



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Filogenética de la musaraña desértica *Notiosorex crawfordi***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

P r e s e n t a

**ALEJANDRO ISSAC CAMARGO PÉREZ**

La Paz, Baja California Sur, Octubre del 2016.

**COMITÉ TUTORIAL**

DR. SERGIO TICUL ÁLVAREZ CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

DR. PEDRO PEÑA GARCILLÁN

COTUTOR

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

COTUTOR

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

**COMITÉ REVISOR DE TESIS**

DR. SERGIO TICUL ÁLVAREZ CASTAÑEDA

DR. PEDRO PEÑA GARCILLÁN

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

**JURADO DE EXAMEN**

DR. SERGIO TICUL ÁLVAREZ CASTAÑEDA

DR. PEDRO PEÑA GARCILLÁN

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

**SUPLENTE**

DR. GUSTAVO ARNAUD FRANCO

## RESUMEN

Las musarañas desérticas del género *Notiosorex* incluyen a cuatro especies recientes *N. cockrumi*, *N. crawfordi*, *N. evotis*, *N. villai* y cuatro fósiles *N. jacksoni*, *N. dalquesti*, *N. harrisi* y *N. repenningi* (Carraway, 2007). Con base en la divergencia molecular existente en la especie *N. crawfordi* se cree que una quinta especie pudiera estar presente en la península de Baja California (PBC), pero debido al bajo número de ejemplares analizados no se ha logrado conocer si esta divergencia asociada a lo largo de su distribución (Ohdachi *et al.*, 2006; McAliley *et al.*, 2007). Con base en la hipótesis planteada se analizó la variación genética a nivel específico a partir de individuos de diferentes localidades en la PBC y California. A partir de salidas al campo dentro de la PBC y material de colecciones científicas se realizaron extracciones de ADN. Se utilizaron los marcadores moleculares de origen mitocondrial (Cyt, *b* 800 pb; COI 542, pb, COIII 672 pb) y un intrón del beta fibrinógeno (FGB-17 385 pb). Se reconstruyó una filogenia con las especies del género *Notiosorex*, los enfoques filogenéticos utilizados fueron el de Máxima Verosimilitud (MV), Inferencia Bayesiana (IB) para corroborar la identidad molecular de las poblaciones analizadas. Se obtuvieron distancias genéticas entre 14 -16% utilizando los modelos K2P, JC y *p*-distance entre las poblaciones de la PBC y las poblaciones de Arizona. Los análisis de reconstrucción filogenética MV e IB realizados, muestran topologías prácticamente idénticas, ubicando a las poblaciones en tres clados monofiléticos con valores de soporte de bootstrap alto < 90%. La divergencia genética también fue alta dentro del linaje *N. cockrumi* entre 12.2 - 13.8% y con el género hermano *Megasorex gigas* de 19.3 - 20.4%, ambos pertenecientes a la tribu Notiosoricini. En base a la monofilia observada en la topología de los análisis utilizados se ha evidenciado un aislamiento genético entre las poblaciones de *Notiosorex* a lo largo del noroeste de su distribución. Los resultados filogenéticos obtenidos de identidad molecular entre las musarañas del género *Notiosorex* sugiere una asignación taxonómica a nivel específico de las poblaciones al noroeste de su distribución.

**Palabras clave:** *desierto californiano, distancias genéticas, diversidad críptica, evolución molecular, musarañas, península de Baja California.*

Vo. Bo.

---

Dr. Sergio Ticul Alvarez Castañeda  
Director de Tesis

**ABSTRACT**

The desert shrews of the genus *Notiosorex* include four recent species *N. cockrumi*, *N. crawfordi*, *N. evotis*, *N. villai*, and four fossil species *N. jacksoni*, *N. dalquesti*, *N. harrisi* and *N. repenningi* (Carraway, 2007). Based on the existing molecular divergence in the species *N. crawfordi*, it is believed that a fifth species may be present in the Baja California Peninsula (BCP), but the low number of samples analyzed makes it difficult to know whether this divergence is associated with its distribution (Ohdachi *et al.*, 2006; McAliley *et al.*, 2007). Based on this hypothesis, genetic variation at species level was analyzed with individuals from different locations in the BCP and California, U.S.A. From field trips within the BCP and scientific material collections, DNA extractions were performed; molecular markers of mitochondrial origin (Cyt *b*, 800 pb; COI, 542 pb; COIII, 672 pb) and fibrinogen intron beta (FGB-17 385 bp) were used; a phylogeny was reconstructed with species of the genus *Notiosorex*; the phylogenetic approaches used were the Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (IB) to corroborate the molecular identity of the populations analyzed. Genetic distances between 14 -16% were obtained using the K2P, JC, and p-distance models among populations of the BCP and those of Arizona. The reconstruction phylogenetic analyses MV and IB showed almost identical topologies, placing populations in three monophyletic clades with high support bootstrap values < 90%. Genetic divergence was also high in *N. cockrumi* lineage from 12.2 - 13.8% compared with its sister genus *Megasorex gigas* from 19.3 - 20.4% both belonging to the tribe Notiosoricini. The monophyly observed in the topology of the analyses performed has shown a genetic isolation among *Notiosorex* populations along their northwestern distribution. The results of molecular phylogenetic identity among shrews of the genus *Notiosorex* suggest assigning a specific taxonomic level to the populations northwest of their distribution.

**Keywords:** Baja California peninsula, Californian desert, cryptic diversity, genetic distance, molecular evolution, shrews.

Vo. Bo.

---

Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda  
Director de Tesis

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanas por ser lo máximo en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con registro No. 339242.

Al Programa de Posgrado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y a la Colección de Mamíferos (CIB).

A los proyectos CONACYT 263089 y 151184.

Al Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así como involucrarme en el estudio de la evolución de los sorícidos.

A quienes los que me acompañaron en salidas al campo para la obtención de las muestras de las musarañas para este trabajo; Luis Ernesto Pérez, Abraham Carranza, Evelyn Ríos, Cristian Cornejo. Adriana Miranda, Alan Rodríguez y Dalia Santos.

A la Dra. Patricia Cortes Calva y a las técnicas asociadas a la colección de mamíferos del CIB; Mayra de la Paz Cuevas y Carmen Izmene Gutiérrez Rojas por su ayuda en la catalogación e incorporación de los ejemplares colectados dentro de la colección científica, y limpieza del material óseo.

Al Nodo CIBNOR código de barras y a la técnico M. en C. Griselda Gallegos Simental por su el entrenamiento y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A los doctores Pedro Cruz y Pedro P. Garcillán por sus comentarios y aportaciones para la presente tesis.

Agradezco a Leticia Cab Sulub por su asistencia en la elaboración de los mapas de distribución.

Personal de Posgrado: Norma Hernández S., Osvelia Ibarra M., Leticia González, Tania Núñez y Horacio Sandoval.

A Diana Dorantes por el apoyo en la revisión de estilo del idioma inglés.

<b>Contenido</b>	
Resumen.....	i
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>6</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
5.1 Objetivo general.....	7
5.2 Objetivos específicos.....	7
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
6.1 Obtención del material biológico mediante salidas al campo.....	8
6.2 Obtención de material biológico de ejemplares depositados en colecciones científicas.....	10
6.3 Extracción y visualización del ADN.....	14
6.4 PCR.....	15
6.5 Análisis de datos filogenéticos.....	16
6.5.1 Alineación y edición de las secuencias genéticas.....	16
6.5.2 Distancias genéticas.....	16
6.5.3 Análisis de reconstrucciones filogenéticas.....	17
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
7.1 Reconstrucciones filogenéticas realizadas a partir del gen Cyt b.....	19
7.2 Relaciones filogenéticas a partir del gen mitocondrial COI.....	22
7.3 Análisis de las relaciones filogenéticas a partir del gen mitocondrial COIII... ..	24
7.4 Reconstrucción filogenética realizada a partir del intrón 7 del gen nuclear beta fibrinógeno.....	26
7.5 Reconstrucción filogenética realizada del conjunto de genes concatenados	29
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
8.1. Relaciones evolutivas entre las musarañas de Norteamérica.....	32
8.2 Sistemática de las musarañas del género <i>Notiosorex</i> .....	33
8.3 El Río Colorado como una barrera de aislamiento filogeográfico.....	35
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>

## Lista de figuras

- Figura 1.** Mapa de la distribución de las musarañas de desierto (Soricidae: *Notiosorex*). Modificado de Carraway y Timm (2000); Carraway (2007) y McAliley *et al.* (2007)..... 3
- Figura 2.** Localidades de colecta de la musaraña desértica *Notiosorex crawfordi* en la Península de Baja California..... 9
- Figura 3.** Ubicación de las localidades de *N. crawfordi* y *N. cockrumi* obtenidas mediante donación de las colecciones científicas TTU ASU y MVZ..... 11
- Figura 4.** Dendograma de agrupamiento UPGMA construido a partir de distancias genéticas del gen *Cyt b* (800 pb) los valores posteriores de las ramas son el producto 10,000 repeticiones de bootstrap..... 20
- Figura 5.** Árbol de MV e IB reconstruido utilizando el marcador molecular *Cyt b* (800pb) y el modelo evolutivo GTR..... 21
- Figura 6.** Dendograma de agrupamiento UPGMA construido a partir de distancias genéticas del gen COI (653 pb)..... 22
- Figura 7.** Árbol reconstruido a partir del agrupamiento MV e IB el gen mitocondrial COI (650pb). Los valores posteriores de las ramas son el producto 10,000 repeticiones de bootstrap..... 23
- Figura 8.** Cladograma de agrupamiento utilizando el método UPGMA del gen mitocondrial COIII (653 pb)..... 25
- Figura 9.** Árbol reconstruido a partir de MV e IB utilizando el gen mitocondrial COIII (653) y el modelo GTR..... 26
- Figura 10.** Análisis de UPGMA producto un intrón del gen nuclear FGB17..... 28
- Figura 11.** Árbol filogenético reconstruido a partir IB y MV de sorícidos de la PBC..... 28
- Figura 12.** Árbol construido bajo el IB Y MV para musarañas de Norte América utilizando el modelo TrN + G (2 millones de generaciones y una frecuencia en el muestreo de 200 generaciones)..... 31
- Figura 13.** Árbol construido bajo el método de inferencia bayesiana utilizando el modelo TrN + G (2 millones de generaciones y una frecuencia en el muestreo de 200 generaciones) y la hipótesis propuesta de la distribución de las musarañas del género *Notiosorex*..... 34



## Lista de tablas

**Tabla I.** Localidades de musarañas utilizadas en la reconstrucción filogenética (Lat= latitud, Long= longitud, Col.= colección científica, y No. Cat.= número de catálogo)..... 12

**Tabla II.** Distancias genéticas de los genes mitocondriales (Cyt *b*, COI, COII) entre las tribus de la subfamilia Soricinae utilizando los modelos de sustitución de nucleótidos Kimura 2 parametros (k2P; Kimura, 1980); Jukes Cantor (JC; Jukes y Cantor, 1969) y p-distance es la proporción de sitios de nucleótidos en el que se comparan dos secuencias diferentes..... 30

## 1. INTRODUCCIÓN

Las musarañas son pequeños mamíferos placentarios. Sus principales características son un hocico alargado con bigotes sensoriales, la presencia de un par de ojos diminutos y orejas pequeñas. Son plantígrados y pentadáctiles con garras en los dedos (Churchfield, 1990). La forma de su cráneo es primitiva con respecto a otros mamíferos, posee características ancestrales compartidas (Feldhamer *et al.*, 1999). Se caracterizan por estar activas tanto de día como de noche (Reid, 1997). Presentan tasa metabólica muy alta, debido a esto pueden llegar a ingerir hasta el doble de su peso en un solo día (Vaughan *et al.*, 2000). El alimento consumido por musarañas en su mayoría son invertebrados como artrópodos y anélidos (Hanski y Kaikusalo, 1989; Churchfield *et al.*, 1997).

Las musarañas anteriormente se encontraban clasificadas dentro del orden Insectivora debido a su características de alimentación entomófaga (Hamilton, 1930). El orden ha servido como un cajón de sastre, conteniendo un amontonamiento de grupos con relaciones artificiales (Hutterer, 2005). Cambios taxonómicos en base a características evolutivas compartidas, han reclasificado a las musarañas dentro del orden Soricomorpha, el cual también se encuentra representado por los topos y almiquíes (Mc Kenna y Bell, 1997). Dentro de este orden se han agrupado a cuatro familias: la extinta Nesophodintidae†, Soledontidae (los almiquíes o soledontes), Talpidae (topos) y Soricidae (musarañas comunes) (Wilson y Reeder, 2005).

