



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868
(Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando
múltiples líneas de evidencia.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en B. MARIA AGUSTINA GUTIERREZ COSTA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO XAVIER GONZALEZ COZATL

Cuernavaca, Morelos.

Noviembre 2021.

A mi madre,

A mi hija.

Índice

Lista de figuras	i
Lista de tablas	iii
Capítulo 1. Introducción General	1
1.1. “¿Qué es una especie?”	1
1.2. Diversidad críptica a nivel de especie, ¿Cómo se ha evaluado?.....	5
1.3. El caso de <i>Heteromys irroratus</i>	6
1.3.1. Subfamilia Heteromyinae	6
1.3.2. Género <i>Heteromys</i>	7
1.3.3. <i>Heteromys irroratus</i>	8
1.3.3.1. <i>Heteromys irroratus irroratus</i> (Gray, 1868).....	9
1.3.3.2. <i>Heteromys irroratus alleni</i> (Coues, 1881)	10
1.3.3.3. <i>Heteromys irroratus bulleri</i> (Thomas, 1893).....	10
1.3.3.4. <i>Heteromys irroratus texensis</i> (Merriam, 1902).....	10
1.3.3.5. <i>Heteromys irroratus torridus</i> (Merriam, 1902).....	11
1.3.3.6. <i>Heteromys irroratus jaliscensis</i> (Allen, 1906).....	11
1.3.3.7. <i>Heteromys irroratus guerrerensis</i> (Goldman, 1911).....	12
1.4. Métodos empleados para resolver conflictos taxonómicos	13
1.4.1. Métodos moleculares	14
1.4.2. Morfometría geométrica	16
1.4.3. Modelado de Nicho	19
1.5. Hipótesis.....	21
1.6. Objetivo general	21
1.6.1. Objetivos particulares	21
1.7. Literatura Citada.....	23
Capítulo 2a. Molecular data suggest that <i>Heteromys irroratus bulleri</i> should be recognized as a species-level taxon	33
Abstract.....	35
Resumen.....	35
Introduction.....	36
Material and methods	36
Results.....	37
Discussion	39
Acknowledgments.....	42
Literature cited	42
Appendix 1	43

Capítulo 2b. Molecular data confirms multiple cryptic species within <i>Heteromys irroratus</i> Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae).....	44
INTRODUCTION.....	46
MATERIALS AND METHODS	47
<i>Sampling and processing</i>	47
<i>Cytochrome b phylogenetic analyses</i>	49
<i>Divergence time estimation</i>	50
<i>Single locus species delimitation</i>	51
RESULTS.....	52
<i>Phylogenetic reconstruction using Cytochrome b</i>	52
<i>Divergence time estimation</i>	53
<i>Species delimitation</i>	53
DISCUSSION.....	55
<i>Phylogenetic patterns within the H. irroratus group</i>	55
<i>Heteromys irroratus species delimitations</i>	56
LITERATURE CITED	63
APPENDICES	75
Capítulo 3. Implementation of geometric morphometrics methods in the delimitation of putative species within <i>Heteromys irroratus</i> group Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae).	82
3.1. Introduction.....	84
3.2. Materials and methods.....	85
3.2.1. Sampling	85
3.2.2. Digitalizations of images and configurations.....	86
3.2.3. Statistical analysis	87
3.3. Results.....	89
3.4. Discussion	91
Literatura cited	99
Tables.....	101
Figures	102
Supplementary data 1.	110
Supplementary data 2.	125
Capítulo 4: Propuesta de descripción de especies reconocidas dentro de <i>Heteromys irroratus</i> group Gray 1868 sensu lato.....	126
<i>Heteromys alleni</i> (Coues, 1881).....	126
<i>Heteromys jaliscensis</i> (Allen, 1906).....	128
<i>Heteromys texensis</i> (Merriam, 1902).....	130
<i>Heteromys pretiosus</i> (Goldman, 1911).....	131
<i>Heteromys irroratus</i> (Gray, 1868).....	132

<i>Heteromys acutus</i> (Hall and Villa-R, 1948)	133
<i>Heteromys bulleri</i> (Thomas, 1893).....	133
Literatura citada	135

Lista de figuras

Figura 1. 1. Distribución geográfica de las subespecies de *Heteromys irroratus* sensu lato (modificado de Genoways, 1973)-----9

Figure 2a. 1. Map illustrating collecting records of *Heteromys irroratus bulleri* (dots) and *H. i. jaliscensis* (squares). 1- La Laguna, Sierra de Juanacatlán (*H. i. bulleri* type locality), 2- Soyatlán del Oro (Genoways 1973), 3- Sierra de Manantlán Biosphere Reserve (current study), 4- Vicinity of Ameca (molecular data from specimens collected at this locality are included in current study as *H. i. jaliscensis*), 5- Las Canoas (*H. i. jaliscensis* type locality)----- 35

Figure 2a. 2. Box plots of female measurements of individuals of *H. i. bulleri* from Sierra de Manantlán (*bulleri* SM), *H. i. bulleri* from Sierra de Juanacatlán (*bulleri* SJ), *H. i. bulleri* from Genoways (1973) (*bulleri* G), and *H. i. jaliscensis* from Genoways (1973) (*jaliscensis*). Median (small squares), 25%-75% confidence interval (rectangles), and minimum and maximum values (whiskers)-----38

Figure 2a. 3. Box plots of male measurements of individuals of *H. i. bulleri* from Sierra de Manantlán (*bulleri* SM) and *H. i. jaliscensis* from Genoways (1973) (*jaliscensis*). Median (small squares), 25%-75% confidence interval (rectangles), and minimum and maximum values (whiskers)-----39

Figure 2a. 4. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* sequences based on 786 bp of the Cytochrome *b* gene (lnL = -3357.567). Posterior probability estimates are shown above branches and bootstrap values are below branches-----40

Figure 2b. 1. Map of localities of *Heteromys irroratus* samples (black circles) used for the phylogenetics analysis. *H. pictus*, black squares. Localities information is provided in Appendix 1. Red stars represent type localities: A = *Heteromys canus*; B = *H. i. bulleri*; C = *H. i. jaliscensis*; D = *H. i. texensis*; E = *H. i. alleni*; F = *H. i. pretiosus*; G = *H. i. acutus*; H = *H. pullus*; I = *H. i. guerrerensis*; J = *H. i. torridus*; and K = *H. i. irroratus*. Continuous line delimited *H. irroratus* distribution proposed by la UICN-----70

