romerolagus diazi*, mejor conocida como “zacatuche” o “teporingo” es endémico de México con una distribución restringida al bosque templado con zacatonales alpinos del Eje Neovolcánico Transversal (Cervantes et al. 1990; Velazquez 1994). Actualmente se encuentra catalogada en peligro crítico según los criterios de la UICN (Velazquez y Guerrero 2019) y las leyes mexicanas (NOM059-SEMARNAT 2010). Era considerado un lepórido antiguo por sus rasgos craneales y dentales (Dawson 1958), entre otras características morfológicas ancestrales (Cervantes et al. 1990; Velazquez et al. 1993; Velazquez y Larrazábal 2011) así como la relación que posee con algunos de sus huéspedes como *Anoplocephaloides romerolagi*, un cestodo parásito específico del teporingo (Kamiya et al. 1979). Estas particularidades lo relacionaban directamente con los géneros *Pronolagus* y *Pentalagus*, como miembro de la subfamilia Palaeolaginae (Dice, 1929); y desde entonces ha sufrido cambios en su posición en la filogenia de los lagomorfos, donde sus relaciones filogenéticas no han estado bien soportadas; más recientemente, se ha ubicado dentro del segundo grupo que divergió después de *Pronolagus* sin resolver su relación con otros lepóridos, como el caso de su parentesco con *Bunolagus*, debido a la baja disponibilidad de datos genómicos (Sparwel et al. 2019).

En resumen, la obtención de una filogenia robusta y resuelta ha sido un desafío para muchos grupos biológicos, particularmente para aquellos que se

diversificaron rápidamente (Whitfield y Lockhart 2007), como es el caso de los lepóridos, debido a fuentes de error como eventos de sustitución de nucleótidos (Halanych y Robinson 1999), convergencia en características anatómicas, ausencia de cromosomas, sinapomorfías, altos niveles de homoplasia en el ADNmt y los internodos cortos subyacentes a radiaciones explosivas en gran parte contemporáneas (Matthee et al. 2004; Ge et al. 2013, 2015; Kraatz y Sherratt 2016; Silva et al. 2019).

En la actualidad, los estudios filogenéticos que utilizan marcadores moleculares específicos han sido reemplazados por estudios genómicos utilizando una herramienta conocida como Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés), forjando nuevas áreas de estudio como la filogenómica (Eisen y Hanawalt 1999; Eisen y Fraser 2003). Los estudios filogenómicos, que utilizan grandes conjuntos de datos y representan una amplia muestra del genoma, permiten recuperar la señal evolutiva, tanto histórica como contemporánea de muchos grupos biológicos. Tal es el caso de los mamíferos, de quienes se han estudiado los tiempos de radiación evolutiva indicando que han sido cortos a través de la historia (McCormack et al. 2012; Meiklejohn et al. 2016; Payseur y Rieseberg 2016). Murphy y colaboradores (2004) mencionan que la filogenia y evolución de los mamíferos es ahora la fuerza impulsora detrás del análisis genómico comparativo moderno (O'Brien et al. 1999; Waterston et al. 2002; Gibbs et al. 2004); lo que permitirá dilucidar por un lado las relaciones entre procesos evolutivos y los patrones de divergencia, y por el otro las propiedades genómicas y sus procesos de diversificación (Seehausen et al. 2014).

En las últimas décadas, los estudios filogenéticos han evolucionado para utilizar secuencias genómicas más cortas, como la captura de regiones conservadas y métodos basados en enzimas de restricción que ayudan a resolver las relaciones evolutivas de los seres vivos. Tal es el caso de una clase de marcadores genómicos y ADN flanqueante llamados Elementos Ultraconservados (UCE, por sus siglas en inglés), referidos por primera vez en humanos, ratas y ratones por Bejerano et al. (2004). Los UCEs son regiones altamente conservadas del genoma compuestas por 200 pares de bases (pb) que funcionan como una especie de marcador o “primer” en regiones codificantes entre organismos ampliamente divergentes; a su vez, la región adyacente o región flanqueante al “core” del UCE (a la región conservada), presenta una variabilidad que va aumentando a medida que la

distancia del “core” conservado también aumenta (Stephen et al. 2008; Faircloth et al. 2012; McCormack et al. 2012, 2013). A pesar de la falta de conocimiento sobre la función biológica real de los UCEs (Ahituv et al. 2007), se cree que estos marcadores contribuyen a la regulación y el desarrollo (Sandelin et al. 2004; Derti et al. 2006). No obstante, los UCEs se consideran una herramienta ideal por su variación entre la región flanqueante y el core conservado, lo que facilita la identificación de loci ortólogos a diversos niveles de divergencias, incluyendo aquellas que son profundas o antiguas ya que se encuentran en partes del genoma prácticamente libres de transposones y con baja saturación (Simons et al. 2006; Whitfield y Lockhart 2007; McCormack et al. 2012).

Una de las ventajas de la técnica de Captura de Secuencias por la cual los UCEs son secuenciados, es que esta permite recuperar, si bien no todo el ADN mitocondrial, una gran parte de este, que de igual forma puede ser utilizado para inferir procesos históricos de especiación. Los UCEs son una herramienta que permite el desarrollo de proyectos filogenómicos de manera más eficiente, reduciendo la cantidad de datos necesarios para la secuenciación, ensamblaje y alineación de múltiples genomas completos (Faircloth et al. 2015); son una herramienta valiosa para reconstruir la historia evolutiva y se han utilizado con una frecuencia cada vez mayor para desentrañar las relaciones filogenéticas de grupos que antes se consideraban desafiantes no solo por su complejidad sino por el difícil acceso a especímenes por lo que se debe recurrir a muestras de museos de las que es complicado obtener altas concentraciones de ADN de buena calidad (Faircloth et al. 2012; McCormack et al. 2013, 2016; Blair et al. 2019).

El objetivo de esta investigación fue inferir una relación filogenética sólida entre los lepóridos, prestando particular atención a la posición de *Romerolagus diazi* debido a su dificultad para ubicarse en el árbol evolutivo de los lagomorfos. Se sometió a prueba el uso de los Elementos Ultraconservados como la mejor y más innovadora herramienta molecular para despejar las disputas en las filogenias de lepóridos existentes.

Journal of Mammalian Evolution

A new hypothesis on the phylogenetic relationships among the leporids using ultraconserved elements as pathway for revealing Romerolagus position

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JOMM-D-21-00003	
Full Title:	A new hypothesis on the phylogenetic relationships among the leporids using ultraconserved elements as pathway for revealing Romerolagus position	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	Lagomorpha; Leporidae; UCEs; phylogeny; phylogenomics; Romerolagus.	
Corresponding Author:	Alejandro Velazquez, Ph.D. Universidad Nacional Autónoma de México: Universidad Nacional Autónoma de México Morelia, Michoacán MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional Autónoma de México: Universidad Nacional Autónoma de México	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Estefania Cano-Sánchez	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Estefania Cano-Sánchez	
	Flor Rodríguez-Gómez, Dr.	
	Ken Oyama, Professor	
	Livia León-Paniagua, Professor	
	Alicia Mastretta-Yanes, Dr.	
	Alejandro Velazquez, Professor	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	CONACYT (Scholarship)	M.Sc Estefania Cano-Sánchez
	Universidad Nacional Autónoma de México (Research grant)	M.Sc Estefania Cano-Sánchez
Abstract:	<p>Lagomorpha is an order of mammals with a worldwide distribution, includes 12 genera and 92 species separated into two families, Ochotonidae (pikas) and Leporidae (rabbits and hares). Molecular and morphological attempts have been pursuit to solve the phylogeny of lagomorphs; yet outcomes are still contested. The aim of this research was to establish a robust phylogeny. We focus on the position of the Endangered "volcano rabbit" <i>Romerolagus diazi</i>, due to its difficulty of being placed in the evolutionary tree. We obtained samples corresponded from at least one species of the 12 genera that comprise the order. Ultraconserved elements (UCEs) were captured and sequenced. Maximum-likelihood phylogeny was performed with a total of 4,195 loci captured and 59,112 informative sites. The phylogeny recovered and supported the relationships between Ochotonidae and Leporidae, separating the two clades. <i>Pronolagus rupestris</i> and <i>Nesolagus timminsi</i> were retrieved as the first-diverging leporid group. Four specimens from <i>R. diazi</i> were retrieved and appears as sister to the rest of the Leporidae and generally matched with previously declared phylogenies. We first observed separation of a clade that merged <i>Caprolagus sinensis flaviventris</i> and <i>Lepus flavigularis</i>, which has not previously been proposed with a 100% bootstrap support. The results proved successful to unravel a robust phylogeny</p>	

	with high support values in every clade of the order Lagomorpha, which allowed clarifying previously undefined phylogenetic relationships. We further conclude that the method we used may serve to complete the entire phylogeny of mammals by using already existing specimens from museums.
--	--

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

15 of January 2021

Prof. John R. Wible
Chief editor of Journal of Mammalian Evolution

We hereby submit the manuscript entitled “A new hypothesis on the phylogenetic relationships among the leporids using ultraconserved elements as pathway for revealing *Romerolagus* position”

This manuscript focus in establishing a robust phylogenetic relationship among leporids using ultraconserved elements (UCEs) as a novel technique for the first time used among leporids. We focus on the position of the endangered “volcano rabbit” *Romerolagus diazi*, due to its difficulty of being placed in the evolutionary tree of lagomorphs. A critical outcome concerns the use collections from museums around the world to complete the entire species phylogeny of Lagomorpha.