La familia de los sorícidos (Soricomorpha: Soricidae) presentan una distribución cosmopolita que incluye a tres subfamilias de musarañas, las cuales albergan a su vez a seis tribus y 26 géneros (Wilson y Reeder, 2005). En Norteamérica los sorícidos se encuentran representados por tres tribus; Blarinini, Soricini y Notiosoricini (Ohdachi *et al.*, 2006; Carraway, 2007; Dubey *et al.*, 2007;) y en México la diversidad de esta familia es de 36 especies, las cuales se agrupan

en cuatro géneros; *Cryptotis*, *Megasorex*, *Notiosorex* y *Sorex* (Álvarez-Castañeda *et al.*, 2015).

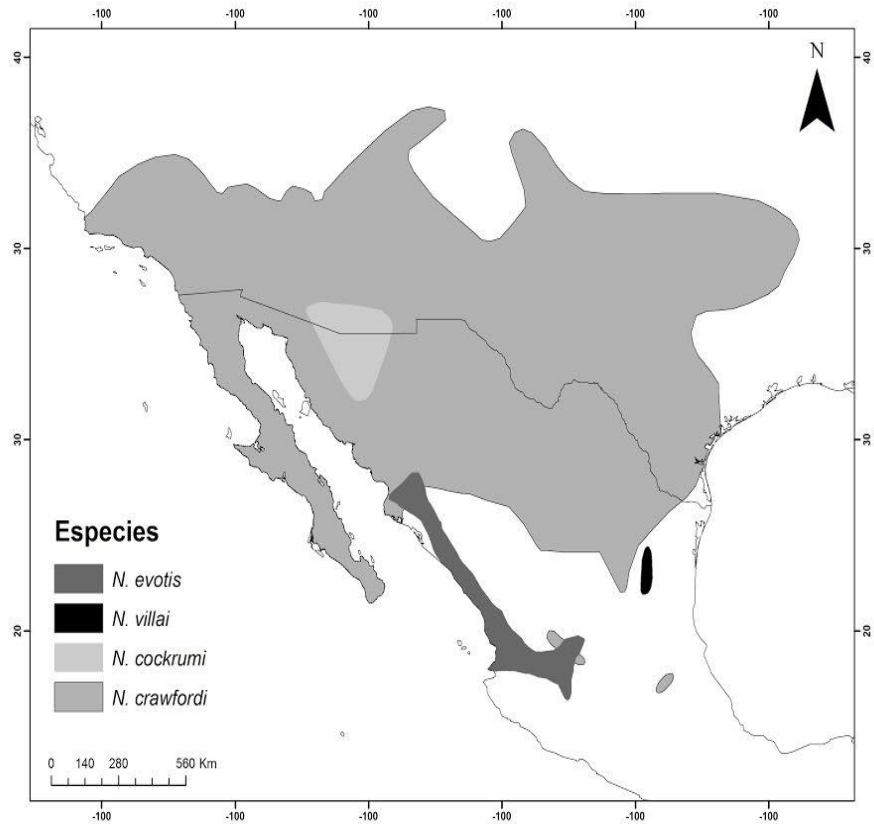
La tribu Notiosoricini está compuesta por dos géneros fósiles (*Beckiasorex* y *Hesperosorex*) y dos géneros actuales (*Notiosorex* y *Megasorex*) distribuidos en zonas áridas del Sur de Estados Unidos y Norte de México (Harris, 1998; Reumer, 1998). Los géneros actuales han tenido cambios taxonómicos, anteriormente ambos se agrupaban dentro de *Notiosorex* por su fórmula dentaria. Sin embargo, un cráneo más robusto y con la ausencia de pigmentación rojiza en los dientes, han permitido que estas características se consideren evolutivamente importantes a nivel género entre la tribu (Carraway, 2007; Merriam, 1897). Estudios morfológicos y moleculares han sostenido la hipótesis de mantener a *Megasorex* como un género independiente (Hibbard, 1950; Ducommun *et al.*, 1994; Ohdachi *et al.*, 2006).

Con respecto al género *Notiosorex* la información biológica existente es escasa, por lo tanto el proceso de delimitación de poblaciones con base en la variación en la forma y estructura del cráneo utilizando un número limitado de individuos puede resultar no representativo de las diferencias que existen entre las poblaciones a lo largo de su distribución. Todo esto aunado a que la morfología general de las musarañas es muy conservadora entre las especies (Choate, 1970; Merriam, 1897; Jackson, 1928).

Actualmente gran parte de las clasificaciones de los seres vivos se basan en el uso de marcadores moleculares, los cuales tienen importancia en el reconocimiento y delimitación de las entidades biológicas (Bradley y Baker, 2001). Este tipo de marcadores pueden ser una herramienta de utilidad para poner a prueba la hipótesis de aislamiento a lo largo de la distribución de las musarañas del género *Notiosorex* en los desiertos cálidos de Norteamérica, así como sobre el origen evolutivo.

## 2. ANTECEDENTES

Las poblaciones de las musaraña desérticas del género *Notiosorex* se encuentran agrupadas en cuatro especies; *N. cockrumi*, *N. crawfordi*, *N. evotis*, y *N. villai*, todas ellas con distribución en zonas áridas del norte de México (Fig. 1). Mediante el registro fósil de este género se han diferenciado otras cuatro especies *N. jacksoni*, *N. dalquesti*, *N. harrisi* y *N. repenningi* las cuales actualmente son consideradas como extintas (Carraway, 2010).



**Figura 1.** Mapa de la distribución de las musarañas de desierto (Soricidae: *Notiosorex*) (Modificado de Carraway y Timm, 2000; Carraway, 2007; McAliley *et al.*, 2007).

Mediante estudios morfológicos se ha evidenciado una variación en las medidas del cráneo entre poblaciones de *N. crawfordi evotis* con distribución en el Altiplano Costero en los estados de Sinaloa, Nayarit y Jalisco y ha servido como evidencia para proponer un linaje diferenciado, reconociendo a estas poblaciones a nivel específico (Carraway, 2007). La forma del cráneo ha sido útil para excluir a otras poblaciones del complejo *N. crawfordi*, *N. villai*, con distribución en la Sierra Madre Oriental conocida solo por tres ejemplares colectados en el estado de Tamaulipas (Carraway, 2010). De esta manera los caracteres craneales y la estructura dental han sido útiles en la delimitación de las especies de *Notiosorex* en función de las características adaptativas (Carraway 2007, 2010).

Los marcadores moleculares son herramientas útiles para la reconstrucción filogenética de las especies, el ADN mitocondrial se caracteriza por no presentar una recombinación genética, por lo tanto la descendencia puede tener exactamente el mismo genoma mitocondrial de la madre (Avice, 1994). Por lo tanto los linajes mitocondriales permiten obtener pistas sobre la historia evolutiva de las poblaciones en un determinado tiempo y espacio, es por esto que es un marcador muy utilizado en estudios de filogeografía (Freeland, 2005).

Utilizando marcadores moleculares de tipo mitocondrial y el intrón 7 del beta fibrinógeno 7, Baker *et al.* (2003) describen a *N. cockrumi* con distribución en el Desierto Sonorense, en los estados de Sonora y Arizona con base en la alta divergencia molecular. Se cree que una quinta especie pudiera estar presente al noroeste de su distribución en el desierto californiano (Ohdachi *et al.*, 2006; McAliley *et al.*, 2007; Manning *et al.*, 2014). Debido al bajo número de poblaciones analizadas en estos estudios moleculares no se ha logrado conocer si esta divergencia genética se encuentra asociada en la extensión total de la Península de Baja California.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo se basa en realizar una ubicación filogenética del género *Notiosorex* al Oeste del río Colorado, considerando que ha sido una barrera de dispersión en el proceso evolutivo de especiación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La poca representación de las musarañas del género *Notiosorex* en colecciones científicas hacen incierta la información básica sobre la biología, la distribución geográfica y la taxonomía de la especie. Contrastar procesos de aislamiento geográfico histórico con la variación genética entre las poblaciones ha sido de utilidad para proponer que el número potencial de especies que contiene el género *Notiosorex* ha sido desapercibido a lo largo de su distribución en los desiertos de Norte América (Ohdachi *et al.*, 2006; McAliley *et al.*, 2007; Manning *et al.*, 2014). Ante esta situación se considera importante realizar un análisis detallado entre sus poblaciones, pues características biológicas de las musarañas; como la baja dispersión geográfica, hacen que sea un grupo propenso a procesos evolutivos como la especiación por aislamiento geográfico. El estudio sistemático de grupos poco conocidos como lo son las musarañas forma parte de un componente esencial para entender la evolución y dispersión de los sorícidos, así como las implicaciones biogeográficas en la conservación de la diversidad de las especies en Norteamérica.

#### 4. HIPOTESIS

El Río Colorado es una barrera geográfica que ha favorecido la especiación entre los linajes de musarañas del género *Notiosorex*, y sus poblaciones se mantienen en dos filogrupos independientes producto de aislamiento geográfico entre sus poblaciones. Si esta hipótesis es cierta, el conjunto de poblaciones de musarañas de desierto de la especie *Notiosorex crawfordi* al oeste del Río Colorado (Península de Baja California y California) forman parte de un grupo monofilético que ha evolucionado de manera separada de las poblaciones al este.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Inferir las relaciones filogenéticas de la poblaciones de *Notiosorex crawfordi* con distribución en el Oeste del Río Colorado con respecto a las demás poblaciones de la especie.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis filogenético molecular del género *Notiosorex* utilizando tres genes mitocondriales (Cyt *b*, COI, COII) y el intrón 7 del fibrinógeno beta nuclear (FGB17) para reconstruir una hipótesis sobre su historia evolutiva al oeste de su distribución.
2. Ubicar filogenéticamente a las poblaciones peninsulares de musaraña desértica y a la única población insular de *Notiosorex* con respecto a otros miembros del género.
3. Analizar las distancias genéticas utilizando marcadores moleculares de tipo nuclear y mitocondriales entre poblaciones del género *Notiosorex* en la Península de Baja California, California, Arizona, Sonora y Texas las cuales permitan validar su identidad molecular.



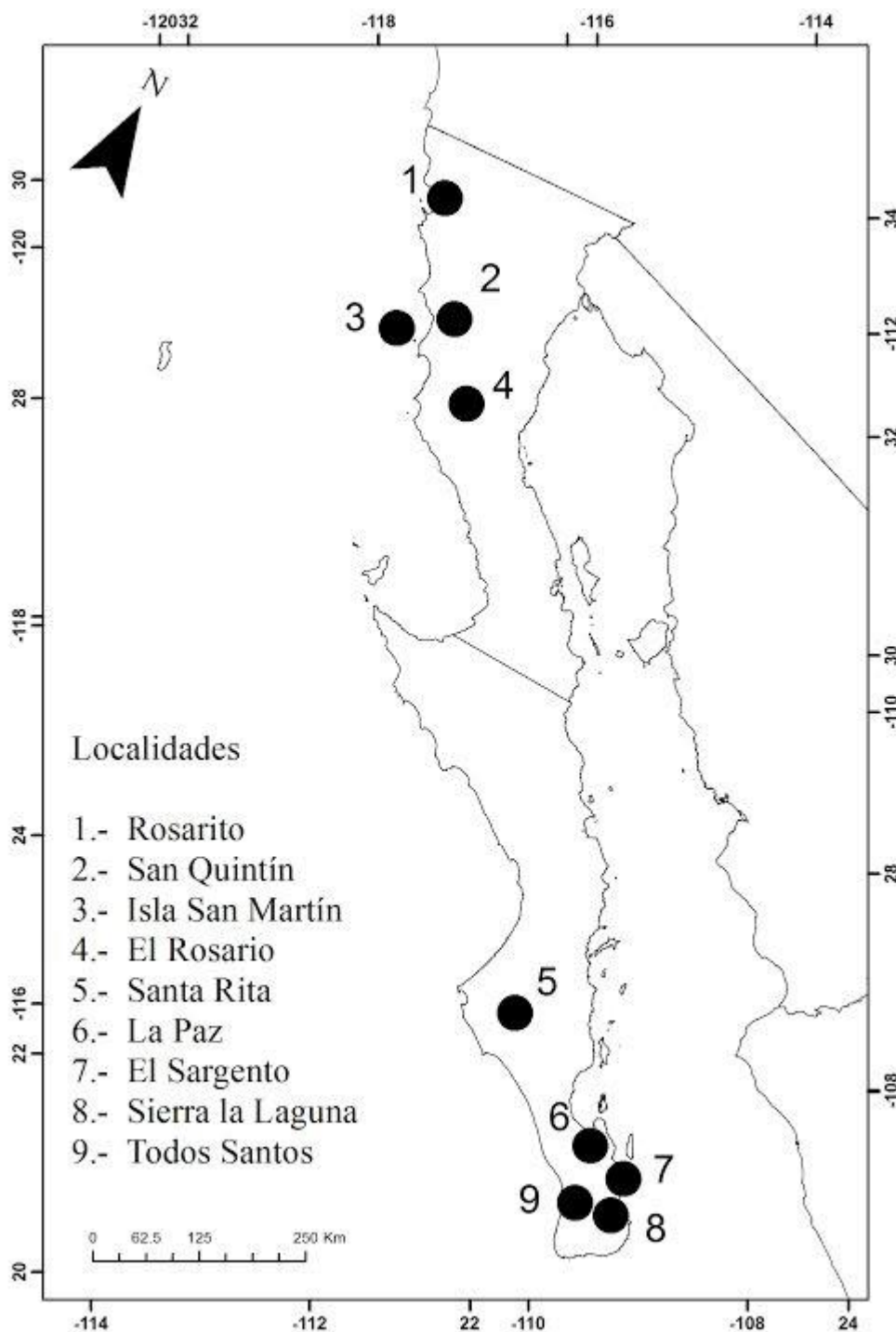
## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención del material biológico mediante salidas al campo

Se realizaron ocho salidas al campo en localidades ubicadas dentro de la península de Baja California (PBC) y una población insular de la especie *Notiosorex crawfordi* ubicada en la isla San Martín (Fig. 2). Como método de muestreo se utilizaron trampas tipo Sherman ( $7.5 \times 9.0 \times 23.0$  cm) rodeando la vegetación o troncos podridos que son refugio para los sorícidos, en cada localidad se utilizaron 560 noches trampa durante cinco noches.