Figure 2b. 2. Bayesian inference phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome *b* gene. Posterior probability values are showed above branches-----71

Figure 2b. 3. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome *b* gene (lnL = -7708.002). Ultrafast bootstrap values are showed above branches-----72

Figure 2b. 4. Ultrametric tree of Cytochrome *b* gene, using Birth Death model and Relaxed Molecular Clock with lognormal distribution. Branches levels indicate divergence times estimates in Ma, (*) means (0.32, 0.92) Ma and (**) means (0.26, 0.81) Ma. Vertical black bars represent candidate species identified by the alternative species delimitation methods: mPTP = Multi-rate Poisson tree processes; bPTP = bayesian version of Poisson tree processes; GMYC = General mixed Yule coalescent model; bGMYC = bayesian version of General mixed Yule coalescent model ; and GD = Kimura-2-parameters model Genetic Distances in the context of the Genetic Species Concept-----73

Figure 3. 1. Sampling map of specimens photographed for geometric morphometrics analysis, numbers correspond with Supplementary data 1. Continuous line delimits

distribution of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973) proposed by UICN (2016)-
-----102

Figure 3. 2. A, Landmarks and semilandmarks configuration in the ventral view of the skull in red and blue, respectively. Numbers correspond to: 1, Base of incisors; 2, Anterior end of the incisive foramen; 3, Incisive foramen width; 4, Posterior end of incisive foramen; 5, Posterior palatine margin; 6, Basisphenoids; 7, Anterior end of foramen magnum; 8, Posterior end of foramen magnum; 9, Upper border of foramen magnum; 10, Basisoccipital overhang; 11, Tympanic bull; 12, Union of the zygomatic process and zygomatic arch; 13, Posterior end of molar foramen; 14, Union between the 2nd molar and the 3rd molar; 15, Union between the 1st molar and the 2nd molar; 16, Union between the premolars and the 1st molar; 17, Anterior end of the molar foramen and 18, Inner border of the zygomatic arch. B, Landmarks and semilandmarks configuration in the ventral view of the skull in red and blue, respectively. Numbers correspond to: 1, Anterior end of the rostrum between the nasals; 2, Anterior point of the zygomatic arch in the maxillary region; 3, Posterior margin of nasal bones; 4, Posterior margin junction between nasal and premaxillary bones; 5, Posterior margin of premaxillary bones; 6, Bregma (anterior end of sagittal suture); 7, Lambda (posterior end of sagittal suture); 8, Posterior margin of interparietal bone; 9, Left asterion (union of the squamous and lamboid sutures); 10, Most posterior point of the skull; 11, Outer point of the exoccipital region; 12, Posterior point of the zygomatic arch; 13, Coronary and squamous suture junction and 14, Anterior border of the zygomatic arch-----103

Figure 3. 3. Multivariate regression of shape with respect to centroid size for the different forms of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973), for ventral (A) and dorsal (B) view of the skull-----105

Figure 3. 4. Canonical Variables Analysis for dorsal view of skull (A) and ventral (B) of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973). Deformation grids using *H. irroratus* as target group (C-N), landmarks numbering for both skull views in first grids, also semilandmarks for rostrum and zygomatic process in maxilla are listed (a-g). PW : Parietal width, ZW : Zygomatic process width and MW : Mastoid width-----107

Figure 3. 5. Dendrogram of phenetic relationships between groups of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973) using Mahalanobis distances for both views of skull, A : Dorsal and B : Ventral-----109

Figure 4. 1. Distribución geográfica de las distintas especies reconocidas dentro del grupo *Heteromys irroratus* sensu lato-----129

Lista de tablas

Tabla 1. 1. Conceptos de especie contemporáneos tomados de (de Queiroz, 2007). Se muestran los conceptos y las propiedades sobre las que estos están basados, así como las referencias de los mismos. Las propiedades necesarias para la especie son representadas por un asterisco-----1

Table 2a. 1. External and cranial measurements (in mm) for specimens of *H. i. jaliscensis* and *H. i. bulleri*. When more than one individual was available, the range is shown for each variable. Mean values are in parentheses-----37

Table 2a. 2. Pairwise Kimura-2-parameter distances (below the diagonal) and p-distances (above the diagonal), between samples of *Heteromys irroratus* based on 786 bp of the Cytochrome *b* gene-----37

Table 2b. 1. Mean pairwise genetic distance values (in percentage) corrected with Kimura-2-parameters model between *Heteromys irroratus* haplogroups identified in the phylogenetics analyzes-----69

Table 3. 1. Procrustes Analysis of Variance (ANOVA) for the ventral and dorsal view of the skull of *Heteromys irroratus* group, based on the random permutation procedure of the residuals (RRPP), with 999 permutations-----101

Table 3. 2. Pairwise distances between mean shapes of *Heteromys irroratus* group for the ventral and dorsal views of the skull. RRPP with 1000 permutations and significance level 0.05. In bold are marked no significant comparisons-----101

Capítulo 1. Introducción General

1.1. “¿Qué es una especie?”

La pregunta “¿Qué es una especie?” permanece como la pregunta más crucial de las “siete mayores preguntas de la sistemática en biología” Cracraft (2002). Las especies son las unidades fundamentales en los estudios de evolución ecológica, biogeografía, filogenia y biología de la conservación. Mucho se conoce acerca de la teoría de conceptos de especie e inferencia filogenética (Frost y Kluge, 1994; Mayden, 1997; de Queiroz, 1998). Sin embargo, existe una gran controversia en los métodos utilizados para reconocerlas y delimitarlas (Mayr, 1982; Wiens, 1999; de Queiroz, 2005). Hasta hace algunos años, se habían propuesto 22 conceptos de especie (Mayden, 1997). Más recientemente, de Queiroz (2007) elaboró una síntesis de los conceptos de especie más defendidos por los biólogos contemporáneos (Tabla 1). Además, este autor plantea que muchos de estos conceptos de especies (y sus definiciones asociadas) son incompatibles entre ellos, ya que pueden llevar a conclusiones diferentes con respecto a los límites y números de especies reconocidas (de Queiroz, 2007).