We warrant that this manuscript is the original work of the authors listed, and has neither previously been published, nor submitted to any other journal at this time. This manuscript derives from the three years of ongoing research conducted at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, for its acronym in Spanish). The authors included made substantial contributions to the manuscript and qualify for authorship, and no authors have been omitted.

Furthermore, the authors made explicit acknowledgements to institutions, colleagues and English reviewers involved in the compilation of the version here submitted. Likewise, the authors declare that we are the creators of the figures and tables showed in the document.

Dr. Alejandro Velazquez
Full time professor
On behalf of all authors

A new hypothesis on the phylogenetic relationships among the leporids using ultraconserved elements as pathway for revealing *Romerolagus* position.

AUTHOR NAMES:

Estefania Cano-Sánchez¹, Flor Rodríguez-Gómez², Ken Oyama³, Livia León-Paniagua⁴, Alicia Mastretta-Yanes⁵, Alejandro Velazquez⁶

AUTHORS AFFILIATIONS:

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, Ciudad de México, México.

² Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán No. 1421, esq. Calzada Olímpica, Z. C. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

³ Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, UNAM. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, Z. C. 58190, Morelia, Michoacán, México.

⁴ Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, UNAM, C. U., Coyoacán, Z. C. 04510, Ciudad de México, México.

⁵ Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Liga Periférico-Insurgentes Sur No. 4903, Parques del Pedregal, Z. C. 14010, Tlalpan, Ciudad de México, Mexico

⁶ Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental, UNAM. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, Z. C. 58190, Morelia, Michoacán, México.

CORRESPONDING AUTHOR

Alejandro Velazquez ⁶, alex@ciga.unam.mx

ORCID

Estefania Cano-Sánchez: <https://orcid.org/0000-0003-1419-3547>

Flor Rodríguez-Gómez: <https://orcid.org/0000-0001-8613-3418>

Ken Oyama: <https://orcid.org/0000-0002-0367-1964>

Livia León-Paniagua: <https://orcid.org/0000-0002-1748-0915>

Alicia Mastretta-Yanes: <https://orcid.org/0000-0003-2951-6353>

Alejandro Velazquez: <https://orcid.org/0000-0002-6353-2894>

DECLARATIONS

The authors declare that the present contribution has not been published nor submitted to another journal. It is a research outcome derived from the work of the authors and institutional permissions granted and ethical standards compliance attended. We further declare that there are not conflict of interest.

CONFLICTS OF INTEREST/COMPETING INTERESTS

“Not applicable”

ETHICS APPROVAL (INCLUDE APPROPRIATE APPROVALS OR WAIVERS)

“Not applicable”

CONSENT TO PARTICIPATE (INCLUDE APPROPRIATE STATEMENTS)

“Not applicable”

CONSENT FOR PUBLICATION (INCLUDE APPROPRIATE STATEMENTS)

“Not applicable”

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL (DATA TRANSPARENCY)

“Not applicable”

CODE AVAILABILITY (SOFTWARE APPLICATION OR CUSTOM CODE)

“Not applicable”

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Estefania Cano-Sánchez: Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing-Original Draft, Visualization **Flor Rodríguez-Gómez:** Software, Validation, Formal analysis, Writing-Review & Editing, Visualization, Supervision **Ken Oyama:** Conceptualization, Writing-Review & Editing, Funding acquisition **Livia León-Paniagua:** Conceptualization, Resources, Writing-Review & Editing, Supervision **Alicia Mastretta-Yanes:** Conceptualization Writing-Review & Editing **Alejandro Velazquez:** Conceptualization, Writing-Review & Editing, Supervision, Project administration

ABSTRACT

Lagomorpha is an order of mammals with a worldwide distribution, includes 12 genera and 108 species separated into two living families, Ochotonidae (pikas) and Leporidae (rabbits and hares). Numerous molecular and morphological attempts have been pursued to solve the phylogeny of lagomorphs; yet outcomes are still contested. The aim of this research was to establish a robust phylogeny of leporids. We focus on the position of the Endangered *Romerolagus diazi*, due to its difficulty of being placed in the evolutionary tree. We obtained samples corresponded from at least one species of the 12 genera that comprise the order Lagomorpha, from museums and institutions in Mexico and the United States. Ultraconserved elements (UCEs) were captured and sequenced. Maximum-likelihood phylogeny was performed with a total of 4,195 loci captured and 59,112 informative sites. The phylogeny recovered and supported the relationships between Ochotonidae and Leporidae, separating the two clades. *Pronolagus rupestris* and *Nesolagus timminsi* were retrieved as the first-diverging leporid group. Four specimens from *R. diazi* were retrieved and appears as sister to the rest of the Leporidae and generally matched with previously declared phylogenies. The results proved successful to unravel a robust phylogeny with high support values in every clade of the order Lagomorpha, which allowed clarifying previously undefined phylogenetic relationships. This information allows us to continue utilizing collections from museums around the world to complete the entire species phylogeny.

KEYWORDS

Lagomorpha; Leporidae; UCEs; phylogeny; phylogenomics

INTRODUCTION

Lagomorpha is an order of small- and medium-size herbivorous mammals with a worldwide distribution inhabiting almost all biomes. This order includes 108 species separated into two living families: Ochotonidae, represented solely by the genus *Ochotona* (pikas, 34 species), and Leporidae (rabbits and hares), comprising 11 genera and 74 species (Burgin et al. 2018; Ruedas et al. 2018). Numerous attempts have been made to resolve the phylogeny of leporids, without achieving full consensus (Hackländer et al. 2008). The problem resides in the extremely conservative nature of morphological variation in leporids (Ge et al. 2015), coupled with an explosive and largely simultaneous radiation of the major extant lineages (Flynn et al. 2014). As an example, different molecular and morphological data sets remain contradictory between and among each other: the only constant among data sets is the position of the African red rock hare, *Pronolagus rupestris* A. Smith, 1834 as the basal leporid taxon in molecular studies (Halanych and Robinson 1999; Yamada et al. 2002; Kriegs et al. 2010; Sparwel et al. 2019), although it is at times located as the sister taxon of the amami rabbit, *Pentalagus furnessi* Stone, 1900 (e.g., Stoner et al. 2003); the Bunyoro rabbit, *Poelagus marjorita* St. Leger, 1932 (e.g., Matthee et al. 2004; Robinson and Matthee 2005) or the striped rabbits, genus *Nesolagus* Forsyth-Major, 1899 (e.g., Ge et al. 2013).

The fossil record, among other evidence, suggests Asia as the center of origin of Lagomorpha, approximately 45 million years ago (Ma), corresponding to the early Eocene period (Dawson 1958, 1981; Averianov 2001; Rose et al. 2008; Ge et al. 2013), although data as to the validity of assigning some of the older fossils to Leporidae have been raised (Ruedas et al. 2018). Su and Nei (1999) estimated the radiation of modern day leporids to have taken place approximately 12 to 16 Ma, considering the late Miocene as the critical moment when this subfamily evolved (Ge et al. 2015), with the appearance of the extinct leporine *Alilepus* (Dawson 1981, 1958) mainly through rapid radiations (Halanych and Robinson 1999; Robinson and Matthee 2005; Flynn et al. 2014; Silva et al. 2019).

Hypotheses of evolutionary relationships among lagomorphs, and more specifically leporids, have been proposed and modified over the years. Dice (1929) proposed one of the first taxonomies, based on the enamel pattern of the first lower premolar (P_3), dividing the family Leporidae into three subfamilies: Palaeolaginae, which includes the extant *Romerolagus* (volcano rabbit), *Pronolagus*, and *Pentalagus*, along with the extinct †*Allolagus* and †*Palaeolagus*; Archaeolaginae, composed of two extinct genera; and Leporinae, including the extant *Brachylagus* (pygmy rabbit), *Caprolagus* (hispid hare), *Lepus* (hares and jackrabbits), *Oryctolagus* (European rabbit) and *Sylvilagus* (cottontails). The arrangement of Dice (1929) not include any

hypotheses of phylogeny, although he indicated that the three subfamilies were “presumed to indicate an independent phylogenetic series” (Dice 1929:340). Based on a paleontological review (fossil record), Dawson (1981) identified *Nesolagus* and *Brachylagus* as sister taxa basal to three evolutionary lineages, with *Romerolagus diazi* and the extinct †*Pratilepus* being identified in a clade basal to all extant leporids bar *Nesolagus* and *Brachylagus*. The remaining two lineages included on the one hand *Lepus*, *Oryctolagus*, *Caprolagus*, and *Sylvilagus*, while the remaining lineage (sister to the prior, see Hibbard 1963:11) included *Pronolagus* and *Pentalagus*. Dawson (1981) largely concurred with the Hibbard’s hypothesis of relationships. In contrast, Averianov (1999), carried out a phylogenetic analysis using 31 characteristic including all known leporid genera with †*Archaeolagus* as the outgroup, resulting in a tree with both extant and extinct taxa.