El uso de trampas de caída o “pitfall” utilizando “drift fences” son un método efectivo para la colecta de musarañas del género *Notiosorex* (Chung-MacCoubrey, 2009). Se utilizó esta técnica mantenidas por barreras plásticas de 15 m de largo por 20 cm de ancho. La mayoría de los registros obtenidos a partir de individuos colectados se encontraron muertos, debido al metabolismo tan acelerado el cual provoca que las musarañas mueran hasta en un par de horas por inanición (Davis y Joeris, 1945).

Los individuos colectados que se encontraron vivos fueron sacrificadas siguiendo las recomendaciones de la Asociación Americana de Mastozoología (Sikes *et al.*, 2011). Se identificaron taxonómicamente utilizando las guías (Armstrong y Jones, 1972). Se obtuvieron las medidas de longitud total, longitud de la cola vertebral, longitud de la pata posterior derecha y longitud de la oreja en centímetros y el peso total en gramos de las musarañas, para su ingreso permanente en la colección mastozoológica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB).

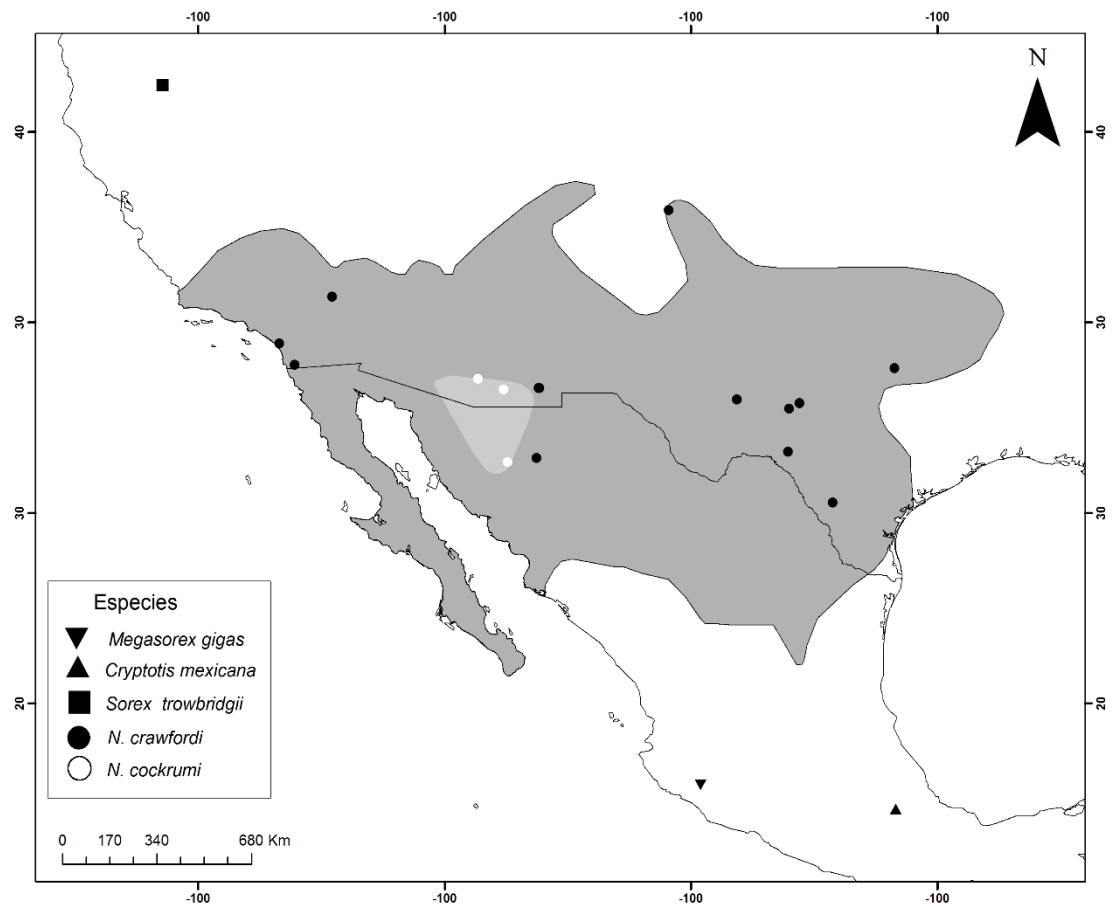


**Figura 2.** Localidades de colecta de la musaraña desértica *Notiosorex crawfordi* en la Península de Baja California. 1) Rosarito; 2) San Quintín; 3) isla San Martín; 4) El Rosario; 5) Bahía Magdalena; 6) La Paz; 7) El Sargento; 8) Sierra la Laguna; 9) Todos Santos.

## **6.2 Obtención de material biológico de ejemplares depositados en colecciones científicas**

La segunda parte de la obtención del material biológico fue realizada mediante búsqueda de individuos en la base de datos VertNet ([www.vertnet.org](http://www.vertnet.org)) la cual alberga información de colecciones científicas en Estados Unidos. Una vez localizados los registros de *N. crawfordi*, se solicitó donación de tejido muscular a partir de 22 ejemplares depositados en colecciones científicas en Estados Unidos en los estados de Arizona, Texas, Nuevo México.

Se obtuvieron secuencias genéticas de 18 localidades de musarañas del género *Notiosorex* de California, Sonora, Arizona, Texas y Nuevo México de colecciones científicas depositadas: Natural Science Research Laboratory de Texas Texas Tech University (TK); Museum of Vertebrate Zoology, en la Universidad de California Berkeley, (MVZ; Fig. 3).



**Figura 3.** Ubicación de las localidades de las musarañas *Cryptotis mexicana*, *Sorex trowbridgii*, *Megasorex gigas*, *N. crawfordi* y *N. cockrumi* obtenidas mediante donación de las colecciones científicas TTU ASU y MVZ.

**Tabla I.** Localidades de musarañas utilizadas en la reconstrucción filogenética (Lat= latitud, Long= longitud, Col.= colección científica, y No. Cat.= número de catálogo).

<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>	<b>Col</b>	<b>No. Cat.</b>
<b><i>N. crawfordi</i></b>	Chaparral Wildlife Management Area	28.32	-99.40	TK	84584
	14.6 mi E (by road) Mazocahui	29.60	-109.95	MVZ	148830
	4.1 mi NW (by road) Nacori Chico	29.73	-109.01	MVZ	148831
	Devils River State Natural Area, Val Verde Co.	29.92	-100.85	ASK	4277
	5 m N, 9.8 m W Mertzson, Irion Co.	31.28	-100.81	ASK	4571
	Leslie Canyon National Wildlife reserve	31.57	-102.50	TK	49919
	Leslie Canyon National Wildlife Reserve	31.57	-102.50	TK	49921
	SE Tucson, Exit 275	32.20	-110.89	TK	90852
	vicinity of Antelope Pass	31.93	-108.94	MVZ	191470
	vicinity of Antelope Pass	31.93	-108.94	MVZ	191472
	Hwy. 9, 7 mi E Hwy. 80	31.93	-108.92	MVZ	176473
	Hwy. 9, 7 mi E Hwy. 80	31.93	-108.92	MVZ	176474
	9.9 mi NNW Aguilar, Las Animas	37.53	-104.72	MVZ	122087
	Jack Lotts Ranch Post, Garza Co.	DND	DND	TK	22986
	DND	DND	DND	TK	84632
<b><i>Notiosorex PBC</i></b>	9 m S Rosarito	22.99	-109.77	MVZ	154747
	9 km S Todos Santos	23.46	-110.23	CIB	23392
	El Eden, 4km N, 21 Km W Santiago	23.51	-109.92	CIB	22676
	Palo Extraño, Sierra de la laguna	23.51	-109.93	CIB	22675
	9.3 km S, 6.5 km W El Sargento	24.11	-110.06	CIB	27499
	7 km N, 4.5 km W El Sargento	24.11	-110.06	CIB	27499
	8 km N, 4.5 km W El Sargento	24.11	-110.06	CIB	27500
	28 km N, 52 km W, Las Pocitas	24.64	-111.64	CIB	18893
	San José de Comondú	26.05	-111.82	CIB	9846
	10 m SE El Rosario	30.06	-115.57	MVZ	154748
	Isla San Martin	30.49	-116.11	CIB	24050
	Isla San Martin	30.49	-116.11	CIB	24051
	Isla San Martin	30.49	-116.11	CIB	24052
	Isla San Martin	30.49	-116.11	CIB	24053
Isla San Martin	30.49	-116.11	CIB	24053	

DND: Datos no disponibles.

Continuación de la **Tabla I.**

<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>	<b>Col</b>	<b>No. Cat.</b>	
<b><i>Notiosorex PBC</i></b>	Rancho Jamul	32.66	-116.87	MVZ	221974	
	Camp Pendleton	33.34	-117.36	MVZ	221962	
	El Eden, 4km N, 21 Km W Santiago	23.51	-109.92	CIB	22677	
	Chametla, 8 km W La Paz	24.09	-110.38	CIB	21408	
	3 km S, 8.7 km W La Paz	24.09	-110.38	CIB	20928	
	12.2 km S km 15.2 W Santa Rita	24.64	-111.64	CIB	24056	
	5.km N 20 km W Santa Rita	24.64	-111.64	CIB	24055	
	San Jose de Comondu	26.05	-111.82	CIB	9847	
	San Jose de Comondu	26.05	-111.82	CIB	9848	
	14 mi S San Quintin, Playa El Socorro	30.33	-115.83	LACM	91027	
	14 mi S San Quintin, Playa El Socorro	30.33	-115.83	LACM	91029	
	Granite Mts., Bull Canyon, 14 mi S of Kelso	34.80	-115.65	MVZ	175997	
	<b><i>N. cockrumi</i></b>	Leslie Canyon National Wildlife reserve	31.57	-102.50	TK	49910
Leslie Canyon National Wildlife Reserve		31.57	-102.50	TK	49918	
Leslie Canyon National Wildlife reserve		31.57	-102.50	TK	49928	
Leslie Canyon National Wildlife Reserve		31.57	-102.50	TK	49909	
Leslie Canyon National Wildlife Reserve		31.57	-102.50	TK	49917	
Leslie Canyon National Wildlife Reserve		31.5793	-102.50	TK	49922	
Leslie Canyon National Wildlife reserve		31.57	-102.50	TK	49924	
Leslie Canyon National Wildlife reserve		31.57	-102.50	TK	49930	
Val Verde County		30.83	-97.25	ANSHC	10653	
4.5 m W San Angelo, Tom Green Co.		31.46	-100.48	ASK	4530	
Tom Green County		31.46	-100.48	ANSHC	5556	
<b><i>Megasorex gigas</i></b>		14.5 mi N Colima	19.41	-103.69	LACM	55132
<b><i>Sorex trowbridgii</i></b>		3 km SE Mud Lake	41.47	-121.14	MVZ	223020
<b><i>Cryptotis mexicana</i></b>	3.1 km S Puerto del Aire	18.67	-97.35	MVZ	163012	

### 6.3 Extracción y visualización del ADN

Se realizó una extracción de ADN utilizando el protocolo de Sambrook y Rusell (2001), con algunas modificaciones. Para la extracción se colocaron de ~30 a 100 mg de tejido muscular de individuos de *N. crawfordi* en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se eliminó el contenido de alcohol de los tejidos colocándolos en una centrifuga de vacío a 30°C durante 10 minutos. Se adicionaron 500 µL de Buffer de lisis (100 nM NaCl; 50 mM Tris pH 8.0; 100 mM EDTA; 1% SDS) y se añadieron 20 µL de proteinasa K (solución stock de 10 mg/mL; Sigma No. Cat. P-2308). Se homogenizó el tejido en partículas finas y se incubó en baño maría a 65°C por tres horas, hasta que el tejido quedo lisado.