Tabla 1. Conceptos de especie contemporáneos tomados de de Queiroz (2007). Se muestran los conceptos y las propiedades generales sobre las que estos están basados, así como las referencias de los mismos. Las propiedades necesarias para la especie son representadas por un asterisco.

Concepto de Especie	Propiedades	Referencias
Biológico	Reproducción (reproducción natural resultando en una descendencia fértil y viable)	Wright (1940); Mayr (1942); Dobzhansky (1950)
Aislamiento	*Aislamiento reproductivo intrínseco (ausencia de reproducción entre organismos heteroespecíficos basado en propiedades intrínsecas opuestas a las barreras geográficas extrínsecas)	Mayr (1942); Dobzhansky (1970)
Reconocimiento	*Comparten un sistema de reconocimiento específico o sistema de fertilización (mecanismos mediante los cuales organismos conespecíficos, o sus gametos, se reconocen unos a otros para sus apareamientos y fertilización)	Paterson (1985); Masters et al. (1987); Lambert y Spencer (1995)

Ecológico	*Mismo nicho o zona adaptativa (todos los componentes del ambiente con los cuales los organismos conespecíficos interactúan)	VanValen (1976); Andersson (1990)
Evolutivo	Único rol evolutivo, tendencias y destino histórico	Simpson (1951); Wiley (1978); Mayden (1997)
Cohesión	Cohesión fenotípica (intercambio genético o demográfico)	Templeton (1989, 1998)
Filogenético	Heterogéneo (ver las siguientes cuatro entradas)	ver las siguientes cuatro entradas
Hennigian	El ancestro se extingue cuando el linaje se divide	Hennig (1966); Ridley (1989); Meier y Willmann (2000)
Monofilético	*La monofilia consiste en un ancestro y todos sus descendientes, normalmente inferido porque comparten los estados derivados de un carácter	Rosen (1979); Donoghue (1985); Mishler (1985)
Genealógico	*Coalescencia exclusiva de los alelos (todos los alelos de un gen dado son descendientes de un alelo común ancestral y no se comparten con los alelos de otras especies)	Baum y Shaw (1995); Avise y Ball (1990)
Diagnosticable	*Diagnosticabilidad (cualitativa, diferencias fijadas)	Nelson y Platnick (1981); Cracraft (1983); Nixon y Wheeler (1990)
Fenético	*Forma un cluster fenético (diferencias cuantitativas)	Michener (1970); Sokal y Crovello (1970); Sneath y Sokal (1973)
Cluster genotípico	*Forma un cluster genotípico (déficit de intermediarios genéticos, heterocigotos)	Mallet (1995)

La razón de estas incompatibilidades tiene que ver con las diferentes propiedades biológicas sobre las cuales los diferentes conceptos están basados, por ejemplo, el aislamiento reproductivo en la versión de aislamiento del concepto biológico de especie, la ocupación de un nicho distinto o zona adaptativa en el caso del concepto ecológico de especie, y diferencias en un estado del carácter fijado en el caso de la versión diagnosticable del concepto filogenético de especies (Tabla 1). Sin embargo, estas diferencias en el énfasis son de esperar debido a las propiedades de interés de los diferentes grupos de biólogos. Por ejemplo, las incompatibilidades reproductivas son el centro de importancia de los biólogos que estudian zonas híbridas, las diferencias en los nichos son lo principal para los ecólogos, y la diagnosticabilidad y monofilia es fundamental para los sistemáticos. Por otro lado, varios autores han señalado que, al adoptar

conceptos más "rígidos", como el concepto biológico, se reconocen menos taxa que al considerar conceptos alternativos, como por ejemplo la versión diagnosticable del concepto filogenético de especie (e.g., Bremer y Wanntorp, 1979; Cracraft, 1983; Zink, 1996). Según de Queiroz (2007), todos los conceptos tienen sus méritos y todos están basados en importantes propiedades biológicas, por lo que sus usos dependerán del área de estudio de cada investigador.

Frost y Kluge (1994) y Mayden (1997) distinguieron entre conceptos de especies primarios y secundarios. Los conceptos primarios definen las entidades que se consideran especies (el concepto evolutivo de especie fue favorecido por estos autores), mientras que los conceptos secundarios son los métodos operacionales para descubrir estas entidades de acuerdo con el concepto primario. Los conceptos más aplicados para vertebrados según los sistématas son el concepto filogenético de especie y el genético de especie (Wheeler y Meier, 2000; Taylor et al., 2000; Nixon y Wheeler, 1990; de Queiroz, 2007; Bradley y Baker, 2001; Baker y Bradley, 2006). Bajo el concepto filogenético de especie, las especies se definen como el grupo más pequeño de organismos delimitados por una combinación única de estados de carácter, dentro del cual hay un patrón de ancestría y descendencia. Este concepto se basa en el criterio de monofilia, y tales grupos monofiléticos, se definen como los taxones o conjuntos de taxones que contienen a todos los descendientes conocidos de un mismo ancestro común. Un aspecto importante de este concepto es que los caracteres diagnósticos deben ser transmitidos de una generación a otra, para poder definir una comunidad reproductiva (Cracraft, 1983; 1992; Nixon y Wheeler, 1990).

El concepto genético de especie determina una medida de diferenciación genética que permite inferir aislamiento reproductivo e independencia evolutiva (Mayden, 1997). Particularmente, las secuencias de ADN mitocondrial de mamíferos han permitido aplicar el concepto genético de especie (Baker y Bradley, 2006). Bajo dicho concepto las distancias genéticas representan el grado de diferenciación entre las especies potenciales (Ferguson, 2002), ya que una especie se define como un grupo de poblaciones naturales que son genéticamente compatibles y que se encuentran genéticamente aisladas de otros grupos. Por lo tanto, los procesos de especiación se presentan cuando ha ocurrido una acumulación de cambios, causando el aislamiento genético (Baker y Bradley, 2006). Aunque este concepto ha sido muy criticado debido a que no se determina la magnitud de la variación genética necesaria para delimitar a las especies putativas (Ferguson, 2002), se ha sugerido que los resultados de su aplicación deben ser compatibles con metodologías de conceptos de especie más operativos como el concepto filogenético de especie

(Cracraft, 1992; Bradley y Baker, 2001; Ferguson, 2002). En los últimos 25 años, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación del ADN el concepto genético de especie ha sido empleado de forma recurrente para evaluar la biodiversidad de los mamíferos en diferentes niveles taxonómicos (Bradley y Baker, 2001; Baker y Bradley, 2006).