The first comprehensive molecular analysis was undertaken by Robinson and Matthee (2005). This was based on sequence data from five nuclear introns, and cytochrome *b* and 12S rRNA, resulting in an analysis based on 5,483 base pairs. Their resulting phylogeny identified two major clades: *Poelagus*, *Pronolagus*, and *Nesolagus*, were included in an Afro-Asian clade sister to remaining extant leporids. That clade was divided into two subclades with *Romerolagus* basal to both. The two subclades were *Lepus* on the one hand and another with *Bunolagus*, *Oryctolagus*, *Caprolagus*, and *Pentalagus*, sister to *Brachylagus* and *Sylvilagus*. Robinson and Matthee (2005) also concluded that

although *Romerolagus diazi* is part of an ancient lineage, there is no phylogenetic evidence to support the subfamily Palaeolaginae as defined by Dice (1929), i.e., †*Palaeolagus*, †*Allolagus*, *Pentalagus*, *Pronolagus*, and *Romerolagus*.

Kriegs et al. (2010) carried out the first genomic study based on informative rare genomic changes (RGCs), in this instance retrotransposons, including only nine species in *Ochotona*, *Pronolagus*, *Oryctolagus*, *Bunolagus*, *Sylvilagus* and *Lepus* (four species in the latter). With respect to Leporidae, they concluded that *Pronolagus* was the basal taxon to remaining leporids. Later, Kraatz and Sherratt (2016) analyzed morphometric data using three-dimensional and digital tools with the aim, among others, of estimating the evolutionary history of leporids, but they had no success due to a low phylogenetic signal and high levels of homoplasy.

Silva et al. (2019) analyzed newly generated as well as previously published molecular data from leporids (Matthee et al. 2004) focusing on the relationships among *Sylvilagus* species, and using bifurcating trees and split networks with the aim at identifying phylogenetic regions with polytomies. Those authors concluding that a rapid radiation of leporids in general and during the initial diversification of the genus *Sylvilagus* in particular was responsible for the difficulty in elucidating clear phylogenetic relationships underlying the basal radiation of these groups. They found inconsistencies on the relationships among genera across analyses but showed that all leporids are included in a basal leporid polytomy. In short, obtaining a robust and

resolved phylogeny has been challenging for many biological groups, most particularly those that rapidly diversified as have leporids, due to error sources such as substitution events (Halanych and Robinson 1999), convergence in anatomical characteristics, absence of chromosomal synapomorphies, high levels of homoplasy in mtDNA, and the short internodes underlying explosive largely contemporaneous radiations (Matthee et al. 2004; Ge et al. 2013, 2015; Kraatz and Sherratt 2016; Silva et al. 2019).

These drawbacks are encountered particularly in the monotypic taxon *Romerolagus diazi*. This species is considered a panchronic leporid due to its cranial and dental features (Dawson 1958), among other ancestral morphological features (Cervantes et al. 1990; Velazquez et al. 1993; Velazquez and Larrazábal 2011), including its relationship with *Anoplocephaloides romerolagi*, a parasitic cestode exclusive to *R. diazi* (Kamiya et al. 1979). *Romerolagus* is endangered, pursuant to Mexican law NORM-059 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010) and the IUCN Red List of Threatened Species (Velazquez and Guerrero 2019).

Phylogenetic studies using specific molecular markers have been replaced by genomic studies known as next generation sequencing (NGS), forging a new area of study: phylogenomics (Eisen and Hanawalt 1999; Eisen and Fraser 2003). Phylogenomic studies, which use data sets that represent a large sample of the genome, allow recovery of evolutionary signals, both historical and contemporary, from selected biological groups.

Although phylogenetic studies have historically conducted using complete gene sequences, whether of single or multiple genes, in the last decade, these studies have evolved to use shorter genome sequences, such as target capture of conserved regions and methods based on enzyme restriction sites and other sequences, helping to resolve evolutionary relationships. A novel class of genomic marker and flanking DNA thereof called ultraconserved elements (UCEs) recently has been developed for phylogenetic studies. First used in a study including humans, rats, and mice, by Bejerano et al. (2004), UCEs are conserved probes of 200 base pairs (bp) that work as a kind of primer in coding regions among widely divergent organisms, presenting increasing variability as one moves from the center of the core UCE region toward the flanking sequence (Stephen et al. 2008; Faircloth et al. 2012; McCormack et al. 2012, 2013). Despite the lack of knowledge concerning their real biological function (Ahituv et al. 2007), these markers are thought to contribute to regulation and development (Sandelin et al. 2004; Derti et al. 2006). UCEs are considered an ideal tool that facilitates the identification of orthologous loci, including those involved in deeply divergent organisms, because they are found in parts of the genome that are practically free of transposons and at low saturation levels (Simons et al. 2006; McCormack et al. 2012). The variation among the flanking core provides sequence variability, allowing UCEs to be implemented as markers for inferring genetic trees in ancient evolutionary divergences among taxa

(Whitfield and Lockhart 2007; Faircloth et al. 2012; Blair et al. 2019). UCEs are a tool that allows development of phylogenomic projects more efficiently, reducing the amount of data required for sequencing, assembly, and alignment of multiple whole genomes (Faircloth et al. 2015). UCEs are a valuable tool for reconstructing evolutionary history and have been used with increasing frequency to unravel phylogenetic relationships that previously were considered intractable, including the use of museum specimens as research subjects (Faircloth et al. 2012; McCormack et al. 2013, 2016; Blair et al. 2019).

The aim of the present research was to establish a robust phylogenetic relationship among leporids. We focus on the position of *Romerolagus diazi* because of the difficulty of accurately localizing it within the evolutionary tree of lagomorphs.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Leporid context and relevance

Working with leporid phylogeny represents a challenge, mostly caused by the difficulty in obtaining representative samples from all taxa. Although most lagomorphs are widely distributed around the world, some endemic groups are restricted to remote areas, while others are at some degree of conservation risk; all or some species of *Pronolagus*, *Bunolagus*, *Romerolagus*, *Nesolagus*, *Pentalagus*, *Caprolagus*, *Sylvilagus*, and *Lepus*, are on the IUCN red list

of threatened species (Ge et al. 2013; Verde Arregoitia et al. 2015). These restrictions led us to turn our attention to museum specimens, which have gained importance over the years with the development of next-generation sequencing technologies (McDonough et al. 2018). We searched for representative specimens of each genus of leporid available in North American collections using the VertNet network (Table 1). With respect to *Romerolagus diazi*, the Chapultepec Zoo donated specimen organ samples from their captive population, and the Museo de Zoología Alfonso L. Herrera donated a sample from the collection.

1.2. *Sampling and DNA extraction*

We obtained representative samples from the 12 genera that comprise the order Lagomorpha and one from *Neotomodon alstoni* (Mexican Volcano Mouse) to be used as outgroup (Table 1). Because of the issues involved in collecting fresh specimens from around the world, most samples corresponded to specimens deposited in collections from museums and institutions in Mexico and the United States. Lab work was carried out in the Department of Evolutionary Biology of the Faculty of Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico City) and the Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution at the Field Museum of Natural History (Chicago).

Extraction of ethanol-preserved samples from *Neotomodon*, *Ochotona*, *Lepus*, *Sylvilagus*, *Oryctolagus*, *Romerolagus*, *Poelagus*, *Pronolagus*, and *Brachylagus*, was carried out using the DNeasy Blood and Tissue extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, United States) following the manufacturer's protocol. Due to risk of contamination of the ancient samples, all extractions were performed in a UV-sterilized hood with high sterilization standards; dry skin samples first were rinsed to remove any external contamination (Giarla et al. 2010; Campos and Gilbert 2019). The DNA extraction from ancient and museum specimens was carried out using two different protocols, one based on the standard phenol-chloroform extraction protocol (McDonough et al. 2018), the other following the AMNH Ornithology DNA extraction protocol, a modified version of the DNeasy Blood and Tissue Kit that uses spin columns from the QIA quick PCR purification kit. Extractions from recent specimens were visualized on 1% agarose gels to assess quality; this was not undertaken on ancient samples so as not to compromise the potentially limited amount of DNA available. We quantified all extractions using a Qubit® 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) with the dsDNA high sensitivity kit. The sample of *Caprolagus hispidus* based on osteocrusts was discarded from the study due to low DNA quality.

1.3. *Capture sequencing.*

Aliquots of DNA were shipped to RAPiD Genomics (Gainesville, FL, USA) for target-capture and next-generation sequencing for UCEs. First, samples were fragmented and used to produce Illumina-platform ready libraries using the RAPiD Genomics high-throughput workflow with proprietary chemistry (Illumina Inc., San Diego, California, USA). The enrichment of 5060 UCE loci (Faircloth et al. 2012) was carried out using a set of custom-designed probes (MYbaits_Tetrapods-UCE-5K kit; Mycroarray) following an open-source protocol (see www.ultraconserved.org). Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 3,000 (150 pair-end). Data from sequencing was trimmed and demultiplexed using an Illumina bcl2fastq2 v. 2.18.0.12 (Illumina 2018).