Se agregaron 200 µL de NaCl saturado (~6M) y se agitó vigorosamente por 5 minutos para posteriormente incubar en baño de hielo durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 11200 *xg* durante 10 minutos y se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un microtubo limpio. Se adicionaron 350 µL de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), y se agitó vigorosamente por aproximadamente 5 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 21952 *xg* durante 5 minutos, 500 µL del sobrenadante fueron transferidos a un microtubo limpio. Adicionando 1,000 µL (2 volúmenes) de etanol al 100% y se mezcló por inversión, se llegó a apreciar una turbidez en la mezcla (ADN), en este paso se dejó reposar por una noche a -20°C. Se centrifugó la mezcla a 21952 *xg* durante 10 minutos y se decantó el etanol.

Se agregaron 500 µl etanol al 80% y la mezcla se agitó en vórtex, seguido por un centrifugado a 21952 *xg* durante 5 min. Se decantó el etanol y se secó en centrifuga de vacío a 30°C durante 5 a 10 min. El ADN obtenido siguiendo esta técnica fue disuelto con 100 µL de agua destilada y almacenado a -20 °C. El ADN obtenido fue visualizado en geles de agarosa. Para la preparación de los geles se pesó la agarosa de acuerdo a la concentración deseada (1% para la extracción de ADN; 1.5% para PCR). Posteriormente se calentó en horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió completamente (aproximadamente un minuto) y se

añadió una gota de bromuro de etidio para obtener una concentración final de 10 µg/mL. La mezcla se vertió sobre un molde y se acomodó el peine, se dejaron solidificar los geles aproximadamente de 10 a 15 minutos, seguido de colocarlos en una cámara de electroforesis, la cual se llenó con buffer TBE 1X. Las muestras se mezclaron con el buffer de carga y fueron colocadas una en cada pozo. Posteriormente se conectaron los cables a la cámara de electroforesis y a la fuente de poder. Se ajustó el voltaje a 110 V y se dejó correr 1 hora. Una vez contenido el producto deseado dentro del gel, se utilizó un transiluminador de luz UV para visualizar el ADN.

#### 6.4 PCR

Una vez extraído el ADN se amplificaron genes mitocondriales, el primero fue del primer fragmento del gen citocromo *b* (Cyt *b* 800 pb), las condiciones utilizadas en el termociclador fueron: desnaturalización a 93 °C por 2 min, alineamiento a 45 °C durante 1.5 min, y extensión a 72 °C durante 2 min por 32 ciclos de doble cadena y 35 ciclos para la amplificación de una sola cadena utilizando los cebadores MVZ05 y MVZ16 siguiendo las condiciones de PCR de Smith y Patton (1993).

Para el gen citocromo *c* oxidasa subunidad 3 (COIII, 694 pb) se utilizaron las siguientes condiciones ajustadas: desnaturalización a 98 °C por 1 min, alineamiento a 58 °C durante 1.5 min, y extensión a 72 °C durante 2 min por 30 ciclos de doble cadena y 30 ciclos para la amplificación de una sola cadena utilizando los cebadores L8618/ H9323 (Alexander y Riddle, 1995). El gen citocromo oxidasa subunidad I (COI, 567 pb) con los cebadores LCLCO1490/HCO2198 siguiendo la metodología propuesta por Ivanova *et al.* (2007), basada en desnaturalización a 94 °C por 2 min, alineamiento a 52 °C durante 40 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 min por 30 ciclos de doble cadena y 30 ciclos para la amplificación de una sola cadena por 10 min. Para el locus 7 del intrón del beta fibrinógeno nuclear se siguieron las condiciones reportadas por Wickliffe *et al.* (2003) los cebadores  $\beta$ -fib I7L/  $\beta$ -fib I7U con una



desnaturalización 94 °C por 2 min, alineamiento a 54 °C durante 40 segundos, y extensión a 72 ° durante 2 min.

## **6.5 Análisis de datos filogenéticos**

### **6.5.1 Alineación y edición de las secuencias genéticas**

Las secuencias de los genes mitocondriales y el intrón 7 del fibrinógeno beta nuclear fueron obtenidas mediante una revisión visual de los electroferogramas de cada fragmento amplificado, utilizando el programa SEQUENCHER v.3.1 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan). La alineación fue realizada utilizando el programa BioEdit versión 7.0.7.0 (Hall, 1999) y los datos del individuo se nombraron con el género y la especie, seguido de las siglas de la colección donde se encuentra depositado, así como el número de catálogo (Tabla II).

Se obtuvo una secuencia de ADN de la musaraña *Megasorex gigas* a partir del gen mitocondrial Cyt *b* de la base de datos Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) debido a que esta especie es considerada el grupo hermano del género *Notiosorex*, y dentro de la búsqueda de tejidos en colecciones científicas también se incluyeron otras especies de musarañas las tribus Blarini (*Cryptotis mexicana*) y Soricini (*Sorex trowbridgii*), debido a que la relación entre estas musarañas con la tribu Notiosoricini, integrada por *Megasorex* y *Notiosorex*, no está resuelta (Ohdachi *et al.*, 2006).

### **6.5.2 Distancias genéticas**

Una vez alineadas las secuencias se analizaron las distancias genéticas entre las secuencias de cada marcador molecular a partir del modelo de sustitución Kimura 2 Parámetros (K2P; Kimura, 1980) y Jukes Cantor (JC; Jukes y Cantor, 1969), utilizando el programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2013). La elección del modelo de sustitución Kimura 2

parámetros (K2P; Kimura, 1980), Jukes y Cantor se realizó como comparativo con otras distancias genéticas reportadas para sorícidos (Ohdachi *et al.*, 2006; McAliley *et al.*, 2007; Manning *et al.*, 2014) y poder analizar las tasas de sustitución por sitio entre los marcadores moleculares utilizados.

### **6.5.3 Análisis de reconstrucciones filogenéticas**

El primer análisis filogenético fue realizado UPGMA el que se basa en una matriz de distancia genética para construir un árbol con base en la similitud de secuencias que se realizó utilizando el modelo de evaluación de nucleótidos K2P y JC usando 1,000 repeticiones de bootstrap para dar soporte a los nodos con el software MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2013). Para la determinación del modelo evolutivo que más se ajusta a los datos se utilizó el programa ModelTest 0.1.1 (Posada y Crandall, 1998). El modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos fue el de TrN + G (Tavaré, 1986), el cual permite tasas distintas para las transiciones entre las purinas comparado con las transiciones entre las pirimidinas.

El análisis Máxima Verosimilitud (MV), se realizó con programa PAUP\* 4.10b (Swofford, 2002). En principio el algoritmo de MV calcula la probabilidad de esperar cada nucleótido en su estado ancestral y calcula la verosimilitud del árbol para esa probabilidad, con el objetivo de definir qué modelo de sustitución de nucleótidos se ajusta de mejor forma a los datos. Al contar con el modelo evolutivo se hizo una búsqueda heurística con adición paso a paso de las secuencias de manera aleatoria, con 1,000 réplicas de Bootstrap, además del algoritmo de corte y reconexión de ramas

El último análisis de reconstrucción filogenética que se realizó fue el de probabilidad posterior Bayesiana (Rannala y Yang, 1996). Para el cual se utilizaron distintos modelos evolutivos dependiendo el gen para generar un árbol, así como para regenerar los valores de soporte, para el análisis se corrieron a 20 millones de generaciones en dos corridas independientes con cuatro cadenas de Markov cada una. Los árboles fueron muestreados cada 1,000 generaciones

después de un burn-in inicial del 25%, utilizando el programa MrBayes 3.0b4 (Hulsenbeck y Ronquist, 2001) los árboles filogenéticos se visualizaron con el programa FigTree 1.2.3 (Rambaut, 2009).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Reconstrucciones filogenéticas realizadas a partir del gen Cyt b

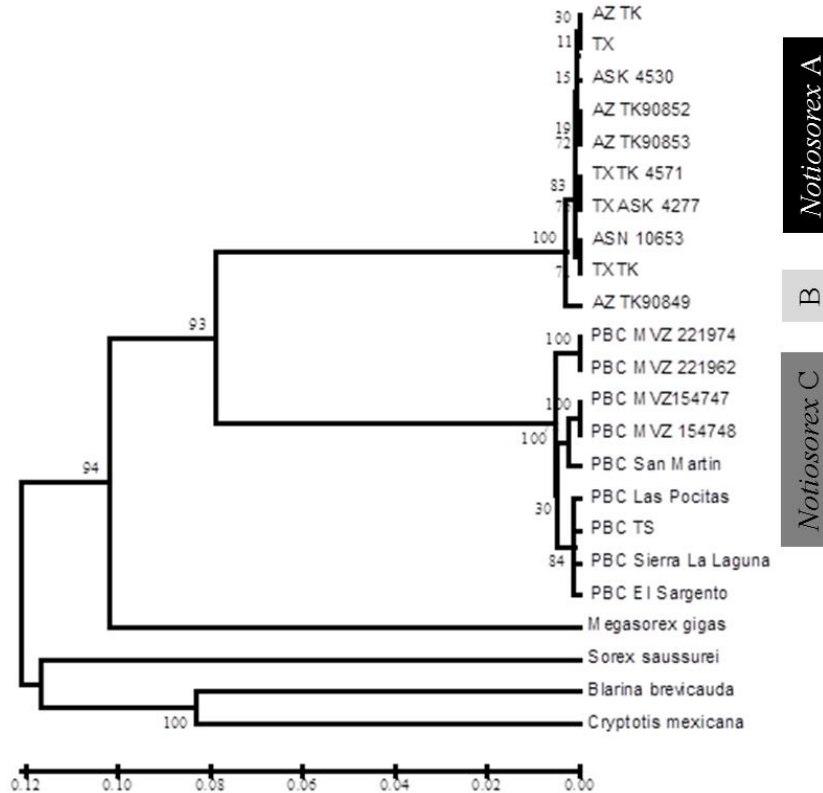
Se amplificaron 800 pares de bases (pb) del gen mitocondrial Cyt *b* y su composición de nucleótidos se encontró compuesta en un 32% por timina (T), 26.8% citosina (C), 28.1% adenina (A) y 13.1 % guanina (G). Los nucleótidos analizados se componen de 205 sitios parsimoniosamente informativos, 280 sitios variables, 520 sitios conservados y 75 sitios únicos entre 26 secuencias analizadas de las tres tribus de musarañas con distribución en Norteamérica.

La historia evolutiva del gen mitocondrial Cyt *b* se dedujo usando el método de agrupamiento basado en el método UPGMA. La topología del árbol agrupa a los géneros *Megasorex* y *Notiosorex* dentro de un mismo clado apoyado por un 94% de bootstrap. Dentro del género *Notiosorex* se recuperan dos clados diferenciados con 97% de bootstrap; el primer clado formado por individuos de *N. crawfordi* del Este y *N. cockrumi*, el tercer clado por individuos del filogrupo californiano (Fig. 4). Se reportan distancias genéticas utilizando el método de sustitución de nucleótidos K2P de 15.81% entre las poblaciones de *N. crawfordi* que se encuentran separadas por el Río Colorado al lado Este con respecto a las poblaciones del filogrupo californiano (oeste). Porcentaje similar al obtenido mediante el método JC 15.38% entre filogrupos de ambos lados del Río Colorado.

A partir de 800 caracteres se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA y se construyó un árbol con una longitud de rama = 0.5772. En este árbol las musarañas desérticas del género *Notiosorex* se agruparon en tres clados, en el primer clado se agrupó el filogrupo californiano y sonoreense soportado por un valor de bootstrap de 67 con respecto a *N. crawfordi*, entre cada filogrupo el valor de bootstrap fue de 100, lo cual indica una alta probabilidad de que estos sean clados verdaderos.