En un esfuerzo para conciliar muchas de las ideas desarrolladas históricamente para definir a las especies, de Queiroz (2007) propuso un Concepto Unificado de Especie en donde la existencia de una separación de linajes debe ser asumida como la única propiedad necesaria para reconocer especies. Las distintas propiedades postuladas por los conceptos propuestos con anterioridad, y que los linajes deben adquirir durante el proceso de divergencia (criterios de especie secundarios), pueden ser considerados como diferentes líneas de evidencia (criterios operativos) relevantes para evaluar la separación de los linajes.

En este sentido, el término linaje se refiere a la serie ancestro – descendientes de metapoblaciones, y no se debe confundir con el término clado o grupo monofilético. El término metapoblación se refiere a la población inclusiva que está formada por subpoblaciones conectadas. Los conceptos contemporáneos de especies comparten la visión de que todas las especies son segmentos (de linajes de metapoblaciones) evolucionando de manera independiente (de Queiroz, 1998).

En la actualidad la cuestión empírica de la delimitación de especies ha recibido una mayor atención y numerosos métodos modernos han sido propuestos para delimitar especies en un marco estadísticamente riguroso (Puerto et al., 2001; Templeton, 2001; Wiens y Servedio, 2000; Wiens y Penkrot, 2002). Los métodos no basados en árboles delimitan las especies teniendo en cuenta el flujo genético (Sites y Marshall, 2003), mientras que los métodos basados en árboles delimitan especies como linajes históricos (Baum y Donoghue, 1995; Goldstein y DeSalle, 2000; Wheeler y Meier, 2000). El Concepto Unificado de Especie permite a los investigadores poner a prueba los bordes de las especies desde diferentes perspectivas filosóficas, ya que la delimitación de especies requiere que se tenga bien definido el criterio operativo a través del cual los individuos serán asignados (Sites y Marshall, 2004).

En el presente estudio, considerando que las secuencias de ADN son datos genéticos y que son analizados bajo un argumento/enfoque filogenético, se adoptarán los argumentos que respaldan los conceptos filogenético (Cracraft, 1983; 1992) y genético (Bradley y Baker, 2001; Baker y

Bradley, 2006) de especie, para delimitar linajes a nivel de especies dentro de las poblaciones del grupo de estudio, el ratón espinoso mexicano *Heteromys irroratus* (Rodentia, Heteromyidae).

1.2. Diversidad críptica a nivel de especie, ¿Cómo se ha evaluado?

Las especies crípticas son aquellas que no pueden ser distinguidas morfológicamente entre ellas, pero que constituyen linajes evolutivos independientes (Egge y Simons, 2006; Struck et al., 2018) y que comúnmente representan casos de “especies hermanas” (Mayr, 1942; Sáez y Lozano, 2005; Bickford et al., 2006). Por lo general, la mayoría de las especies están descritas en base a caracteres morfológicos tradicionales, pero el proceso de especiación no siempre va acompañado de cambios morfológicos, por lo que el número de especies biológicas debe ser mayor que el conteo actual de especies nominales. Existen muchas razones por las que los cambios morfológicos no están relacionados con los límites de especies, como por ejemplo diferencias en las señales de apareamiento no visuales y / o estasis morfológica promovida por la selección (Bickford et al., 2006). Una de las hipótesis más comunes plantea que las especies crípticas son el resultado de procesos de especiación recientes, y por tanto los rasgos morfológicos y otras características diagnosticables aún no son evidentes, aunque esto no aplica en todos los casos (Bickford et al., 2006).

Históricamente, los datos morfológicos obtenidos de ejemplares albergados en los museos/colecciones científicas, han sido la fuente primaria de caracteres usados para diferenciar nuevos taxones. Los materiales de los museos son esenciales, pero en ocasiones no muestran características importantes encontradas en los complejos de especies crípticas. Estos rasgos son encontrados al examinar individuos vivos o usando métodos útiles en la identificación de linajes evolutivos, por ejemplo, datos moleculares entre otros (Butler y Mayden, 2003). El descubrimiento, la descripción y nombrar a las especies crípticas son un paso importante en el reconocimiento de la diversidad biológica, y a menudo requieren más datos y esfuerzo, que para el caso de describir nuevas especies morfológicamente distintas (Egge y Simons, 2006). La identificación de nuevos taxones requiere recopilar toda la información posible, ya sea genética, morfológica, conductual, ecológica, o combinaciones de todas estas para realizar una descripción formal de la especie (Butler y Mayden, 2003). La frecuencia con que las especies crípticas son descubiertas con base en datos de secuencia de ADN (y a menudo confirmadas posteriormente con datos morfológicos y/o ecológicos), sugieren que los datos moleculares deben ser incluidos en los estudios taxonómicos como una

cuestión de rutina y, deben ser preservados para análisis moleculares posteriores (Bickford et al., 2006). Con el acceso a nuevas tecnologías que permiten examinar la variación biológica y el avance de las bases teóricas de la teoría de la sistemática y la biología evolutiva, cada vez son más las especies crípticas descubiertas y descritas (Butler y Mayden, 2003). Particularmente, la secuenciación de ADN, relativamente rápida y barata, ha permitido detectar diferencias entre especies morfológicamente similares (Bickford et al., 2006).

En el caso de la mastofauna mexicana/roedores mexicanos, diversos estudios recientes han demostrado que existe un número importante de especies crípticas que no habían sido descubiertas (Sullivan et al., 1997; 2000; Peppers y Bradley, 2000; Edwards et al., 2001; 2002a; 2002b; Carleton et al., 2002; Matocq, 2002; Riddle et al., 2000a; 2000b; Amman y Bradley, 2004; Bradley et al., 2004; Arellano et al., 2005; Villalba, 2006; González-Cózatl et al., 2009). El descubrimiento de nuevas formas de mamíferos/roedores mexicanos radica, principalmente, en el creciente empleo de marcadores moleculares, como se ha mencionado anteriormente, lo que han permitido detectar niveles importantes de variación genética en poblaciones conespecíficas con aparentemente morfología similar (González-Cózatl et al., 2009).