1.4. *Bioinformatics analysis*

FASTQ files obtained by RAPiD Genomics were downloaded via Globus© (2010-2020 University of Chicago, Argonne National Laboratory). For bioinformatics analysis of captured UCE data, we used the PHYLUCE software package, protocols and pipelines (Faircloth et al. 2012; Faircloth 2016). Data were cleaned and trimmed from adapter contamination and low quality bases via Illumiprocessor (Faircloth 2013) and Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Once the reads were clean, assembly of read data into contigs was undertaken using Velvet (Zerbino and Birney 2008) with the PHYLUCE

script *phyluce_assembly_velvet*, using a value $kmer = 35$. With the fastq data assembled, we identified contigs that were UCE orthologous loci and removed non-UCE loci or potential paralogs matching the assembled contigs to the probes that were used to enrich UCE loci using the PHYLUCÉ script *phyluce_assembly_match_contigs_to_probes*. Using this output and the PHYLUCÉ script *phyluce_assembly_get_match_counts*, we created a data matrix configuration file to denote taxa we included in the analysis and UCE loci included with the taxon set (determined by the software). We also used the flag “*incomplete matrix*” to extract incomplete data sets where data may have been missing for a certain taxon or at certain loci. The output was a dataset in a monolithic FASTA file, including only loci enriched with a percentage of missing data that was above a user-specified threshold. Next, we extracted FASTA sequences from each assembly and aligned our data across all loci using MAFFT v7.13 (Kato and Standley 2013) with the PHYLUCÉ script *phyluce_align_seqcap_align*. We also used summary statistics to generate alignment statistics by running the PHYLUCÉ script *phyluce_align_get_align_summary_data* and computed the number of informative sites using the PHYLUCÉ script *phyluce_align_get_informative_sites*. Next, we selected the subset of alignments (only matrices with informative sites) that contained data from 70% of individuals using the PHYLUCÉ script *phyluce_align_get_only_loci_with_min_taxa*. We then added lines of missing data to the incomplete matrices to ensure taxon completeness using PHYLUCÉ

script *phyluce_align_add_missing_data_designators*, then converted the alignment data into PHYLIP-format for phylogenetic analysis using RAxML.

1.5. *Phylogeny from concatenated data*

With the concatenated PHYLIP matrix including the outgroup (*Neotomodon alstoni*), we reconstructed the best phylogenetic hypothesis from our data using RAxML v8.0.19 (Stamatakis, 2014). The GTRGAMMA model of evolution was used by searching for the best-scoring maximum-likelihood (ML) tree, performing 1,000 bootstrap searches and reconciling the best ML tree with the bootstrap replicates, all using features of RAxML through PHYLUCE.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 *Sequence data and UCE phylogeny*

We obtained between 355,035 and 3,360,490 reads in every sample of raw data from sequencing. After cleaning and trimming, the number of reads was between 336,674 and 3,235,801 (Table 2). We observed a difference with respect to the levels of reads among specimens due to the type of sample; the two lowest values corresponded to *Pentalagus furnessi* (sample from 1932) and *Nesolagus timminsi*, both of which was obtained from small pieces of osteocrusts. Following sequence alignment using Velvet, we generated a 70% incomplete matrix from 18 specimens and one outgroup (*N. timminsi*) with 4,195 from the 4,524 loci captured. The mean alignment length was 897 bp

(95 CI: 6.91 bp) with an informative sites mean of 14.09 (95% CI: 0.56). The concatenated matrix had a total of 19,733,228 nucleotides and 59,112 informative sites (Table 3).

We reconstructed a well-supported maximum-likelihood (ML) tree from the incomplete matrix of concatenated UCE data using the informative sites. The phylogeny (Fig. 1) recovered strongly supported relationships among all lagomorphs examined. The ML tree is composed by 16 nodes, all with bootstrap support above 96%. Clade A retrieved *Pronolagus rupestris* and *Nesolagus timminsi* as sister taxa in the basal leporid clade, sister to remaining Leporidae, Clade B, with 100 % bootstrap support. This first clade is similar to the topology recovered by Sparwel et al. (2019) based on retrotransposons and studies based on molecular sequence data (e.g., Matthee and Robinson 2004, Robinson et al. 2005) identifying *Pronolagus* as a basal leporid taxon. The next lineage to diverge is monophyletic Clade C, composed exclusively of *R. diazi*; the 100% bootstrap support for this clade is comparable to that suggested by numerous phylogenetic lagomorph studies (Dawson 1981; Halanych and Robinson 1999; Hibbard 1963; Robinson and Matthee 2005; Sparwel et al. 2019). We also observed definitive separation of specimen C4 from the remaining specimens (C1, C2 and C3) of *R. diazi*, indicating that there exist differences between captive and wild populations at the genomic level, something that only has been studied genetically using RAPD analysis

(Random Amplified Polymorphic DNA; Soto et al. (2005). Clade C, *Romerolagus*, is sister to Clade D, which contains remaining Leporidae, with a topology generally congruent with previously published phylogenies, including the relationship among *Lepus*, *Oryctolagus*, *Caprolagus*, and *Sylvilagus*, proposed by Dawson (1981). The next clade to diverge is Clade (E), where we obtained a sister relationship between *Caprolagus* and *Lepus*, a relationship that has not previously been proposed. Clade E is in turn sister to Clade F with a 100% bootstrap support. Clade F includes Subclades H and G. Subclade G is congruent with most studies in locating *Brachylagus* as sister genus of *Sylvilagus* (e.g., Averianov 1999; Halanych and Robinson 1999; Robinson and Matthee 2005). Remarkably, however, although we recovered *Brachylagus* as sister taxon to *Sylvilagus* (in this instance, *S. cunicularius*), *Sylvilagus* was recovered as paraphyletic because the eastern cottontail, *S. floridanus*, was obtained as sister to the {*Brachylagus* + *S. cunicularius*} clade. This topology intimates a close relationship between *Brachylagus* and *Sylvilagus*. Although we recovered this topology with 100% bootstrap support, it is possible that additional data may cast doubt on the topology we recovered here. Alternatively, it is possible that *Brachylagus* is in fact a species within *Sylvilagus* as proposed by Hall (1951, 1981).

Subclade G is a sister to Subclade H, which includes *Pentalagus* and *Poelagus* forming a monophyletic group (100% bootstrap, Group I). Morphological and paleontological characters do not support this

relationship. Further genomic studies may help to unravel the present outcome here reported. Group I is here regarded as sister of Clade J, which retrieved with *Oryctolagus* and *Bunolagus* as sister taxa, with 66% bootstrap support. This relationship supports the hypothesis of Robinson and Matthee (2005) based on a supertree approach that also obtained *Oryctolagus* and *Bunolagus* as sister taxa.

3. CONCLUSIONS

We successful to untangled the tangled web that had to this point been lagomorph phylogenetic systematics. We obtained a robust phylogeny of the Lagomorpha, including at least one species of each genus, which allowed us to illuminate previously undefined phylogenetic relationships. Furthermore, this outcome resulted from the use of dried or old museum specimen samples and target enrichment of UCEs with flanking DNA to obtain a phylogeny with high support, thereby representing a novel source of information. This information allows us to continue the use of collections from museums around the world to complete the entire species phylogeny of Lagomorpha.

The results on *Romerolagus diazi* support previous research that position this species as the second clade split just after *Pronolagus* genus. Emerging evidence derived from the present publication points towards genomic differences between captive and wild populations of *Romerolagus*. Because the origin of the captive populations is not known, additional comparative

genomic and biogeographic studies undertaken among the discontinuously dispersed wild populations, such as that of Osuna et al. (2020), may shed light on the metapopulation dynamics of this endangered species.

ACKNOWLEDGEMENTS

Especially, we would like to thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas” from the “Universidad Nacional Autónoma de México (Programa 134, Entidad 97, Plan 4085, Orientación 4)”. This work constitutes partial fulfilment to obtain the grade of Masters in Biological Sciences.

We also thank Dr. Consuelo Lorenzo Monterrubio and the staff of the Mammal Collection from ECOSUR for the donation of *Lepus flavigularis* samples; The “Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre”, “Dirección de Operación Científica y Técnica” and “Chapultepec Zoo” for the donation of samples of *Romerolagus diazi*; The Zoology Museum “Alfonso L. Herrera” from the Faculty of Sciences - UNAM (MZFC-M) for the donation of samples from *R. diazi*, *Sylvilagus floridanus*, *Sylvilagus cunicularius* and *Neotomodon alstoni*; The Surgery Office from the School of Medicine – UNAM for the donation of two death specimens of *Oryctolagus cuniculus*; the Museum of Comparative Zoology (MCZ-CRYO, Mammalogy) from Harvard University for *Bunolagus monticularis* and *Caprolagus sinensis flaviventris* samples; the Mammal Division of the University of Michigan Museum of Zoology for the donation of *Pentalagus furnessi* sample; the Mammal Collection from the University of New Mexico – Museum of Southwestern Biology, for the donation of the *Brachylagus idahoensis* sample; the Department of Mammalogy from the American Museum of Natural History for the donation of the *Nesolagus timminsi* sample; the Division of Mammals at The Field

Museum of Natural History for the donation of samples of *Ochotona princeps lasalensis*, *Caprolagus hispidus* and specially *Pronolagus rupestris nyikae* and *Poelagus marjorita* specimens collected in Africa by Julian C. Kerbis. Special thanks to Adam W. Ferguson and Kevin Feldheim for their support in the process of collecting samples and lab work at the Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution.

FUNDING

The first author was granted a scholarship from CONACYT as part of her Master studies. The “Secretaría de Desarrollo Institucional” from the “Universidad Nacional Autónoma de México” provided financial support to make possible different activities of the project. The “Posgrado en Ciencias Biológicas”, throughout the PAEP program provided additional financial support.