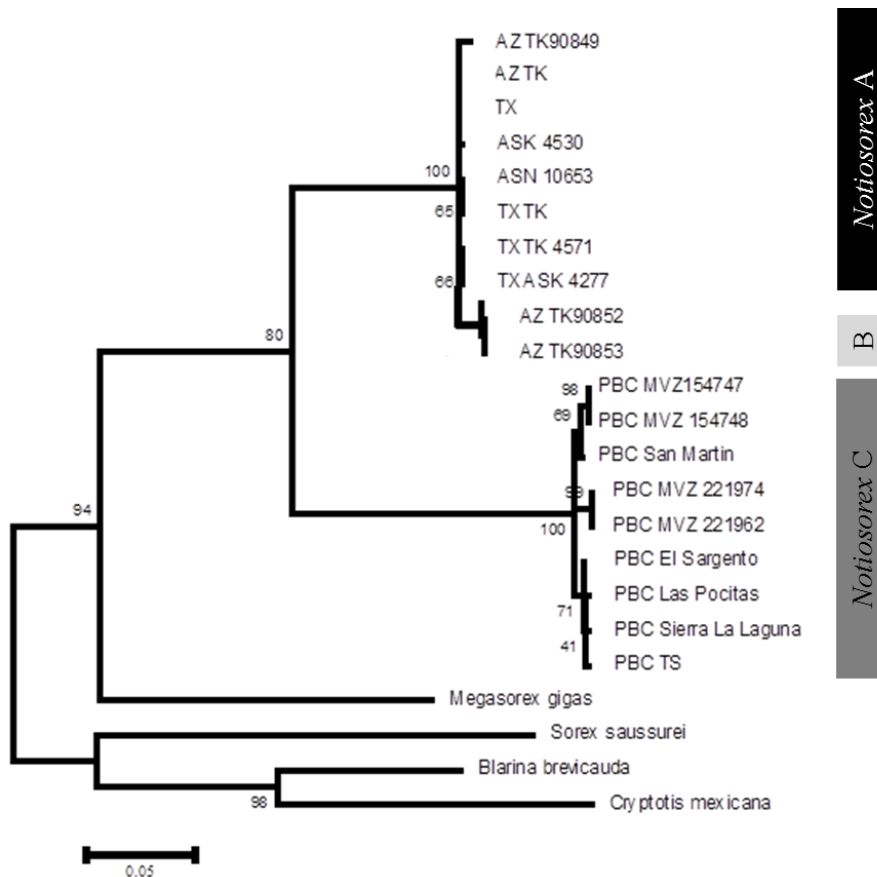
Se realizó un análisis de MV utilizando el modelo TrN + G (Tamura y Nei, 1993) que toma en cuenta: exceso de transiciones, frecuencias desiguales de los nucleótidos y diferentes tasas de sustitución entre estos. En la topología recuperada por el árbol es posible distinguir a los filogrupos de *Notiosorex*.

En la topología recuperada por árbol construido bajo el Análisis Bayesiano de máxima probabilidad ase agrupa dentro del clado *Notiosorex* con un valor de bootstrap de 94. El clado *Notiosorex* se encuentra compuesto por dos clados independientes, el primero incluye a las poblaciones de *N. crawfordi* y *N. cockrumi*, y el tercero el clado californiano.



**Figura 4.** Dendrograma de agrupamiento UPGMA construido a partir de distancias genéticas del gen *Cyt b* (800 pb) los valores posteriores de las ramas son el producto 10,000 repeticiones de bootstrap.

Se realizó un análisis de MV utilizando el modelo TrN + G (Tamura y Nei, 1993) que toma en cuenta: exceso de transiciones, frecuencias desiguales de los nucleótidos y diferentes tasas de sustitución entre estos. En la topología recuperada por el árbol es posible distinguir a los filogrupos de *Notiosorex*. En la topología recuperada por árbol construido bajo el Análisis Bayesiano de máxima probabilidad el género *Notiosorex* se agrupa dentro del clado *Notiosorex* con un valor de bootstrap de 94. El clado *Notiosorex* se encuentra compuesto por dos clados independientes, el primero incluye a las poblaciones de *N. crawfordi* y *N. cockrumi*, y el tercero el clado californiano (Figura 5).

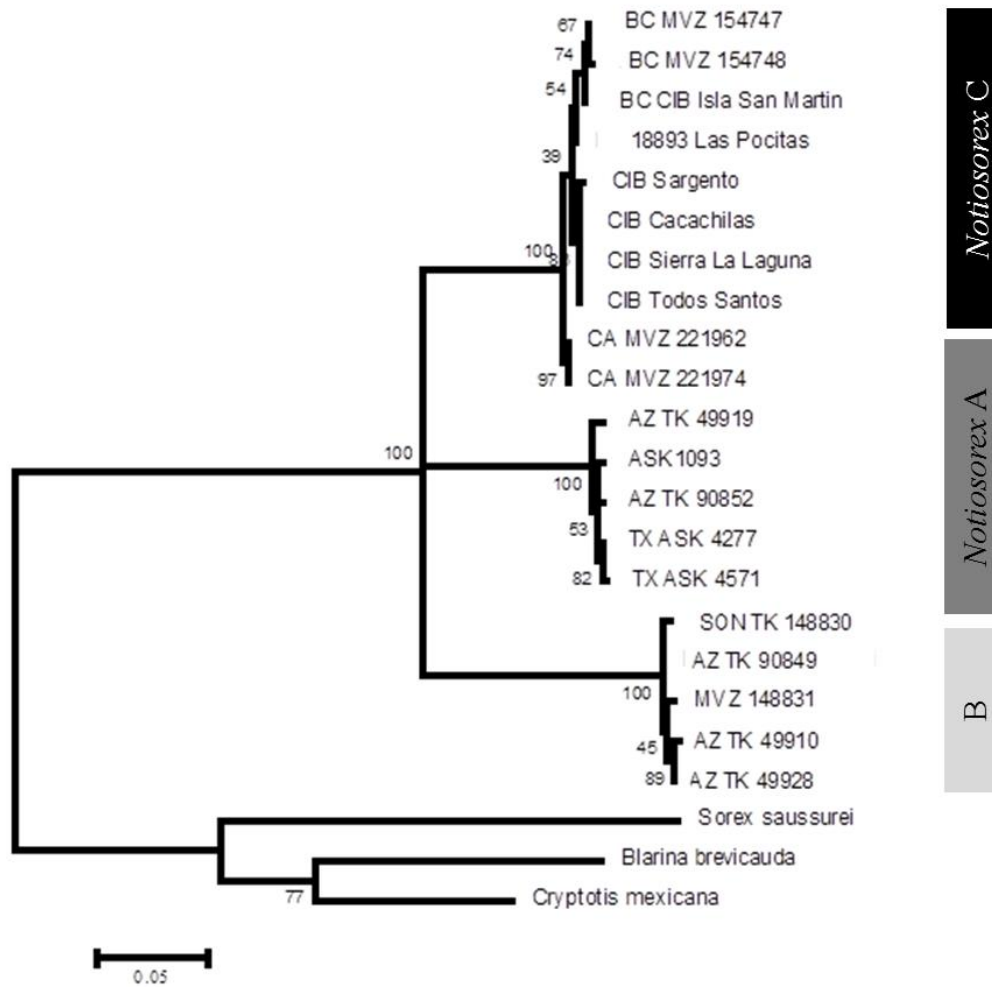


**Figura 5.** Árbol de MV e IB reconstruido utilizando el marcador molecular *Cyt b* (800 pb) y el modelo evolutivo GTR.

## 7.2 Relaciones filogenéticas a partir del gen mitocondrial COI

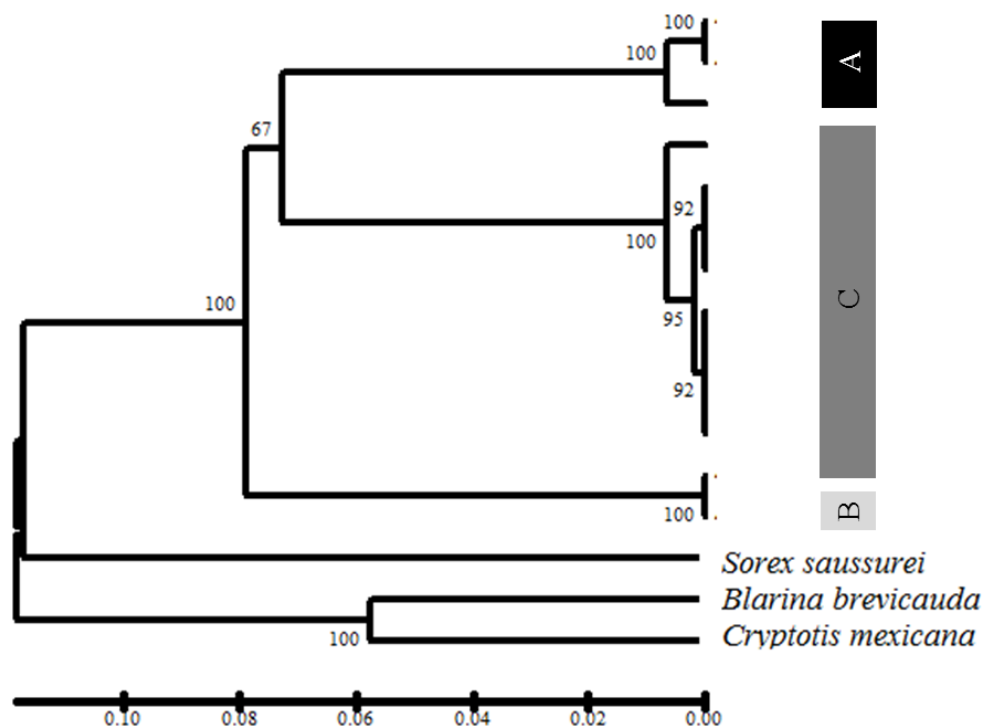
Se amplificaron 635 pb del gen mitocondrial *COI* y su composición de nucleótidos se encontró compuesta en un 33.3% timina, 25.1% citosina, 25.6% adenina y 16 % guanina. Los nucleótidos analizados de la subunidad 1 del gen citocromo oxidasa, se componen de 178 sitios parsimoniosamente informativos, 217 sitios variables, 41 sitios conservados y 39 sitios únicos entre las secuencias de sorícidos analizadas.

A partir de 653 nucleótidos se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA y se construyó un árbol con una longitud de rama = 0.5772. En este árbol las musarañas desérticas del género *Notiosorex* se agruparon en tres clados, en el primer clado se agrupó a los individuos de *N. crawfordi* (Fig. 6). El segundo clado (B) se encuentra formado por musarañas del desierto sonoreense soportado por un valor de bootstrap de 67 con respecto a *N. crawfordi*. El tercer clado californiano (C) agrupa a las musarañas desérticas en tres subclados a lo largo de la PBC y entre cada filogrupo el valor de soporte bootstrap fue de 100, lo cual indica una alta probabilidad de que estos sean clados verdaderos (Fig. 7).



**Figura 6.** Árbol reconstruido a partir del agrupamiento MV e IB el gen mitocondrial COI (650pb). Los valores posteriores de las ramas son el producto 10,000 repeticiones de Bootstrap.





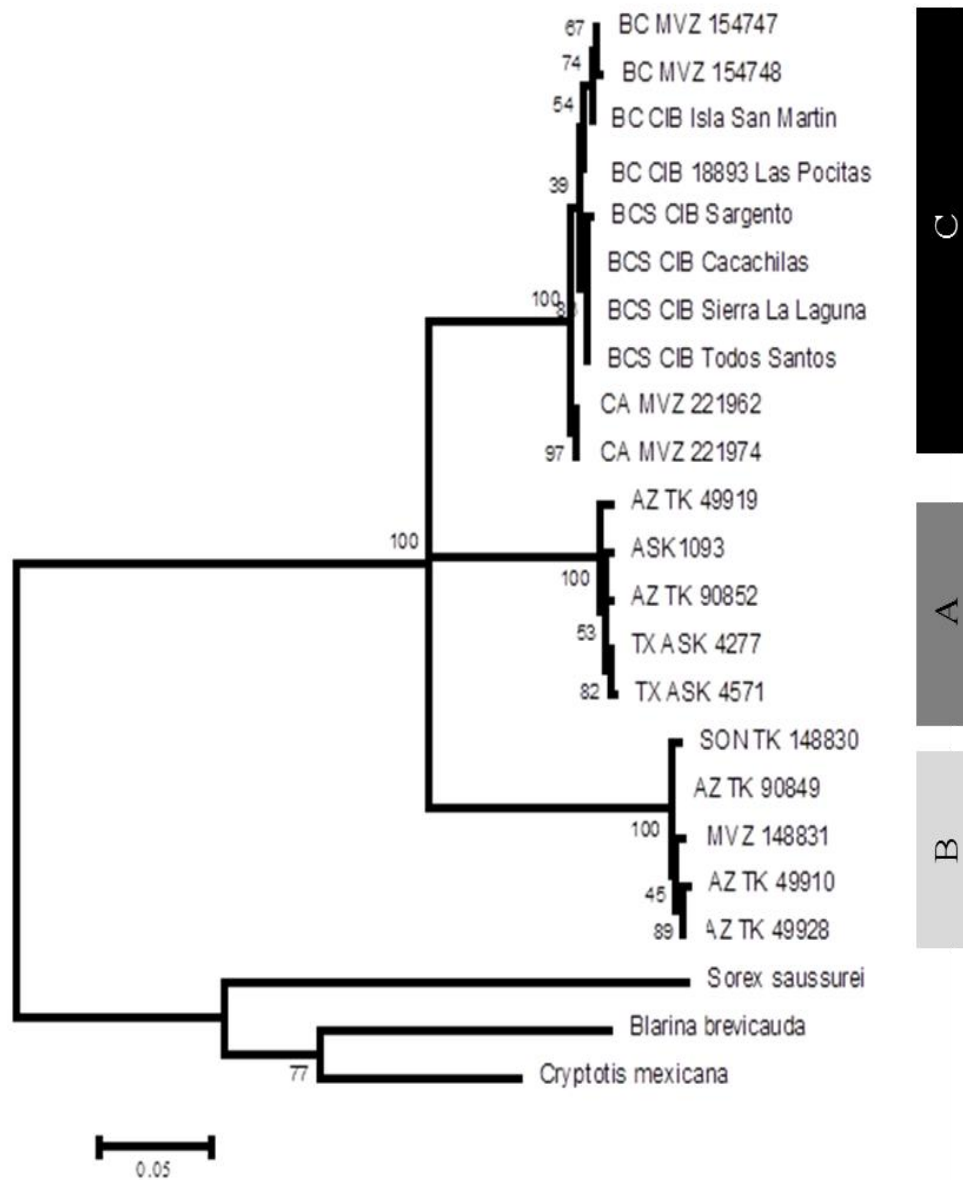
**Figura 7.** Dendrograma de agrupamiento UPGMA construido a partir de distancias genéticas del gen COI (653 pb).