1.3. El caso de *Heteromys irroratus*

El ratón espinoso mexicano, *Heteromys irroratus*, es un roedor con amplia distribución geográfica y una importante diversidad taxonómica a nivel subespecífico. Esta especie se encuentra dentro de la familia Heteromyidae, subfamilia Heteromyinae, género *Heteromys*, subgénero *Heteromys*, especie *Heteromys irroratus*. En la actualidad esta especie incluye siete subespecies: *H. i. irroratus* (Gray, 1868), *H. i. alleni* (Allen, 1881), *H. i. bulleri* (Thomas, 1893), *H. i. texensis* (Merriam, 1902), *H. i. torridus* (Merriam, 1902), *H. i. jaliscensis* (Allen, 1906) y *H. i. guerrerensis* (Goldman, 1911).

1.3.1. Subfamilia Heteromyinae

La subfamilia Heteromyinae fue descrita por Coues (1875), en esta se incluían dos géneros, *Liomys* (*L. adpersus*, *L. irroratus*, *L. pictus*, *L. salvini*, *L. spectabilis*) y *Heteromys* (*H. anomalus*, *H. australis*, *H. desmarestianus*, *H. gaumeri*, *H. nelsoni*, *H. nubicolens*, *H. oasicus*, *H. oresterus* y *H. teleus*; Williams et al., 1993). Los miembros de ambos géneros solo podían diferenciarse por características dentales. Según Williams et al. (1993), *Heteromys* se diferenciaba de *Liomys* por presentar un patrón más complejo en las cúspides de premolares y molares. Particularmente, *Heteromys* posee, tres o cuatro pliegues en los premolares inferiores y el esmalte en forma de islas en los molares se encuentra en algunos taxones hasta la adultez

(Dowler y Genoways, 1978). No obstante, estudios recientes, empleando marcadores moleculares, demostraron que *Liomys* es parafilético con respecto a *Heteromys*. Adicionalmente, Anderson et al. (2006) empleando datos de aloenzimas y morfológicos, obtuvieron resultados ambiguos con respecto a la monofilia de *Liomys*, por lo que los autores no pudieron apoyar o rechazar un origen común de las especies de este género. Por lo tanto, estos autores plantearon la necesidad de estudios adicionales donde se empleen, por ejemplo, genes nucleares, para resolver la relación entre los linajes reconocidos en *Liomys* y *Heteromys*. Hafner et al. (2007) realizaron una revisión taxonómica de la familia Heteromyidae empleando secuencias de los genes COI, ARNr12S y ARNr16S, y considerando la parafilia de *Liomys*, sugirieron que este grupo debe ser considerado como una sinonimia de *Heteromys*, y propusieron una descripción taxonómica formal para el género *Heteromys*. Dentro de este género se incluyen 14 especies, *H. adspersus*, *H. anomalus*, *H. australis*, *H. desmarestianus*, *H. gaumeri*, *H. irroratus*, *H. nelsoni*, *H. nubicolens*, *H. oasicus*, *H. oresterus*, *H. pictus*, *H. salvini*, *H. spectabilis* y *H. teleus*. Sin embargo, Rogers y González (2010) plantearon que este cambio está sujeto a reevaluación empleando un mayor número de taxa de heterómidos y datos independientes, por lo que sugieren continuar utilizando el género *Liomys*. Por el contrario, Ramírez-Pulido et al. (2014), en una actualización de la lista de especies de mamíferos mexicanos sugieren que los resultados de Hafner et al. (2007) son lo suficiente robustos para considerar a *Liomys* sinonimia de *Heteromys*. En el presente trabajo se empleará la clasificación taxonómica propuesta por Hafner et al. (2007), considerando *Liomys* como una sinonimia de *Heteromys*.

1.3.2. Género *Heteromys*

El género *Heteromys* incluye las especies: *H. anomalus* (Thompson, 1815), *H. desmarestianus* (Gray, 1868), *H. irroratus* (Gray, 1868), *H. adspersus* (Peters, 1874), *H. pictus* (Thomas, 1893), *H. salvini* (Thomas, 1893), *H. gaumeri* (Allen y Chapman, 1897), *H. australis* (Thomas, 1901), *H. nelsoni* (Merriam, 1902), *H. oresterus* (Harris, 1932), *H. spectabilis* (Genoways, 1971), *H. teleus* (Anderson y Jarrín-V., 2002), *H. oasicus* (Anderson, 2003), y *H. nubicolens* (Anderson y Timm, 2006; Hafner et al., 2007).

Los ratones pertenecientes al género *Heteromys* presentan una forma del cuerpo adaptada para la locomoción tipo escansorial, con hábitos nocturnos y solitarios, y tienen orejas pequeñas (Genoways, 1973). Poseen mejillas con bolsas externas forradas de piel, similares a las que se observan en las tuzas (familia Geomyidae). Según Hafner et al. (1998), la diversidad de roedores es un reflejo de la diversidad de hábitats disponibles y, por lo tanto, un indicador de la

salud de un hábitat específico. En este sentido, los roedores del género *Heteromys* presentan una amplia distribución geográfica y una gran diversidad de especies son considerados como un indicador del estado de salud del hábitat que ocupan (Hafner et al., 1998; Fernández et al., 2014).

1.3.3. *Heteromys irroratus*

Esta especie es conocida comúnmente como ratón espinoso mexicano. En general, poseen medidas externas y craneales de pequeño tamaño (Genoways, 1973). Estos roedores presentan un cráneo relativamente ancho en comparación con el largo de este. Este grupo se distingue por poseer un báculo simple con base redondeada, cinco tubérculos plantares y un pelaje carmelita grisáceo con una línea lateral, usualmente presente de color rosa y vientre blanco (Genoways, 1973; Dowler y Genoways, 1978).

Heteromys irroratus se distribuye predominantemente en territorio mexicano y solo habita una pequeña porción del sur de Texas, Estados Unidos, por lo que es prácticamente endémico de México (Figura 1). En México, se encuentra en el Altiplano Mexicano y áreas circundantes, extendiéndose desde el sur de Chihuahua en la parte más norte de su distribución, hasta la región centro-sur de Oaxaca en la zona sur de su distribución (Figura 1; Genoways, 1973; Dowler y Genoways, 1978).