REFERENCES

- Ahituv N, Zhu Y, Visel A, Holt A, Afzal V, Pennacchio LA, Rubin EM (2007) Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PLoS Biol* 5(9):e234. doi: 10.1371/journal.pbio.0050234
- Averianov AO (1999) Phylogeny and classification of Leporidae (Mammalia, Lagomorpha). *Vestn. Zool* 33(1-2):41-48.
- Averianov AO (2001) Lagomorphs (Mammalia) from the Pleistocene of Eurasia. *Paleontol. Zhurnal* 2:84-92.
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304(5675):1321-1325. doi: 10.1126/science.1098119
- Blair C, Bryson RW, Linkem CW, Lazcano D, Klicka J, McCormack JE (2019) Cryptic diversity in the Mexican highlands: Thousands of UCE loci help illuminate phylogenetic relationships, species limits and divergence times of montane rattlesnakes (Viperidae: *Crotalus*). *Molecular Ecology Resources* 19(2):349-365. doi: 10.1111/1755-0998.12970
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-2129. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Campos PF, Gilbert MTP (2019) DNA extraction from keratin and chitin. In: Shapiro B, Barlow A, Heintzman P, Hofreiter M, Paijmans J, Soares A (eds) *Ancient DNA. Methods in Molecular Biology*, vol.1963, Humana Press, New York, pp 43-49. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_7
- Cervantes FA, Lorenzo C, Hoffmann RS (1990) *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species* 360:1-7. doi:10.2307/3504131
- Dawson MR (1958) Later Tertiary Leporidae of North America. University of Kansas Paleontological Contributions, *Vertebrata* 6:1-75.
- Dawson MR (1981) Evolution of the modern lagomorphs. In: Myers K, MacInnes CD (eds) *Proceedings of the World Lagomorph Conference*, Guelph, Ontario, pp. 1-8.
- Derti A, Roth FP, Church GM, Wu CT (2006) Mammalian ultraconserved elements are strongly depleted among segmental duplications and copy number variants. *Nature Genetics* 38:1216-1220. doi: 10.1038/ng1888
- Dice LR (1929) The Phylogeny of the Leporidae, with Description of a New Genus. *Journal of Mammalogy* 10(4):340-344. doi: 10.2307/1374124
- Eisen JA, Hanawalt PC (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutation Research/DNA Repair* 435(3):171-213. doi: 10.1016/S0921-

8777(99)00050-6

Eisen JA, Fraser CM (2003) Phylogenomics: Intersection of evolution and genomics. *Science* 300(5626):1706-1707. doi: 10.1126/science.1086292

Faircloth BC, McCormack JE, Crawford NG, Harvey MG, Brumfield RT, Glenn TC (2012) Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61(5):717-726. doi: 10.1093/sysbio/sys004

Faircloth BC (2013) Illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. <https://doi.org/10.6079/J9ILL>

Faircloth BC, Branstetter MG, White ND, Brady SG (2015) Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among hymenoptera. *Molecular Ecology Resources* 15:489-501. doi: 10.1111/1755-0998.12328

Faircloth BC (2016) PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. *Bioinformatics* 32(5):786-788. doi: 10.1093/bioinformatics/btv646.

Ge D, Wen Z, Xia L, Zhang Z, Erbajeva M, Huang C, Yang Q (2013) Evolutionary History of Lagomorphs in Response to Global Environmental Change. *PLoS One* 8(4):e59668. doi: 10.1371/journal.pone.0059668

Ge D, Xia L, Yao L, Zhang Z, Yang Q (2015) Geometric morphometric analysis of skull morphology reveals loss of phylogenetic signal at the generic level in extant lagomorphs (Mammalia: Lagomorpha). *Contributions to Zoology* 84(4):267-284. doi: 10.1163/18759866-08404001

Giarla TC, Voss RS, Jansa SA (2010) Species limits and phylogenetic relationships in the didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 346:1-67. doi: 10.1206/716.1

Hackländer K, Ferrand N, Alves PC (2008) Overview of Lagomorph Research: What we have learned and what we still need to do. In: Alves PC, Ferrand N, Hackländer K (eds) *Lagomorph Biology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 381-391. doi: 10.1007/978-3-540-72446-9_26

Halanych KM, Robinson TJ (1999) Multiple substitutions affect the phylogenetic utility of cytochrome b and 12S rDNA data: Examining a rapid radiation in leporid (Lagomorpha) evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48:369-379. doi: 10.1007/PL00006481

Hibbard CW (1963) The Origin of the P₃ Pattern of *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *Journal of Mammalogy* 44(1):1-15. doi: 10.2307/1377162

- Illumina (2018) bcl2fastq Conversion Software v1.8.4. Illumina.
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-2 [WWW Document]. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded 09 July.
- Kamiya M, Suzuki H, Villa-R B (1979) A new anoplocephaline cestode, *Anoplocephaloides romerolagi* sp. n. parasitic in the volcano rabbit, *Romerolagus diazi*. *Japanese Journal of Veterinary Research* 27(3-4):67-71. doi: 10.14943/jjvr.27.3-4.67
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4):772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Kraatz B, Sherratt E (2016) Evolutionary morphology of the rabbit skull. *PeerJ* 4:e2453. doi: 10.7717/peerj.2453
- Kriegs JO, Zemann A, Churakov G, Matzke A, Ohme M, Zischler H, Brosius J, Kryger U, Schmitz J (2010) Retroposon insertions provide insights into deep Lagomorph evolution. *Molecular Biology and Evolution* 27(12):2678-2681. doi: 10.1093/molbev/msq162
- Matthee CA, Van Vuuren BJ, Bell D, Robinson TJ (2004) A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Systematic Biology* 53(3):433-447. doi: 10.1080/10635150490445715
- McCormack JE, Faircloth BC, Crawford NG, Gowaty PA, Brumfield RT, Glenn TC (2012) Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. *Genome Research* 22:746-754. doi: 10.1101/gr.125864.111
- McCormack JE, Harvey MG, Faircloth BC, Crawford NG, Glenn TC, Brumfield RT (2013) A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *PLoS One* 8(1): e54848. doi: 10.1371/journal.pone.0054848
- McCormack JE, Tsai WLE, Faircloth BC (2016) Sequence capture of ultraconserved elements from bird museum specimens. *Molecular Ecology Resources* 16(5):1189-1203. doi: 10.1111/1755-0998.12466
- McDonough MM, Parker LD, McInerney NR, Campana MG, Maldonado JE (2018) Performance of commonly requested destructive museum samples for mammalian genomic studies. *Journal of Mammalogy* 99(4):789-802. doi: 10.1093/jmammal/ggy080
- Osuna F, González D, de los Monteros AE, Guerrero JA (2020) Phylogeography of the Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*): the Evolutionary History of a Mountain Specialist

- Molded by the Climatic-Volcanism Interaction in the Central Mexican Highlands. *Journal of Mammalian Evolution* 27:745-757. doi: 10.1007/s10914-019-09493-6
- Robinson TJ, Matthee CA (2005) Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: A review of cytogenetics, molecular analyses and a supermatrix analysis. *Mammal Review* 35(3-4):231-247. doi: 10.1111/j.1365-2907.2005.00073.x
- Rose KD, DeLeon VB, Missiaen P, Rana RS, Sahni A, Singh L, Smith T (2008) Early Eocene lagomorph (Mammalia) from Western India and the early diversification of Lagomorpha. *Proceedings of the Royal Society B* 275:1203-1208. doi: 10.1098/rspb.2007.1661
- Ruedas LA, Mora JM, Lanier HC (2018) Evolution of lagomorphs. In: Smith AT, Johnston CH, Alves PC, Hackländer K (eds) *Lagomorphs: Pikas, Rabbits, and Hares of the World*, Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, pp. 4-8.
- Salomon SVM, Contreras MJL, Damián MP, Vásquez PCG (2005) Estimación de la variabilidad genética en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en cautiverio. *Veterinaria México* 36(2):119–126.
- Sandelin A, Bailey P, Bruce S, Engström PG, Klos JM, Wasserman WW, Ericson J, Lenhard B (2004) Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 5:99. doi: 10.1186/1471-2164-5-99
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010. NOM-059-SEMARNAT-2010, *Diario Oficial de la Federación*.
- Silva SM, Ruedas LA, Santos LH, E Silva JDS, Aleixo A (2019) Illuminating the obscured phylogenetic radiation of South American *Sylvilagus* Gray, 1867 (Lagomorpha: Leporidae). *Journal of Mammalogy* 100(1):31-44. doi: 10.1093/jmammal/gyy186
- Simons C, Pheasant M, Makunin IV, Mattick JS (2006) Transposon-free regions in mammalian genomes. *Genome Research* 16:164-172. doi: 10.1101/gr.4624306
- Sparwel M, Doronina L, Churakov G, Stegemann A, Brosius J, Robinson TJ, Schmitz J (2019) The volcano rabbit in the phylogenetic network of lagomorphs. *Genome Biology and Evolution* 11(1):11-16. doi: 10.1093/gbe/evy257
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312-1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
- Stephen S, Pheasant M, Makunin IV, Mattick JS (2008) Large-scale appearance of ultraconserved elements in tetrapod genomes and slowdown of the molecular clock. *Molecular Biology and Evolution* 25(2):402-408. doi: 10.1093/molbev/msm268