### 7.3 Análisis de las relaciones filogenéticas a partir del gen mitocondrial COIII

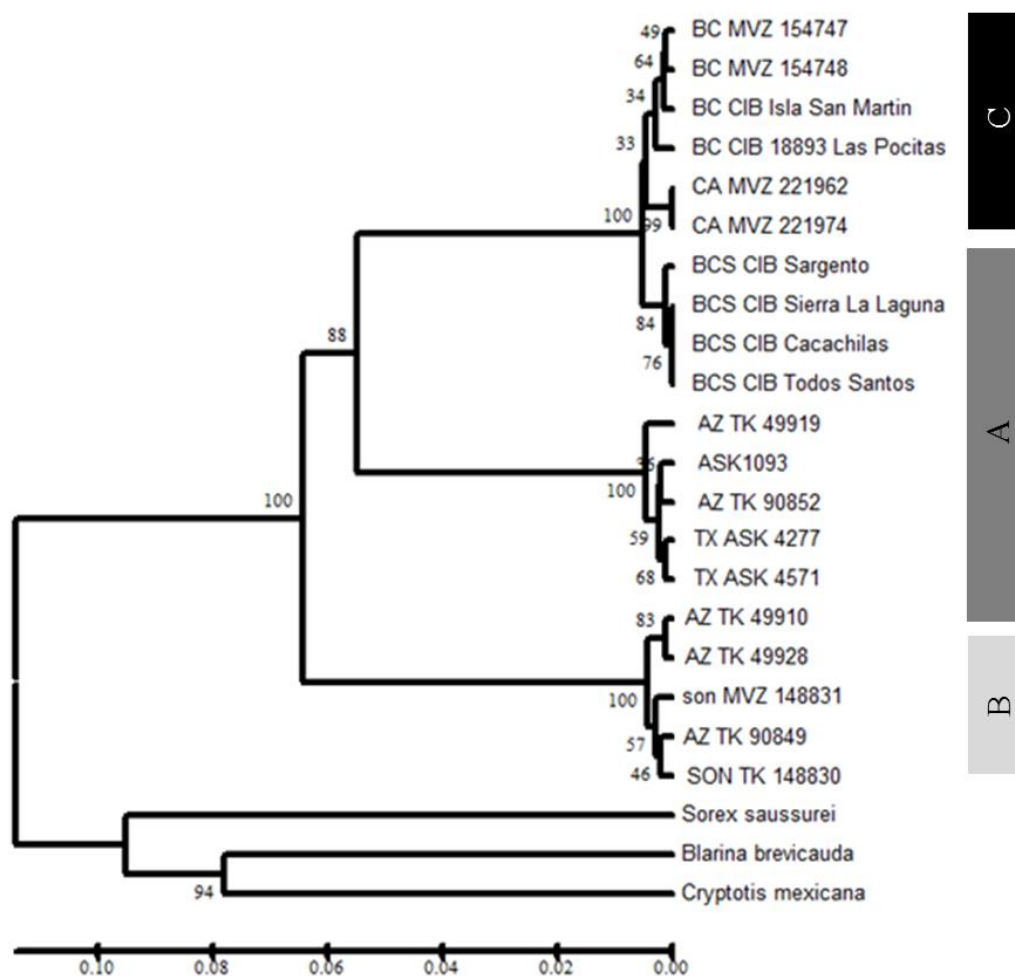
Se amplificaron 694 pb del gen mitocondrial COI y su composición de nucleótidos se encontró compuesta en un 29.2% timina, 14.3.1% a citosina, 33% adenina y 23.6 % guanina. Los nucleótidos analizados de la subunidad 1 del gen citocromo oxidasa subunidad 3, se componen de 186 sitios parsimoniosamente informativos, 248 sitios variables, 446 sitios conservados y 62 sitios únicos entre las secuencias analizadas.

Se realizó un análisis de cluster UPGMA con 694 nucleótidos y se construyó un árbol con una longitud de rama = 0.5613 donde las musarañas del genero *Notiosorex* se agrupan en dos clados. El primer clado contiene a individuos de *Notiosorex* de la PBC y *N. crawfordi* del lado Oeste al Río Colorado, este árbol se encuentra soportado por un 67% de bootstrap (Fig. 8). El segundo clado contiene a los individuos de *Notiosorex* del desierto Sonorense (Fig. 9). Las distancias

genéticas entre *N. crawfordi* y el filogrupo californiano son de 15.32% utilizando el modelo de sustitución K2P, y 15.46% utilizando el modelo JC. Dentro del filogrupo californiano las distancias genéticas entre las poblaciones analizadas son de 0.33% a 2.1%.



**Figura 8.** Árbol reconstruido a partir de MV e IB utilizando el gen mitocondrial COIII (653) y el modelo GTR.



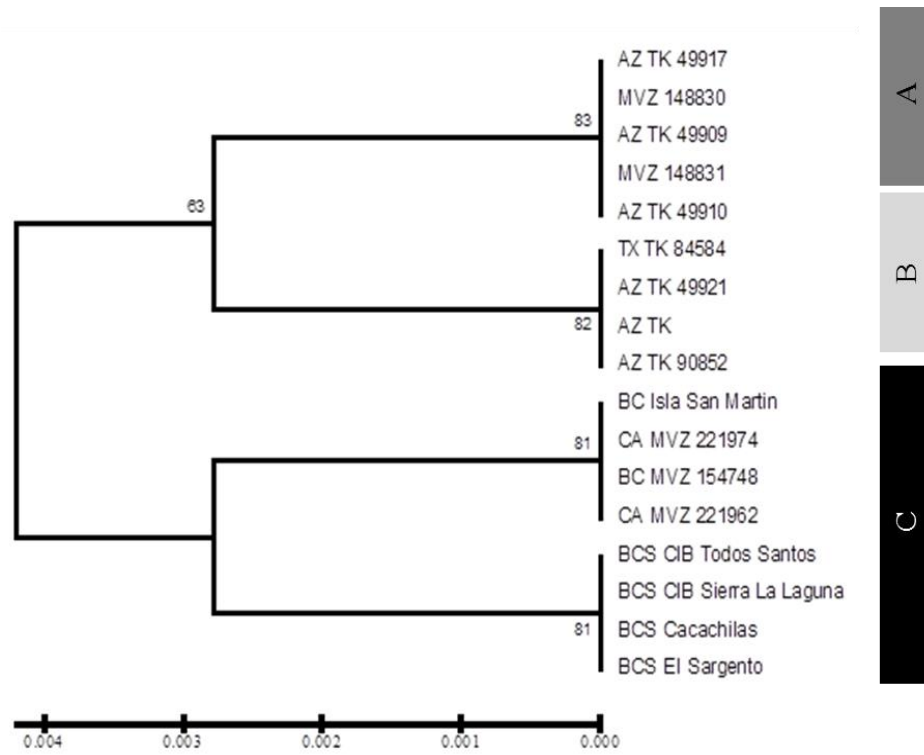
**Figura 9.** Cladograma de agrupamiento utilizando el método UPGMA del gen mitocondrial COIII (653 pb).

#### 7.4 Reconstrucción filogenética realizada a partir del intrón 7 del gen nuclear beta fibrinógeno.

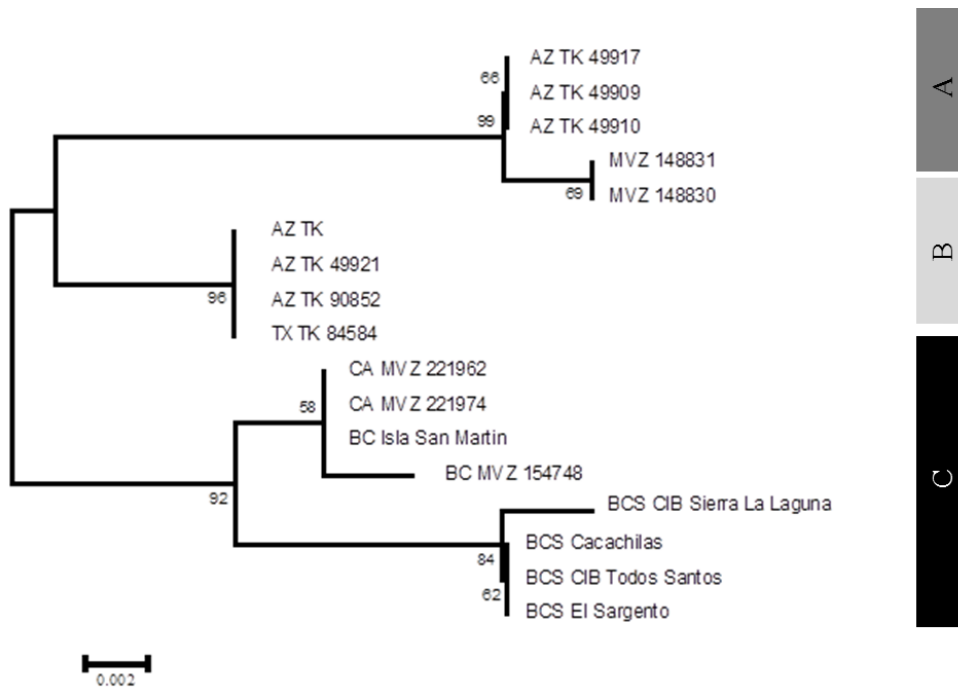
Se amplificaron 363 pb del intrón 7 del gen beta fibrinógeno FGB17 y su composición de nucleótidos se encontró compuesta en un 31.4% por timina, citosina 19%, adenina 30.5% y guanina 19%. Los nucleótidos analizados del gen FGB17, se componen de 16 sitios parsimoniosamente informativos, 24 sitios variables, 349 sitios conservados y 22 sitios únicos entre las secuencias analizadas.

Se realizó un análisis cluster UPGMA con 363 nucleótidos y se construyó un árbol con una longitud de rama = 0.04663 donde las musarañas del género *Notiosorex* se agrupan en dos clados. El primer clado contiene a individuos de *N. crawfordi* lado este y *N. cockrumi*, este árbol se encuentra soportado por un 63% de bootstrap. El segundo clado contiene a los individuos del filogrupo de California, donde estos se agrupan en dos subclados, clado norte representado por individuos de poblaciones de California y Baja California y clado sur por individuos de Baja California Sur (Fig. 8). Las distancias genéticas entre *N. crawfordi* y el filogrupo californiano son de 2.32% utilizando el modelo de sustitución K2P, y 2.46% utilizando el modelo JC. Dentro del filogrupo californiano las distancias genéticas entre las poblaciones analizadas son de 0.3% a 2.1% (Fig. 10).

La topología resultante del análisis Bayesiano y MV fue similar aunque los valores de soporte de nodos son diferentes, la topología mantiene la misma configuración del análisis de UPGMA donde se observa al filogrupo californiano en dos subclados. El primer clado representado por musarañas desérticas de California y Baja California, incluyendo a la población de la isla San Martín, este clado se encuentra soportado por 92%, el clado *N. cockrumi* por un 96% y el clado *N. crawfordi* lado este por un 99% entre los individuos analizados (Fig. 11).