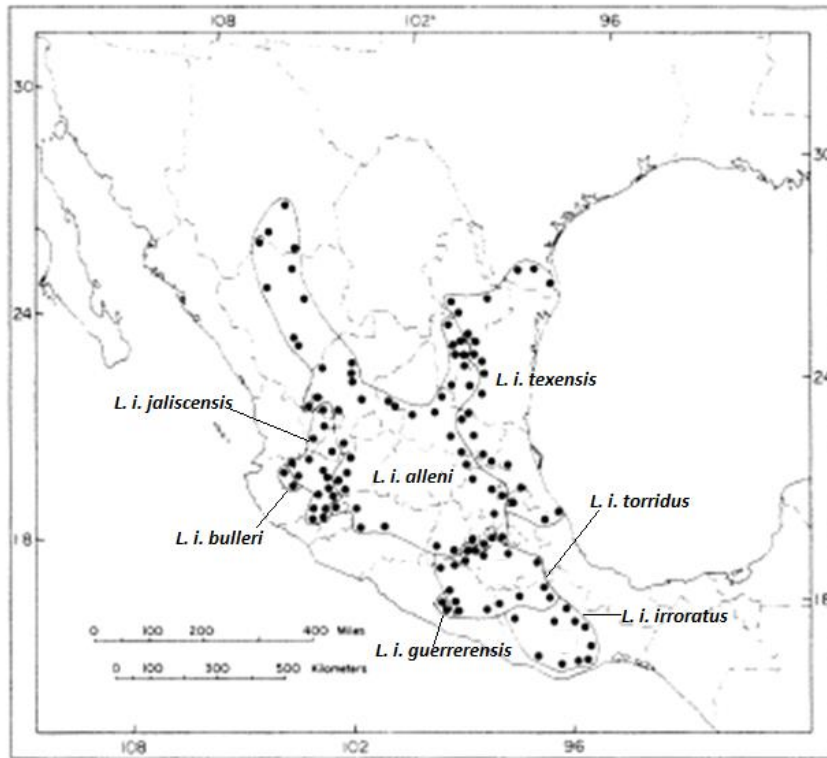


Figura 1. Distribución geográfica de las subespecies del ratón espinoso mexicano, *Heteromys irroratus* sensu lato (modificado de Genoways, 1973).

1.3.3.1. *Heteromys irroratus irroratus* (Gray, 1868)

Esta es la subespecie nominal y fue descrita inicialmente como *Heteromys irroratus* (Gray, 1868) con un holotipo de Oaxaca. Posteriormente, con la descripción del género *Liomys* por Merriam (1902) y la revisión taxonómica de la subfamilia Heteromyinae por Goldman (1911), este grupo fue clasificado como *L. i. irroratus*. Gray (1868) describió además a *H. albolimbatus* utilizando un lectotipo de La Parada, Oaxaca y Goodwin (1956) describió *L. i. yautepecus* empleando como holotipo un individuo de Rancho Sauce, San Pedro Jilotepec, Oaxaca. Goldman (1911) planteó que *H. albolimbatus* es una sinonimia de *H. irroratus*. Según Genoways (1973), *H. albolimbatus* fue descrita por Gray (1868) basado en dos individuos de La Parada, Oaxaca en el mismo artículo donde describe *H. irroratus*. *L. i. yautepecus* fue considerado como una sinonimia de *H. irroratus* por Goodwin (1969).

La distribución de *H. i. irroratus* se restringe a la región central y sur-central de Oaxaca (Figura, 1). Comparado con otras subespecies, este grupo incluye individuos de gran tamaño, lo que los hace diferentes de las subespecies *H. i. jaliscensis*, *H. i. texensis* y *H. i. torridus*. Además, la mayoría de los individuos de esta subespecie presentan el margen nasal posterior emarginado (Genoways, 1973).

1.3.3.2. *Heteromys irroratus alleni* (Coues, 1881)

Esta subespecie fue descrita como *Heteromys alleni* por Coues (1881) en J. A. Allen (1881: 187-89) con un holotipo de Hacienda la Angostura, Río Verde, San Luis Potosí. Más tarde, Merriam (1902) describió a *L. canus* empleando un holotipo de cerca del Parral, Chihuahua y plantea que es similar a *H. alleni*, pero *L. canus* es de mayor tamaño y gris. Posteriormente, Hooper (1947) publicó la descripción de *L. i. pullus* usando un holotipo de Tlalpan a 2250 m de altura en la Ciudad de México. En 1948, Hall y Villa-R describieron a *L. i. acutus* a partir de un holotipo de Michoacán a 2 millas al oeste de Pátzcuaro a 2347 m de altura. No obstante, Genoways (1973) consideró a todas estas entidades taxonómicas como sinonimias de *H. i. alleni*, planteando que los caracteres citados por Hooper y Handley (1948) para distinguir *acutus*, *pullus* y *canus* no fueron encontrados en su análisis. *H. i. alleni* abarca la mayor área de distribución dentro de la especie y ocurre en los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Hidalgo, Guanajuato, Querétaro, Jalisco, Michoacán, Tlaxcala, Estado de México y Ciudad de México (Figura 1; Genoways, 1973). Los individuos de esta subespecie presentan un gran tamaño y la forma del margen posterior nasal truncado (Genoways, 1973).

1.3.3.3. *Heteromys irroratus bulleri* (Thomas, 1893)

Thomas (1893) describió esta subespecie como *Heteromys bulleri* a partir de un holotipo de La Laguna, Sierra de Juanacatlán, Jalisco. Posteriormente con la descripción del género *Liomys* por Merriam (1902) *H. bulleri* paso a ser *L. bulleri*. Posteriormente, Goldman (1911) la clasifica como miembro de *L. irroratus*. Históricamente, los registros de distribución de esta subespecie la restringían a la Sierra de Juanacatlán y a Soyatlán del Oro, Jalisco (Genoways, 1973). Recientemente, se ha documentado que su área de distribución se extiende hacia el sur-oeste de Jalisco, en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (Gutiérrez-Costa et al., 2021). Esta subespecie se distingue por presentar un gran tamaño y huesos interparietales pequeños, lo cual la diferencia de las subespecies *H. i. alleni*, *H. i. guerrerensis* y *H. i. torridus* (Genoways, 1973).