- Stoner CJ, Bininda-Emonds ORP, Caro T (2003) The adaptive significance of coloration in lagomorphs. *Biological Journal of the Linnean Society* 79(2):309-328. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00190.x
- Su C, Nei M (1999) Fifty-million-year-old polymorphism at an immunoglobulin variable region gene locus in the rabbit evolutionary lineage. *PNAS* 96(17):9710-9715. doi: 10.1073/pnas.96.17.9710
- Velazquez A, Cervantes FA, Galindo-Leal C (1993) The volcano rabbit *Romerolagus diazi*, a peculiar lagomorph. *Lutra* 36: 62–70.
- Velazquez A, Larrazábal A (2011) Del conocimiento específico a la conservación de todos los niveles de organización biológica. El caso del zacatuche y los paisajes que denotan su hábitat. *Investigación Ambiental* 3(2):59-62.
- Verde Arregoitia LD, Leach K, Reid N, Fisher DO (2015) Diversity, extinction, and threat status in Lagomorphs. *Ecography* 38(11):1155-1165. doi: 10.1111/ecog.01063
- Whitfield JB, Lockhart PJ (2007) Deciphering ancient rapid radiations. *Trends in Ecology & Evolution* 22(5):258-265. doi: 10.1016/j.tree.2007.01.012
- Yamada F, Takaki M, Suzuki H (2002) Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the amami rabbit *Pentalagus furnessi*, the Japanese hare *Lepus brachyurus*, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genes and Genetic Systems* 77(2):107-116. doi: 10.1266/ggs.77.107
- Zerbino DR, Birney E (2008) Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821-829. doi: 10.1101/gr.074492.107

Table 1 Specimens and donators. Numbers in parenthesis indicate the number of specimens from the same species

Specie	Donator	Access number	Date	Tissue	Locality
<i>Ochotona princeps lasalensis</i>	Field Museum	FMNH 162969	1998	organ	USA: Utah: San Juan Co.
<i>Neotomodon alstoni</i>	Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" Facultad de Ciencias, UNAM	<i>In process</i>	2015	tail	Mexico: Tlaxcala: La Malinche, Huamantla
<i>Lepus flavigularis</i> (1)	Colección Mastozoológica, El Colegio de la Frontera Sur	ECO-SC-M 8103	2016	muscle	Mexico: Oaxaca: Llano Contreras
<i>Lepus flavigularis</i> (2)	Colección Mastozoológica, El Colegio de la Frontera Sur	ECO-SC-M 8104	2016	muscle	Mexico: Oaxaca: Llano Contreras
<i>Sylvilagus floridanus</i>	Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" Facultad de Ciencias, UNAM	FCM 6874	2013	organ	Mexico: Yucatan: Tizimin
<i>Sylvilagus cunicularius</i>	Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" Facultad de Ciencias, UNAM	FCM 6358	2012	organ	Mexico: Morelos: Yecapixtla
<i>Romerolagus diazi</i> (1)	Zoológico de Chapultepec	-	2018	heart	deceased specimen
<i>Romerolagus diazi</i> (2)	Zoológico de Chapultepec	-	2018	liver	deceased specimen
<i>Romerolagus diazi</i> (3)	Zoológico de Chapultepec	-	2018	liver	deceased specimen
<i>Romerolagus diazi</i> (4)	Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" Facultad de Ciencias, UNAM	<i>In process</i>	2018	heart	Mexico: Estado de Mexico: Amecameca de Juárez
<i>Pronolagus rupestris nyikae</i>	Field Museum	FMNH 177256	2003	organ	Mozambique: Zambezia: Ethiopian coordinates
<i>Poelagus marjorita</i>	Field Museum	FMNH 223662	2012	organ	Uganda: Northern Kiryandongo
<i>Pentalagus furnessi</i>	Museum of Zoology, University of Michigan	UMMZ 75083	1932	dry skin	Japan: Okinawa: Amami o Shima
<i>Caprolagus sinensis flaviventris**</i>	Museum of Comparative Zoology, Harvard University	MCZ: Mamm: 23444	1925	dry skin	China: Fujian
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (1)	Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM	-	2018	liver	practice specimen
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2)	Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM	-	2018	liver	practice specimen
<i>Brachylagus idahoensis</i>	Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico	MSB 155420	2007	liver	USA: Nevada: Humboldt County
<i>Bunolagus monticularis</i>	Museum of Comparative Zoology, Harvard University	MCZ: Mamm: 56905	1948	dry skin	South Africa: Cape of Good Hope
<i>Nesolagus timminsi</i>	Department of Mammalogy, American Museum of Natural History	AMNH 276142	1999	skeleton (crusties)	Vietnam: Ha Ting: Huong Son Dist.
<i>Caprolagus hispidus</i>	Field Museum	FMNH 30265	1928	skeleton (crusties)	India: Nepal Border

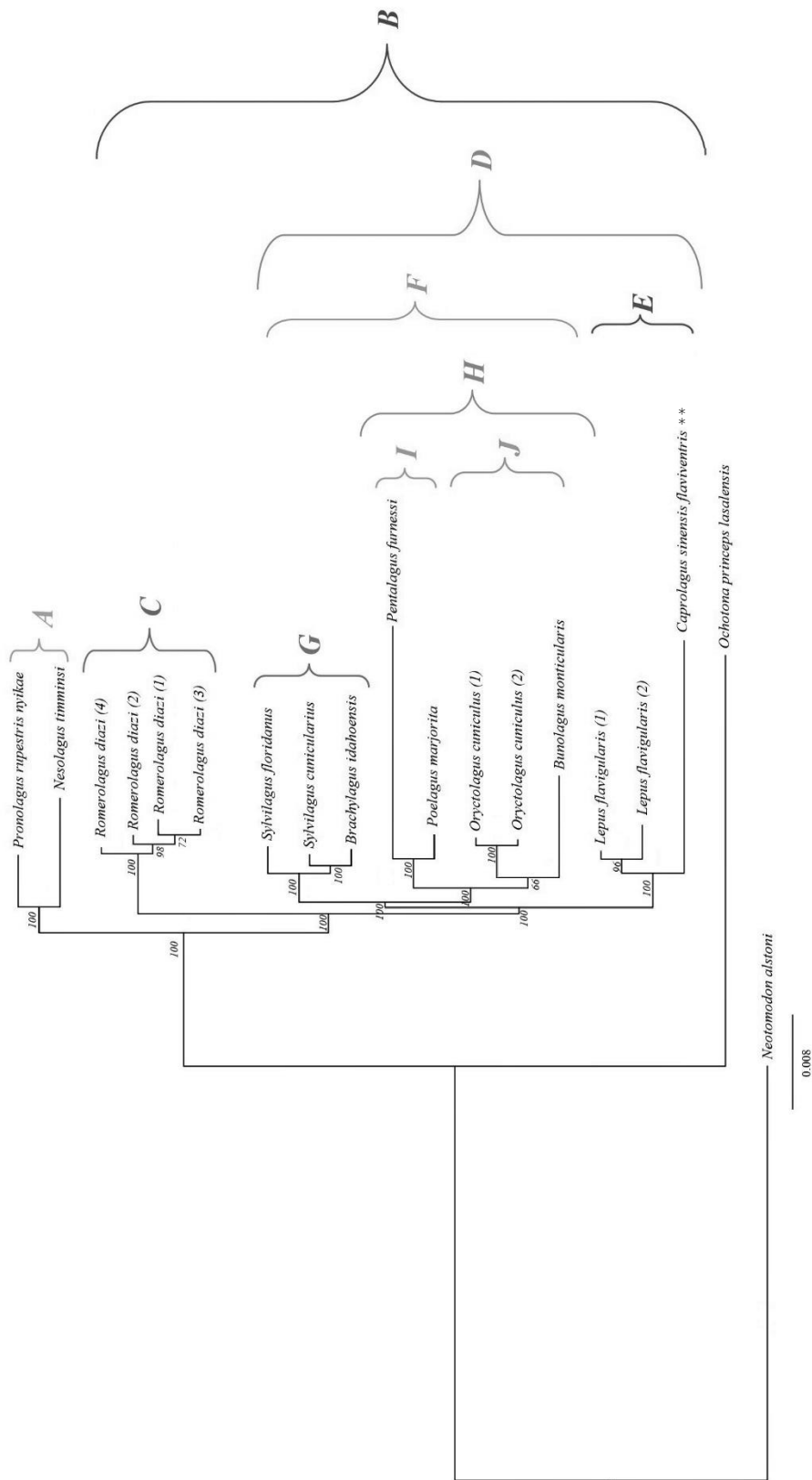
Table 2 Genomic summary statistics.