**Figura 10.** Análisis de UPGMA producto un intrón del gen nuclear FGB17.

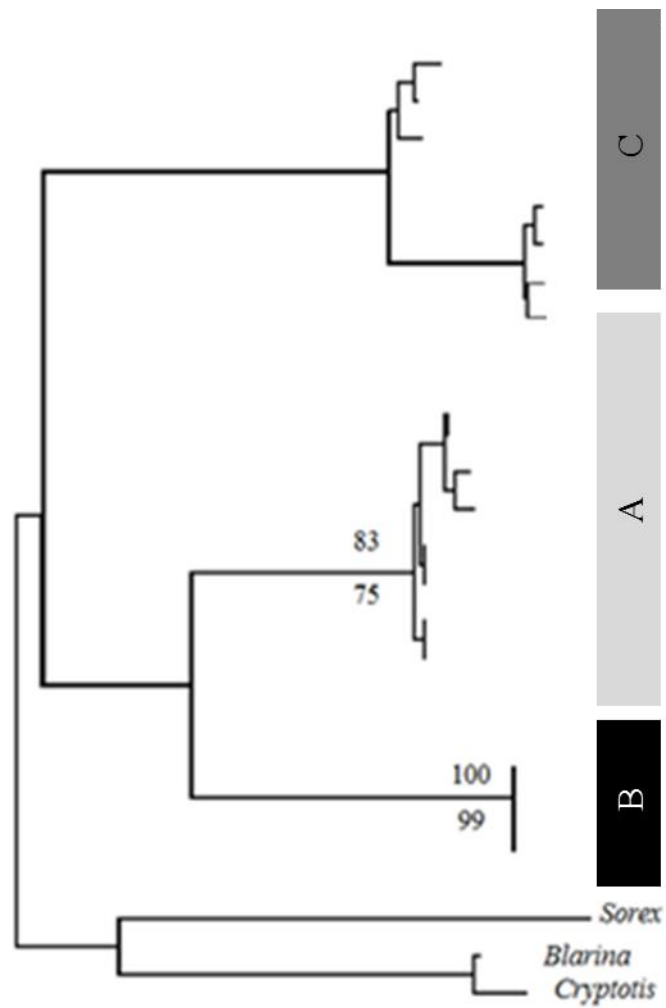


**Figura 11.** Árbol filogenético reconstruido a partir IB y MV de sorcidos de la PBC.

## 7.5 Reconstrucción filogenética realizada del conjunto de genes concatenados

Se identificaron tres grupos (Fig. 12). El primer clado agrupa a las muestras de *Notiosorex* del Altiplano Norte (AN). En el segundo los del desierto Sonorense (DS) y en el tercer clado los de la Península de Baja California (PBC). Los valores de *bootstrap* son mayores al 90%. El análisis de máxima verosimilitud utilizando el modelo TrN + G (Tamura y Nei, 1993) arrojó un árbol con la misma topología a los anteriores. Los porcentajes de similitud usando el model K2P de los ejemplares de la Península de Baja California con los de *Notiosorex* del altiplano Norte fue entre 14.4 - 17.7%, con los del Desierto Sonorense de 14.2 - 15.8% y con los de *Megasorex gigas* de 19.3 - 20.4%. La variación dentro de la Península de Baja California es de 0.9 - 1.1% (Tabla II).





**Figura 12.** Árbol construido bajo el IB Y MV para musarañas de Norte América utilizando el modelo TrN + G (2 millones de generaciones y una frecuencia en el muestreo de 200 generaciones).



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Relaciones evolutivas entre las musarañas de Norteamérica

En los análisis de reconstrucción filogenética (NJ, MP, IB y MV) utilizando el gen mitocondrial *Cyt b* para la familia Soricidae en Norteamérica se encuentran en tres clados. Las distancias genéticas son altas (< 19%) entre las especies *Blarina brevicauda*, *Cryptotis mexicana*, *Megasorex gigas* y *Sorex saussurei* miembros de los cuatro géneros. La tribu Soricini es la más basal con respecto otros miembros de musarañas de la familia Soricidae, mientras que la tribu Blarinini se encuentra conformada por los géneros *Blarina* y *Cryptotis* con valores de soporte altos (< 87%) en los análisis realizados con ADN mitocondrial y nuclear. La posición filogenética de las tribus de la familia Soricidae en Norteamérica ha sido parcialmente resuelta (Odhachi *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios de la dispersión evolutiva de los sorícidos en México ha tenido un proceso lento, el género *Sorex* (Carraway, 2007) y *Cryptotis* ha tenido cambios en los últimos años (Carraway 2004; Guevara *et al.*, 2014).

Las musarañas mexicanas pertenecientes a la tribu Notiosoricini se encuentran formada por los géneros *Notiosorex* y *Megasorex*. Los cuales se mantienen como géneros diferenciados en la topología de los árboles (NJ, MP, IB y MV) reconstruidos a partir de ADN nuclear y mitocondrial. Los árboles filogenéticos reconstruidos a partir del gen mitocondrial *Cyt b* soportan una monofilia entre *Notiosorex* y *Megasorex*. Sin embargo, esta topología presenta valores bajos de Bootstrap < 50% entre ambos géneros. Los valores altos de soporte dentro de los clados no es un sinónimo de estabilidad (Goloboff *et al.*, 2003) y no siempre tiene que acercarse a la filogenia del árbol verdadero, pues todas son hipótesis de ancestría genética en donde es importante revisar un mayor número de características que sean consideradas ancestrales. Por ejemplo, las musarañas del Género *Megasorex* presentan una ausencia de pigmentación en los dientes, características que se han considerado como evolutivamente novedosas dentro de la familia Soricidae (Hibbard, 1950; Ducommun *et al.*, 1994).

Los géneros *Notiosorex* y *Megasorex* forman un grupo parafilético en todas las reconstrucciones filogenéticas realizadas a partir del gen mitocondrial *Cyt b*. Sin embargo, la alta diferenciación genética > 15% entre los géneros permite inferir que estos han evolucionado de manera separada. Características morfológicas sostienen la hipótesis de una evolución separada entre ambos géneros de la tribu Notiosoricini, diferenciados con las tres tribus con distribución en Norte América.

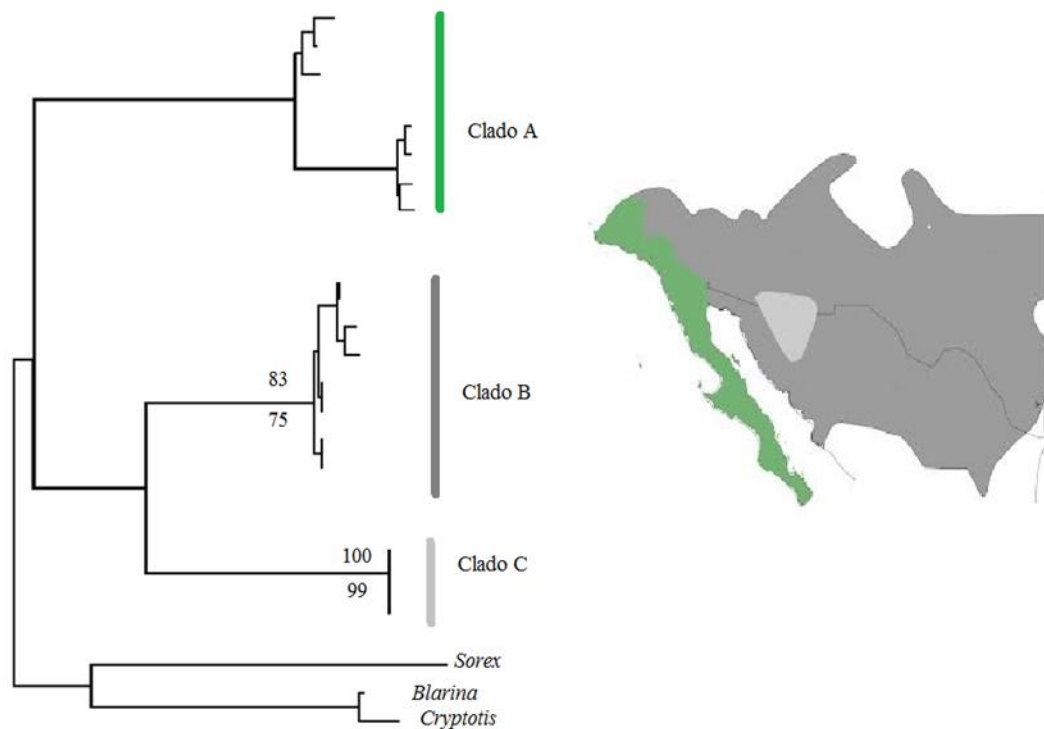
## 8.2 Sistemática de las musarañas del género *Notiosorex*

La especie *N. crawfordi* fue registrada en ocho localidades en la Península de Baja California y de la isla San Martín, estas muestras corresponden a provincias filogeográficas distintas dentro de la PBC, como lo son individuos de *Notiosorex* de la Sierra la Laguna, con una vegetación dominante de pino, y poblaciones en las planicies de Bahía Magdalena asociada a vegetación costera manglar. Aunque la distribución de *Notiosorex* en la PBC se considera continua (Armstrong y Jones, 1972; Hall, 1999; Carraway 2007).

El registro de las musarañas para la única población insular de *Notiosorex* ( $n = 5$ ) amplía el acervo de información sobre mamíferos en el Noroeste de México, aunque ya se encontraba evidencia de la presencia de *Notiosorex* en la isla San Martín (Schulz *et al.*, 1970). El único ejemplar registrado en 1968 colectado se encuentra depositado en el MVZ en Berkley, California (MVZ 136207) en malas condiciones, esto es debido a que este individuo fue colectado utilizando trampa de golpe, metodología tradicionalmente utilizada para muestrear roedores. Este individuo presenta cráneo destrozado, por lo tanto en este trabajo se presenta evidencia de piel, cráneo y secuencias de ADN que permiten validar la identidad taxonómica de esta población insular al noroeste de México.

El género *Notiosorex* forma tres filogrupos claramente diferenciados en todos los árboles realizados utilizando ADN nuclear y mitocondrial, un filogrupo diferenciado entre los individuos analizados se encuentra integrado por las

poblaciones de la Península de Baja California y California (Fig. 13). El presente estudio permitió encontrar dos clados diferenciados entre las poblaciones de *N. crawfordi* con diferenciación significativa, lo cual sugiere que las poblaciones se encuentran aisladas, por lo cual se considera importante el contrastar estos resultados con otros aspectos biológicos, ya que claramente se encuentran diferenciadas molecularmente.



**Figura 13.** Árbol construido bajo el método de inferencia bayesiana utilizando el modelo TrN + G (2 millones de generaciones y una frecuencia en el muestreo de 200 generaciones) y la hipótesis propuesta de la distribución de las musarañas del género *Notiosorex*.

Estos filogrupos en las poblaciones de *Notiosorex* indican que existen subdivisiones en la especie *N. crawfordi*, en función de su extensa área de distribución. Un resultado similar fue obtenido por McAliley *et al.* (2007). Los cuales utilizando marcadores moleculares de tipo mitocondrial y un intrón han

propuesto discontinuidades genéticas en el género *Notiosorex* a lo largo de su distribución en los desiertos cálidos de Norte América.

La especie *N. cockrumi* presentó una variación genética de 10.4% entre individuos de tres localidades analizadas de miembros en el desierto sonorense con respecto a las poblaciones de Arizona y Texas. El clado representado de *Notiosorex* de la península de Baja California presenta distancias genéticas menores al 3.4% a lo largo de la península, por lo tanto esta variación genética sirve como una hipótesis de especiación ocurrida en distintas poblaciones de la musaraña de desierto al oeste de su distribución.

### **8.3 El Río Colorado como una barrera de aislamiento filogeográfico**

La PBC es la segunda península más grande del mundo y alguna vez estuvo conectada a la costa oeste del continente en México y se separó por diferentes movimientos tectónicos entre las placas del Pacífico y la Norteamericana, migrando aproximadamente 300 kilómetros al noroeste en los últimos 4-5 millones de años a lo largo de la falla de San Andrés (Stock y Hodges, 1989).