1.3.3.4. *Heteromys irroratus texensis* (Merriam, 1902)

Liomys texensis fue descrita por Merriam (1902) utilizando como holotipo un ejemplar de Brownsville, Cameron Co., Texas. Más tarde, Goldman (1911) incluye a este grupo como miembro de *L. irroratus* y describió una nueva subespecie, *L. i. pretiosus*, con un holotipo de Metlatoyuca, Puebla. No obstante, Genoways (1973) considera que *L. i. pretiosus* es una sinonimia de *L. i. texensis*. Esta subespecie se encuentra en las costas de Texas en Estados Unidos y en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz y Puebla en

México (Figura 1). Se ha sugerido que hay una tendencia de que los individuos de *H. i. texensis* disminuyan en tamaño de manera progresiva desde Texas hacia el sur, hasta porciones de San Luis Potosí y Veracruz. Los individuos de esta subespecie pueden ser distinguidos de *H. i. alleni* debido a su tamaño pequeño, además *H. i. alleni* presenta el hueso interparietal dividido en un mayor porcentaje en comparación con los individuos de *H. i. texensis* (Genoways, 1973).

1.3.3.5. *Heteromys irroratus torridus* (Merriam, 1902)

Merriam (1902) describió a *Liomys torridus* empleando un holotipo de la localidad de Cuicatlán, Oaxaca. Posteriormente, Goldman (1911) incluye a este grupo como subespecie de *L. irroratus*. Más tarde, Merriam (1902) describió a *L. torridus minor* a partir del holotipo de Huajuapán de León, Oaxaca y Elliot (1903) empleando un holotipo de la localidad de Puente de Ixtla, Morelos, describió a *H. exiguus*. El estatus taxonómico de *L. t. minor* fue cuestionado primeramente por Hooper y Handley (1948), y posteriormente por Genoways (1973) quien plantea que *L. t. minor* es una sinonimia de *H. i. torridus*. Además, Genoways (1973) considera que no existen diferencias suficientes para reconocer a *H. exiguus* y *H. i. torridus* como entidades diferentes, por lo que son consideradas como sinonimias. *H. i. torridus* se distribuye alrededor del Sistema Volcánico Transversal en Puebla, Morelos y norte de Guerrero y Oaxaca (Figura 1). Los ratones de esta subespecie son generalmente de tamaño pequeño y los individuos de Puebla, Morelos y el norte de Oaxaca forman un grupo caracterizado por ser de tamaño mediano a pequeño. Esta subespecie se distingue por su pequeño tamaño tanto externo como del cráneo. Además, los individuos de *H. i. torridus* presentan en menor medida el hueso interparietal dividido y el margen nasal posterior truncado en comparación con la subespecie *H. i. alleni* (Genoways, 1973).

1.3.3.6. *Heteromys irroratus jaliscensis* (Allen, 1906)

Allen (1906) describió *Heteromys jaliscensis* empleando como holotipo un ejemplar de Las Canoas, Jalisco. Posteriormente esta entidad fue considerada como subespecie de *L. irroratus* (Goldman, 1911). Los individuos de *H. i. jaliscensis* se encuentran en la región sur, central y norte de Jalisco y al norte llegan hasta Zacatecas y Nayarit (Figura 1; Genoways, 1973). La mayoría de los individuos de esta subespecie presentan el margen posterior de los huesos nasales truncados, mientras un pequeño porcentaje lo tienen emarginado, y presentan el interparietal dividido (Genoways, 1973).

1.3.3.7. *Heteromys irroratus guerrerensis* (Goldman, 1911)

Esta subespecie fue descrita por Goldman (1911) como *Liomys guerrerensis* con un holotipo de Omiltemi, Guerrero. Posteriormente, Genoways (1973) la incluye como subespecie de *L. irroratus*. Este taxón es de gran tamaño y se encuentra circunscrito a la Sierra Madre del Sur en Guerrero alrededor de la localidad tipo (Figura 1; Genoways, 1973). Dentro de la especie, los individuos de *H. i. guerrerensis* son los más diferenciados fenotípicamente, ya que presentan un gran tamaño tanto externo como craneal (Genoways, 1973).

Como se puede apreciar, la taxonomía de *H. irroratus*, a nivel subespecífico no ha sido estable a través del tiempo. Esto puede entenderse considerando la extensa distribución geográfica del grupo y que la especie, como se ha descrito, ocupa hábitats muy diversos, desde el nivel del mar en las costas de Tamaulipas y Veracruz hasta más de 3000 m de altura en Cerro San Felipe y Monte Zempoaltepec en Oaxaca (Espinoza y Chávez Tapia, 2005).

Un estudio molecular reciente que empleó datos de secuencias del gen mitocondrial Citocromo b y en el que se incluyeron representantes de varias subespecies de *H. irroratus*, reveló que existen al menos dos linajes que son genéticamente distintos del resto de las muestras empleadas para la especie (Rogers y Vance, 2005). Los autores mencionan que, el alto grado de diferenciación genética de estos linajes, sugiere la existencia de dos nuevas entidades a nivel de especie. Una de estas especies candidatas está integrada por muestras cercanas a Omiltemi, Guerrero, que parecen corresponder a la subespecie *H. i. guerrerensis* y muestras del oeste de Oaxaca que podrían representar a *H. i. irroratus*. Ambos sitios se ubican en tierras altas de la Sierra Madre del Sur. Previamente, Genoways (1973) ya había reconocido que *H. i. guerrerensis* difiere morfológicamente y ocupa un hábitat diferente al de otras subespecies. Sin embargo, Genoways (1973) plantea que, en virtud de que numerosos individuos de *H. irroratus* de localidades cercanas a Omiltemi son morfológicamente intermedios entre *H. guerrerensis* y *H. irroratus*, es recomendable reconocer a *H. guerrerensis* como una subespecie de *H. irroratus*. La segunda especie candidata, la constituyen muestras de Pátzcuaro, Michoacán. Estos individuos representan la localidad tipo para *H. i. acutus*, taxón que Genoways (1973) colocó como sinonimia de *H. i. alleni*. Por lo tanto, Rogers y Vance (2005) concluyen que es fundamental que se haga una revisión completa de la taxonomía de *H. irroratus* que incluya un muestreo más amplio en el área de distribución de la especie y que incorpore ejemplares tipo de aquellas subespecies que estén asociadas a las muestras que podrían representar nuevas especies.