Sample	Raw reads	Trimmed reads	Total bp	Mean length	95% CI Length	Contigs	UCE loci
<i>Neotomodon alstoni</i>	2,525,502	2,467,796	622,838,826	124.8092711	0.00999925	121,098	1,930
<i>Ochotona princeps lasalensis</i>	1,845,495	1,772,971	461,840,036	127.7937337	0.011123644	88,813	2,530
<i>Lepus flavigularis</i> (1)	3,064,880	2,949,963	770,101,483	128.1575196	0.008444235	142,068	2,114
<i>Lepus flavigularis</i> (2)	1,819,602	1,763,204	456,409,645	127.504826	0.011226452	88,214	2,021
<i>Sylvilagus floridanus</i>	2,409,261	2,318,253	605,086,066	128.1323514	0.009577755	120,693	2,304
<i>Sylvilagus cunicularius</i>	2,719,806	2,617,894	685,151,800	128.5134884	0.008777211	135,562	2,249
<i>Romerolagus diazi</i> (1)	2,018,641	1,917,347	500,359,641	127.3468142	0.011002984	105,744	2,346
<i>Romerolagus diazi</i> (2)	3,408,323	3,306,312	852,876,400	127.1200148	0.008171206	158,498	1,999
<i>Romerolagus diazi</i> (3)	2,666,375	2,562,053	670,752,722	128.4337526	0.008967462	130,744	2,175
<i>Romerolagus diazi</i> (4)	3,315,357	3,235,801	821,929,969	125.630782	0.008835894	135,115	1,781
<i>Pronolagus rupestris nyikae</i>	1,650,854	1,580,148	413,984,557	128.3198361	0.011532739	85,578	2,822
<i>Poelagus marjorita</i>	2,100,325	2,004,924	525,958,288	128.2892679	0.010260921	111,827	2,443
<i>Pentalagus furnessi</i>	665,904	605,567	74,743,904	60.27831417	0.017690028	4,463	1,224
<i>Caprolagus sinensis flaviventris</i> **	1,424,852	1,390,546	230,557,154	82.23223689	0.015759354	23,488	2,110
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (1)	3,360,490	3,263,960	804,878,336	121.6141339	0.009604928	140,822	1,928
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2)	3,242,297	3,152,393	796,396,369	124.6373261	0.008770535	139,929	1,867
<i>Bunolagus monticularis</i>	1,588,710	1,557,180	290,155,254	92.39518567	0.016143892	33,695	2,201
<i>Brachylagus idahoensis</i>	2,211,312	2,120,705	555,747,179	128.4557378	0.009880075	114,208	2,416
<i>Nesolagus timminsi</i>	355,035	336,674	76,333,467	111.7723406	0.036529355	28,301	2,869

Table 3 Summary data from the incomplete matrix

Alignment summary		Informative Sites summary		Taxon summary		Character count summary	
loci	4,195	loci	4,195				
length	3,764,357	total	59,112	mean	9.74		
mean	897.34	mean	14.09	95% CI	0.12	All characters	37,189,939
95% CI	6.91	95% CI	0.56	min	3	Nucleotides	19,733,228
min	142	min	0	max	19		
max	1,927	max	215				

Fig. 1 Maximum-likelihood phylogeny inferred from the 75% incomplete matrix with data from 19 specimens enriched ultraconserved element loci. Bootstrap support values indicated by numbers on every ramification. Braces divide taxa into groups from A to J.



DISCUSIÓN GENERAL

Se reconstruyó un árbol de máxima verosimilitud (ML) a partir de la matriz incompleta de UCEs concatenados utilizando los sitios informativos (Fig. 1), bien respaldado compuesto por 16 nodos, todos con un soporte por encima del 96%. Esta filogenia recuperó relaciones fuertemente apoyadas entre todos los lagomorfos examinados. Nuestros resultados arrojan dudas, si no sobre la existencia potencial de Palaeolaginae, al menos en cuanto a sus miembros constituyentes y los caracteres de diagnóstico utilizados por Dice (1929) para caracterizar el taxón.

Al erigir Palaeolaginae, Dice señaló que la subfamilia se basaba en el patrón de esmalte dental de la cara de P₃. Incluyó a los modernos *Pentalagus*, *Pronolagus* y *Romerolagus*, en la subfamilia basándose únicamente en la morfología de P₃. *Pronolagus* y *Pentalagus* fueron retenidos como taxones hermanos por Hibbard (1963) basándose en la morfología de P₃, pero eliminó a *Romerolagus* a un linaje distinto basado en la morfología de P₂. *Pronolagus*, en nuestros resultados, junto con *Nesolagus*, de hecho, forma un clado muy distinto y distintivo del resto del grupo, lo que sugiere una división profunda dentro de Leporidae, potencialmente a nivel de subfamilia. Sin embargo, al contrario de Dice (1929), nuestros datos demuestran que *Romerolagus* no es hermana del clado {*Nesolagus*, *Pronolagus*}; en cambio, es basal y hermano del endogrupo restante de los lepóridos modernos. Estos datos son problemáticos en relación con la definición de Palaeolaginae establecida por Dice (1929). Además, los datos moleculares de Matthee et al. (2004) colocan firmemente a *Pentalagus* dentro del endogrupo de los Lepóridos Modernos. Nos centramos en taxones incluidos por Dice (1929) en Palaeolaginae porque, en virtud de su pertenencia hipotetizada a una subfamilia segregada de la Leporinae, estos son taxones que potencialmente podrían tener algún nivel de distinción de los taxones incluidos en esta última subfamilia. Sea como fuere, como resultado de la definición incierta de Palaeolaginae, algunos autores posteriores han evitado su uso (por ejemplo, White 1991; McKenna y Bell 1997). Otros eliminaron por completo Palaeolaginae de Leporidae basándose en caracteres craneodentales adicionales (Asher et al. 2005; Wible 2007; von Koenigswald et al. 2010). Estas definiciones y circunscripciones de subfamilias cambiantes simplemente subrayan los peligros inherentes a la definición de un grupo basado en un único carácter morfológico dental de un

taxón que por lo demás es conservador en aspectos de morfología craneodentales y esqueléticos como lo es la familia Leporidae.

Independientemente de las incertidumbres identificadas anteriormente con respecto a las definiciones de subfamilias lepóridas, nuestros datos moleculares identifican inevitablemente una división dentro de Leporidae: el ancestro lepórido basal más común con linajes que conducen a los géneros de endogrupo con Lepóridos Modernos por un lado y por otro a *Pronolagus rupestris* y *Nesolagus timminsi* Averianov, Abramov y Tikhonov, 2000. Este primer clado es similar a la topología recuperada por Sparwel et al. (2019) basado en retrotransposones y otros estudios basados en datos de secuencia molecular (p. ej., Matthee y Robinson 2004, Robinson y Matthee 2005, Upham et al. 2019) identificando a *Pronolagus* como un taxón lepórido basal.

El siguiente linaje en divergir es el Clado C monofilético, compuesto exclusivamente por *R. diazi*; con un valor de bootstrap del 100% este clado es comparable al sugerido por otros estudios de lagomorfos filogenéticos (p. ej., Hibbard 1963). El espécimen C4 se recupera fuera del grupo formado por el resto de los especímenes (C1, C2 y C3) con un alto nivel de soporte, lo que indica que existen diferencias identificables entre poblaciones en cautiverio y poblaciones silvestres a nivel genómico. Lo anterior podría tener su origen ya sea por el cautiverio como primera hipótesis o que la divergencia identificada se debe a que las muestras provienen de dos áreas geográficas distintas de acuerdo al sitio de colecta; mientras que los especímenes de cautiverio tienen su origen en la localidad de Parres en las faldas del volcán Pelado (Sierra Chichinautzin), el espécimen del museo de Zoología de la UNAM fue colectado en el municipio de Amecameca, en las faldas de la Sierra Nevada a 45 km de distancia aproximadamente del primer sitio. Estas diferencias se han estudiado con anterioridad solo a nivel genético mediante análisis RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar, por sus siglas en inglés) (Soto et al. 2005) y mediante dos genes de ADNmt para reconstruir el patrón filogeográfico (Osuna et al. 2020). El Clado C, *Romerolagus*, es resuelto como clado hermano del Clado D, que contiene los lepóridos restantes, con una topología generalmente congruente con filogenias publicadas anteriormente, incluida la relación entre *Lepus*, *Oryctolagus* y *Sylvilagus*, propuesto por Dawson (1981).

Con respecto al Clado E, cabe señalar que el Museo de Zoología Comparada de la Universidad de Harvard otorgó el permiso y donó material de la especie

etiquetada como *Caprolagus sinensis flaviventris* (MCZ: Mamm: 23444) sin embargo, se identificó que en la taxonomía actual *Caprolagus* es un género monotípico (*C. hispidus*) y que la especie “*sinensis flaviventris*”, de hecho, corresponde al género *Lepus* (*L. sinensis flaviventris*). Para el momento de la elaboración de esta tesis este dato no fue rastreado por lo que los resultados muestran a *Lepus sinensis flaviventris* como *Caprolagus sinensis flaviventris* indicando claramente que hay una estrecha relación entre ambos lo cual no concuerda con ninguna teoría anteriormente planteada. Esta situación de la identificación errónea del espécimen ha sido informada a la fuente de origen y es de esperar que se verifique y corrija a su debido tiempo. A pesar de que para el momento de la escritura de la tesis no se tenía conocimiento de este error, hubo oportunidad de corregirse para la publicación del artículo producto de esta investigación, realizando una reinterpretación de la filogenia con implicaciones significativas en nuestros resultados dado que finalmente no se contó con los 12 géneros del Orden Lagomorpha.

Nuestra evaluación de las relaciones filogenéticas de *Poelagus* también difiere de la de Matthee et al. (2004): mientras ellos obtuvieron una relación de taxones hermanos entre *Poelagus* y *Pronolagus* según su conjunto de datos, nosotros encontramos una relación de taxones hermanos entre *Poelagus* y *Pentalagus*. Matthee y col. (2004) encontraron que el taxón hermano de *Bunolagus* era *Pentalagus*; mientras que nuestra filogenia arroja a *Bunolagus* como grupo hermano de *Oryctolagus* que a su vez son el grupo basal y hermano del grupo {*Poelagus*, *Pentalagus*}, relación que apoya la hipótesis de Robinson y Matthee (2005) basada en un enfoque de superárbol que también obtuvo a *Oryctolagus* y *Bunolagus* como taxones hermanos.