El patrón de distribución del linaje californiano coincide con lo observado en otros mamíferos de otras especies, como el caso de la rata de monte *Neotoma varia* y *Neotoma bryanti* (Patton *et al.*, 2007). *Peromyscus eremicus* y *Peromyscus fraterculus*, *Chaetodipus baileyi* y *Chaetodipus ridinoris* (Riddle *et al.*, 2000). Este aislamiento genético también ha sido reportado entre poblaciones diferenciadas por el río Colorado en los ratones *Peromyscus maniculatus* (Kalvik, 2012) y *Reithrodontomys megalotis* (Nava-García, 2016). El Río Colorado pudo ser el motor de especiación mediante un aislamiento geográfico entre las musarañas del oeste, que ha favorecido la especiación en las poblaciones de *Notiosorex* en Baja California.

## 9. CONCLUSIONES

Los análisis de reconstrucción filogenética utilizados a partir de los genes *Cyt b*, *COI*, *COII* y *FGB17* agrupan a las musarañas del género *Notiosorex* y *Megasorex* dentro del mismo clado, correspondiente a la tribu Notiosoricini.

El género *Notiosorex* se encuentra formado por tres clados, *N. cockrumi* y *Notiosorex crawfordi* presenta dos filogrupos; el primero compuesto por individuos de la PBC y California, y el segundo por poblaciones de Arizona, Texas y Nuevo México.

Las distancias genéticas entre los dos filogrupos de *N. crawfordi* son superiores al 13%, porcentaje superior al reportado en otros mamíferos que han permitido proponer hipótesis de aislamiento genético y asignar un nivel específico.

Las poblaciones de *N. crawfordi* al Oeste del Río Colorado forman parte de un linaje genéticamente diferenciado que ha evolucionado producto del aislamiento geográfico. El Río Colorado ha sido un afluente de dispersión en el proceso evolutivo que ha favorecido el proceso de especiación entre las poblaciones de California y la Península de Baja California, por lo tanto se considera a este linaje como una nueva especie.

## 10. LITERATURA CITADA

- Alexander, L. F., B. R. Riddle. 2005. Phylogenetics of the New World rodent family Heteromyidae. *Journal of Mammalogy* 86:366–379.
- Álvarez-Castañeda, S.T., M.M. Correa-Ramírez, A.L. Trujano-Álvarez. 2006. Notes on *Notiosorex crawfordi* (Coues) from two oases in the Baja California peninsula, México. *Journal of Arid Environments*. 66:773-777.
- Álvarez-Castañeda, S.T., N. González-Ruiz, T. Álvarez. 2015. Guía para la identificación de los mamíferos de México en campo y laboratorio. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. y Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C., ISBN: 978-607-7634-15-7.
- Armstrong, D.M., J.K. Jones, Jr. 1972. *Notiosorex crawfordi*. *Mammalian Species* 17:1-5.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, NY.
- Davis, B. W. L. Joeris. 1945. Notes on the Life-history of the Little Short-tailed Shrew. *Journal of Mammalogy* 26.2 136–138.
- Baker, R. J., M. B. O'Neill, L. R. McAliley. 2003. A new species of desert shrew *Notiosorex* based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 222:1–12.
- Bradley, R. D., R. J. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82:969-973.
- Carraway, L. N., R. M. Timm. 2000. Revision of the extant taxa of the genus *Notiosorex* (Mammalia: Insectivora: Soricidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 113:302–318.
- Carraway, L. N. 2007. Shrews of Mexico. *Monographs of the Western North American Naturalist* 3:1–91.
- Carraway, L. N. 2010. Fossil history of *Notiosorex* (Soricomorpha: Soricidae) shrews with descriptions of new fossil species. *Western North American Naturalist* 70:144-163.
- Choate, J.R. 1970. Systematics and zoogeography of Middle American shrews of the genus *Cryptotis*. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*, 19:195–317.

- Chung-MacCoubrey, A., B. Heather, y D.M. Finch. 2009. Captures of Crawford's gray shrews (*Notiosorex crawfordi*) along the Rio Grande in central New Mexico. *Western North American Naturalist*. 69(2): 260-263.
- Churchfield, S. 1990. *The natural history of shrews*. London: A & C Black 178pp.
- Churchfield, S., B.I. Sheftel., N.V. Moraleva, y E. A. Shvarts. 1997. Habitat occurrence and prey distribution of a multi-species community of shrews in the Siberian taiga. *Journal of Zoology*, London 241: 55-71
- Coues, E. 1877. Precursory notes on American insectivorous mammals, with descriptions of new species. *Bulletin of the United States Geologic and Geographical Survey of the Territories* 3:631–653.
- Dubey, S., N. Salamin, S.D. Ohdachi, P. Barriere, Vogel. 2007. Molecular phylogenetics of shrews (Mammalia: Soricidae) reveal timing of transcontinental colonizations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 126–137.
- Ducommun, M.-A., Jeanmaire-Besançon, F., Y P. Vogel. 1994. Shield morphology of curly overhair in 22 genera of Soricidae (Insectivora, Mammalia). *Revue Suisse de Zoologie* 101:623–643.
- Ellerman, J., T. Morrison-Scott. 1951. *Checklist of Palaearctic and Indian Mammal*. British Musseum (Natural History). 1758-1946.
- Feldhamer, G.A., L.C. Drickamer, S.H. Vessey, J.F. Merritt, 1999. *Mammalogy: adaptation, diversity, and ecology*. New York: McGraw-H
- Findley, J. S. 1969. *Biogeography of southwestern boreal and desert mammals*. University of Kansas Miscellaneous Publications of the Museum of Natural History 51:113-128.
- Freeland, J. 2005. The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography* 32:11 2039–2040.
- Goloboff, P., J. Farris, M. Kallersjo, B. Oxelmann, M. Ramírez, C. Szumik. 2003. Improvements to resampling measures of group support. *Cladistics* 19, 324–332.
- Guevara, L., V. Sánchez-Cordero, L. León-Paniagua, y N. Woodman. 2014. A new species of small-eared shrew (Mammalia, Eulipotyphla, *Cryptotis*) from the Lacandona rainforest, México. *Journal of Mammalogy* 95:739-753.
- Hamilton, W.J. 1930. The food of the Soricidae. *Journal of Mammalogy* 11:26–39.
- Hanski, I., Kaikusalo, A. 1989. Distribution and habitat selection of shrews in Finland. *Annales Zoologici Fennici*. Vol. 23 No. 4 3339-348.

- Hausser, J., L. Fumagalli, Y. P. Taberlet. 1998. Mitochondrial DNA evolution in shrews. Pages 295–308 in J.M. Wójcik and M. Wolsan, editors, Evolution of shrews. Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża.
- Harris, H. A. 1998. Fossil history of shrews in North America. Pages 133–156 in J.M. Wójcik and M. Wolsan, editors, Evolution of shrews. Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, Poland
- He, K., J. Y. Li, M. C. Brandley, L. K. Lin, Y. X. Wang, Y. P. Zhang., X. L. Jiang. 2010. A multi-locus phylogeny of Nectogalini shrews and influences of the paleoclimate on speciation and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56:734-46.
- Hibbard, C. W. 1950. Mammals of the Rexroad formation from Fox Canyon, Meade County Kansas. *Contrib. Mus. Paleo., Univ. Michigan* 8:113-192.
- Hoffmeister, D.F. 1977. Noteworthy range extensions of mammals in northern Mexico and Arizona. *Southwestern Naturalist* 22:150–151.
- Hubbard, J. P. 1973. Avian evolution in the aridlands of North America. *Living Bird* 12:155-196.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetics trees. *Bioinformatics Application Notes* 17:754–755.
- Hutterer, R. 2005. Order Soricomorpha. en *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, editores.). 3ra edición. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland Pp. 220–311.
- Ivanova Nv, S.T Zemplak, R.H. Hanner, P.D.M. Hebert. 2007. Universal primer cocktail for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 7: 544-548.
- Jackson H. H. T. 1928. A taxonomic review of the American longtailed shrews (genera *Sorex* and *Microsorex*). *North American Fauna* 51:1–218
- Jones, J. K. Jr. 1966. Recent records of the shrew *Megasorex gigas* (Merriam), from western Mexico. *American Midland Naturalist* 75:249–250.
- Jones, J. K. Jr., T. Álvarez, M.R. Lee. 1962. Noteworthy mammals from Sinaloa, Mexico. University of Kansas Publications, Museum of Natural History 14:145–159.
- Jukes T.H, C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.



- Kalkvik, H., I. J. Stout, Terry J. Doonan, C. L. Parkinson. 2012. Investigating niche and lineage diversification in widely distributed taxa: phylogeography and ecological niche modeling of the *Peromyscus maniculatus* species group. *Ecography*. Vol. 25(1) 54-64.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Manning, R. W., M. R. Heaney, M. Sagot, R. J. Baker 2014. Noteworthy record of Crawford's desert shrew (*Notiosorex crawfordi*) from southern Nevada. *The Southwestern Naturalist* 59(1):145-147.
- McAliley, L. R., M. B. O'Neill, R. J. Baker. 2007. Molecular evidence for genetic subdivisions in the desert shrew, *Notiosorex crawfordi*. *Southwestern Naturalist* 52:410–417.
- McKenna, M.C., S.K. Bell. 1997. Classification of mammals above the species level. Columbia University Press, New York.: i-xii, 1-631.
- Maldonado, J.E. 1999. Family Soricidae. Páginas 39–52 en S.T. Álvarez-Castañeda and J.L. Patton, editores, Mamíferos del noroeste de México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Maldonado, J.E., C. Vilá, R.K. Wayne. 2001. Tripartite genetic subdivisions in the ornate shrew (*Sorex ornatus*). *Molecular Ecology* 10:127–147.
- Merriam, C.H. 1897. Descriptions of five new shrews from México, Guatemala and Colombia. *Proc. Biol. Soc. Washington* 11:227-230
- Merriam, C.H. 1890. Annotated list of mammals of the San Francisco Mountain plateau and desert of the Little Colorado in Arizona, with notes on their vertical distribution, and descriptions of new species. *North American Fauna* 3:43–86.
- Nava-García E., J.A. Guerrero-Enriquez, E. Arellano. 2016. Molecular phylogeography of Harvest Mice (*Reithrodontomys megalotis*) based on Cytochrome *b* DNA Sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 91 18:5.
- Ohdachi, S. D., M. Hasegawa, M. A. Iwasa, P. Vogel, T. Oshida, L.-K. Lin, Y. Abe. 2006. Molecular phylogenetics of soricid shrews (Mammalia) based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences: with special reference to the Soricinae. *Journal of Zoology* 270:177–191.
- Patton J. L., D. G. Huckaby, S. T. Álvarez-Castañeda. 2007. The evolutionary history and a systematic revision of wood rats of the *Neotoma lepida* group. *University of California Publications* 135:1–411.

- Posada D., K. A. Crandall. 1998. jModelTest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817-818.
- Rannala, B., Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43:304-311.
- Rambaut A. 2009. FigTree v1.2.3. Institute of Evolutionary Biology, Univ. of Edinburgh. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Reid, F. A. 1997. A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico. Oxford University Press. New York.
- Repenning, C. 1967. Subfamilies and genera of the Soricidae. Classification, historical zoogeography, and temporal correlation of the shrews. Geological Survey Professional Paper. 565:1-74.
- Reumer, J. 1998. Classification of the fossil and recent shrews. En: Wójcik, J. y M. Wolsan (eds). *Evolution of Shrews*. Mammal Research Institute. Polish Academy of Sciences. Białowieża. 5-22.
- Sambrook, J., D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ra edición. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schulz, T.A., F.J. Radovsky, P.D. Budwiser. 1970. First insular record of *Notiosorex crawfordi*, with notes on other mammals of San Martin Island, Baja California, Mexico. *Journal of Mammalogy* 51:148–150.
- Sikes R. S., W. H. Gannon, the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92:235–253.
- Smith, M. F., J. L. Patton. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of Sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *J. Mammalogy Evolution* 6(2): 89-128.
- Stock, J. M., K. V. Hodges. 1989, Pre-Pliocene Extension around the Gulf of California and the transfer of Baja California to the Pacific Plate: *Tectonics*. 8(1) 99-115.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, K., M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

- Tamura K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. 2006. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Vaughan, T.A., Ryan, J.M. y Czaplewski, N.J. 2000. *Mammalogy*. 4th edn. Saunders Orlando, FL: College Publishing. 565 pp.
- Yensen, E., Clark, W. H. 1986. Records of desert shrew (*Notiosorex crawfordi*) from Baja California, Mexico. *Southwestern Naturalist* 31, 530–531.
- Wickliffe, J. K., F. G. Hoffmann, D. S. Carroll, Y. V. Dunina-Barkovskaya, R. D. Bradley, R. J. Baker. 2003. Intron 7 (FGB): a nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occasional Papers, Museum Texas Tech University* 219:1–6.
- Wilson, D. E, D. M. Reeder. 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3ra edición), Johns Hopkins University Press, 2,142 pp.
- Wright, S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. *Evolution* 36:427–443.