Otro resultado de nuestro análisis es el hallazgo de *Brachylagus* incrustado dentro de *Sylvilagus*; dado nuestro muestreo taxonómico limitado, *Brachylagus* se resuelve como hermano de *S. cunicularius* Waterhouse, 1848 con exclusión de *S. floridanus* Allen, 1890. *Brachylagus idahoensis* fue descrito por Merriam (1891) en un entonces *Lepus* más expansivo. Posteriormente, *Brachylagus* fue establecido como un subgénero por Miller (1900) y en 1904 Lyon lo elevó a género, notando algunas peculiaridades de los dientes y las vértebras sacras. Grinnell y col. (1930) basados en la morfología con una amplia variación geográfica y anual, favorecieron la inclusión de *B. idahoensis* dentro de *Sylvilagus*. El estado genérico de *Sylvilagus idahoensis* fue conservado por revisores posteriores (por ejemplo, Orr 1940; Hall 1951; 1981). White (1991)

planteó la hipótesis de una relación más estrecha entre *Romerolagus* y *Brachylagus* que entre *Brachylagus* y *Sylvilagus*. En general, a pesar de las últimas hipótesis basadas en la morfología dental y los hallazgos iniciales que denotan discrepancias subgenéricas o genéricas, puede haber pocas dudas de una estrecha relación filogenética entre *Sylvilagus* y *Brachylagus*. Nuestra conclusión de que *B. idahoensis* está dentro de *Sylvilagus*, por lo tanto, no es necesariamente sorprendente: de hecho, Halanych y Robinson (1999) encontraron el mismo resultado; en ese caso, con base en su muestreo genético y taxonómico, estos autores obtuvieron una relación hermana entre *S. idahoensis* y *S. floridanus* con exclusión de *S. aquaticus* Bachman, 1837 y *S. palustris* Bachman, 1837.

CONCLUSIONES

De manera exitosa se ha logrado desenredar la enmarañada red que hasta este momento había sido la sistemática filogenética de los lagomorfos. Obtuvimos una filogenia robusta de Lagomorpha, incluyendo al menos una especie de cada género, a excepción de *Caprolagus*, lo que nos permitió iluminar relaciones filogenéticas previamente indefinidas. Además, este resultado se debió al uso de muestras antiguas de museo y a la captura de UCEs con su ADN flanqueante para obtener una filogenia con alto respaldo, lo que representa una fuente novedosa de información. Los sólidos resultados respaldan continuar con el uso de colecciones de museos alrededor del mundo para completar toda la filogenia de los lagomorfos, considerando siempre la incertidumbre sobre la identificación de muestras antiguas como fue el caso de *L. sinensis flaviventris*.

Los resultados con respecto a *Romerolagus diazi* apoyan investigaciones previas que posicionan a esta especie como la segunda división de clado justo después del género *Pronolagus* entre los lepóridos existentes. La evidencia emergente derivada de la presente publicación apunta hacia diferencias genómicas entre las poblaciones cautivas y silvestres de *Romerolagus* que podrían ser causadas precisamente por la distancia geográfica, como Osuna et al. (2020) corrobora a nivel genético y que ya había sido propuesto con anterioridad por Ramírez-Silva en 2009 sugiriendo la existencia de filogrupos asociados a la geografía, lo que podría arrojar luz sobre la dinámica de la metapoblación de esta especie en peligro de extinción. Además, postula retos en las acciones de manejo y conservación *ex situ* e *in situ* de la especie.

El trabajo actual, con base en los revisores internacionales, fue invitado a que con base en los resultados, se realicen análisis complementarios con otras metodologías de elaboración de filogenias como BEAST2 para fines de evidenciar de manera más robusta la filogenia obtenida del Orden de lagomorfos con esta nueva técnica de UCEs y su ADN flanqueante; así como obtener el reloj molecular del Orden. Esta tarea ha sido atendida en la nueva versión enviada a la revista para su publicación.

LITERATURA CITADA

Asher, R. J., Meng, J., Wible, J. R., McKenna, M. C., Rougier, G. W., Daszeveg, D., & Novacek, M. J. (2005). Stem Lagomorpha and the antiquity of Glires. *Science*, 307:1091-1094. <https://doi.org/10.1126/science.1107808>

Averianov, A. O., Abramov, A. V., & Tikhonov, A. N. (2000). A new species of *Nesolagus* (Lagomorpha, Leporidae) from Vietnam with osteological description. *Contrib Zool Inst*, 3:1-22.

Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there?. *Journal of Mammalogy*, 99(1): 1-14.

Corbet, G. B. (1983). A review of classification in the family Leporidae. *Acta Zoologica Fennica*, 174: 11-15.

Flynn, L. J., Winkler, A. J., Erbaeva, M., Alexeeva, N., Anders, U., Angelone, C., ... & Zhang, Z. (2014). The Leporid Datum: a late Miocene biotic marker. *Mammal Review*, 44(3-4): 164-176.

Gibbs, R. A., & Pachter, L. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982): 493-521.

Grinnell, J., Dixon, J. S., & Linsdale, J. M. (1930). Vertebrate natural history of a section of northern California through the Lassen Peak region. *Univ. California Publ. Zool.*, 35:1-594.

Hall, E. R. (1951). American weasels. *Univ. Kansas Publ. Mus. Nat. Hist.*, 4:1-446.

Hall, E. R. (1981). *The mammals of North America*. The Ronald Press Company, New York, 1 and 2:1-1181 +90.

Lyon, M. W. (1904) Classification of the hares and their allies. *Smithson Misc Collect*, 45:321-447+pl. LXXIV-C.

McKenna, M. C., & Bell, S. K. (1997) *Classification of mammals: above the species level*. Columbia University Press. New York, USA.

- Meiklejohn, K. A., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Kimball, R. T., & Braun, E. L. (2016). Analysis of a rapid evolutionary radiation using ultraconserved elements: evidence for a bias in some multispecies coalescent methods. *Systematic biology*, 65(4): 612-627.
- Merriam, C. H. (1891) Results of a biological reconnaissance of Idaho, south of latitude 45° and east of the thirty-eighth meridian, made during the summer of 1890, with annotated lists of the mammals and birds, and descriptions of new species. *N Am Fauna*, 5:1-127+4 pl.
- Miller, G. S. Jr. (1900). A new subgenus for *Lepus idahoensis*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 13: 157.
- Murphy, W. J., Pevzner, P. A., & O'Brien, S. J. (2004) Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends in Genetics*, 20(12):631-639. doi: 10.1016/j.tig.2004.09.005
- O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W.J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E., & Marshall Graves, J. A. (1999). The promise of comparative genomics in mammals. *Science*, 286(5439):458-481. doi: 10.1126/science.286.5439.458
- Orr, R. T. (1940). The rabbits of California. *Occas Papers California Acad Sci*, 19:1-27.
- Payseur, B. A., & Rieseberg, L. H. (2016). A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular ecology*, 25(11): 2337-2360.
- Ramírez-Silva, J. P. (2009). Diversidad genética entre las poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) (Doctoral dissertation, Tesis de Doctorado. Instituto de Biología, unam, México).
- Seehausen, O., Butlin, R. K., Keller, I., Wagner, C. E., Boughman, J. W., Hohenlohe, P. A., ... & Widmer, A. (2014). Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics*, 15(3): 176-192.
- Soto, V. M. S., Montiel, J. L. C., Matzumura, P. D., & Peláez, C. G. V. (2005). Estimación de la variabilidad genética en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en cautiverio. *Veterinaria México*, 36(2), 119-133.
- Upham, N. S., Esselstyn, J. A., & Jetz, W. (2019). Inferring the mammal tree: species-level sets of phylogenies for questions in ecology, evolution, and conservation. *PLoS biology*, 17(12): e3000494.
- Velazquez, A. (1994). Distribution and Population Size of *Romerolagus Diazii* on El Pelado Volcano, Mexico. *Journal of Mammalogy*, 75(3): 743-49.
- Velazquez, A., Romero, F. J., & López-Paniagua J. (eds.). (1996). *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. Ediciones científicas universitarias. Fondo de Cultura Económica, México. 196 Pp.

- Velazquez, A., & Guerrero, J.A. (2019). *Romerolagus diazi*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2019*: e.T19742A45180356. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T19742A45180356.en>. Downloaded on 24 March 2021.
- von Koenigswald, W., Anders, U., Engels, S., Schultz, J. A., & Ruf, I. (2010). Tooth morphology in fossil and extant Lagomorpha (Mammalia) reflects different mastication patterns. *J Mammal Evol*, 17:275–299.
- Waterston, R. H., & Pachter, L. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915): 520-562.
- White, J. A. (1991). North American Leporinae (Mammalia: Lagomorpha) from Late Miocene 770 (Clarendonian) to Latest Pliocene (Blancan). *J Vertebr Paleontol*, 11:67–89.
- Wible, J. R. (2007). On the cranial osteology of the Lagomorpha. *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History*, (39): 213-234.