1.4. Métodos empleados para resolver conflictos taxonómicos

La determinación de los límites de especie es un objetivo básico en la sistemática evolutiva, tanto para comprender los niveles de biodiversidad como para adoptar estrategias efectivas de conservación. Identificar especies crípticas es fundamental para evitar la extinción prematura de especies aún no descritas (Cornetti et al. 2015). La mayoría de las especies han sido descritas en base a características fenotípicas, particularmente atributos morfológicos. En general, el uso de este tipo de caracteres permite identificar inmediatamente a individuos de una especie por inspección visual, y es aplicable tanto a individuos vivientes como especímenes preservados y fósiles. Sin embargo, también se han reconocido desventajas en el empleo de características morfológicas en el reconocimiento de especies. Por ejemplo, es común que exista un componente subjetivo cuando se definen e interpretan estados de un carácter, además de que se requiere grandes tamaños de muestra para demostrar la fijación del estado de un carácter. También puede resultar complicado evaluar caracteres continuos en contraste con los discretos. Además, los caracteres morfológicos pueden ser poco útiles en la identificación de grupos de organismos cuyos procesos de especiación ocurre sin cambios morfológicos evidentes lo que resulta en especies morfológicamente crípticas (Padial et al., 2010). Los caracteres comúnmente utilizados para diferenciar los organismos son datos de medidas y su morfología externa e interna. No obstante, recientemente se han empleado técnicas como la morfometría geométrica (MG) la cual tiene una gran utilidad para aquellos grupos que son hiperdiversos o no presentan diferencias morfológicas tan marcadas (Cardini y Elton, 2007). Los métodos de MG han sido utilizados para describir variaciones en distintos grupos taxonómicos como reptiles (Ruane, 2015, Claude et al., 2003) y mamíferos (Cardini et al., 2009; Soto-Vivas et al., 2011; García y Sánchez-González, 2013; Nava, 2016; Santana y Cheun, 2016; Patton y Conroy, 2017; Vallejo et al., 2017).

A diferencia del uso de datos morfológicos, se ha sugerido que los caracteres genéticos analizados bajo un marco filogenético contribuyen a una mayor resolución y precisión para la taxonomía y la sistemática (Bickford et al., 2006). Las secuencias de ADN pueden ser examinadas empleando “Métodos no basados en árboles” que proveen diferencias entre especies. No obstante, este tipo de datos son usualmente analizadas empleando “Métodos basados en árboles” los cuales buscan grupos monofiléticos que puedan representar especies. Una limitación de los “Métodos basados en árboles” es que sigue siendo difícil elegir cuál de los múltiples clados detectados bien soportados representan especies (Sites y Marshall, 2003). Además, se ha planteado que la discordancia entre los árboles de especies y los árboles de genes es un fenómeno bastante común causado por procesos como diferenciación incompleta de los

linajes, hibridación, duplicación de genes, evolución reticulada y recombinación. Actualmente, los métodos más prometedores son aquellos basados en árboles, pero fundamentados en la teoría coalescente, ya que pueden identificar señales de divergencia de especies incluso en circunstancias complejas de incongruencia del árbol genético y no monofilia (Camargo y Sites, 2013). Recientemente, se ha surgido un enfoque multidisciplinario, definido como "taxonomía integradora", cuyo objetivo es combinar distintas subdisciplinas y tipos de datos en el reconocimiento de grupos a nivel de especie (por ejemplo: filogenética, genética de poblaciones, ecología, morfología, comportamiento; Dayrat, 2005).

1.4.1. Métodos moleculares

Los investigadores que llevan a cabo la delimitación de especies deben analizar los datos empleando un amplio rango de métodos y plantear sus resultados en base a la congruencia de estos (Carstens et al., 2013). Existen dos grandes grupos entre los métodos moleculares para la delimitación de especies, los que implican datos de genética de poblaciones (por ejemplo: flujo de genes y tamaño de poblaciones) y los que emplean parámetros filogenéticos. Los análisis filogenéticos son una herramienta muy importante no solo para analizar la estructura genética de las poblaciones como resultado de procesos históricos, sino que también permite dilucidar el estatus taxonómico de linajes morfológicamente similares. En la mayoría de los procesos de especiación que han ocurrido recientemente, aún no han evolucionado rasgos morfológicos o características diagnosticables (Agrellos et al., 2012; Martínez y Gardenal, 2016). Las especies crípticas generalmente son descritas en base a caracteres moleculares y posteriormente su estatus específico es confirmado empleando caracterización morfológica y ecológica. La detección de distancias genéticas relativamente elevadas entre poblaciones de una especie ayuda a reconocer que existen más de una entidad a nivel de especie (Rivera et al., 2018). Adicionalmente, se ha sugerido que la identificación de especies debe incluir, preferentemente, el escrutinio de dos o más genes y de ser posible genes no ligados (Boissin et al., 2008; Knowles y Carstens, 2007; O'Meara, 2010; Ross et al., 2010; Weisrock et al., 2006).

Anteriormente, la delimitación de especies estaba basada en la monofilia recíproca, lo cual puede ser demostrado empleando un solo locus, pero no es lo usual al emplear múltiples loci (Knowles y Carstens, 2007). En este sentido, Fujita et al. (2012) proponen emplear la teoría de coalescencia para identificar objetivamente las especies alopátricas o crípticas usando datos genéticos. El objetivo central de los análisis basados en los principios de esta teoría es identificar linajes que evolucionan independientes, donde cada uno de estos representa una especie. Los métodos de delimitación de especies basados en coalescencia emplean análisis

probabilísticos que no requieren la monofilia recíproca de los diferentes alelos. Esto es importante porque la mayoría de los alelos no se esperan que sean monofiléticos, particularmente en aquellos eventos de especiación que han ocurrido recientemente.

Uno de los modelos más empleados en la actualidad para la delimitación de especies es el “Generalized Mixed Yule Coalescent” (GMYC). Este modelo fue introducido por primera vez por Pons et al. (2006) y Fontaneto et al. (2007) y es un método diseñado para delimitar especies con evolución independiente empleando datos de un único locus. En este caso el término evolución independiente hace referencia a que las nuevas mutaciones que aparecen en una especie no deben estar presentes en otras especies (Templeton, 1989; Barraclough et al., 2003; de Queiroz, 2007). Reid y Carstens (2012) implementaron la versión bayesiana del modelo GMYC, conocido como “Bayesian Generalized Mixed Yule Coalescent” (bGMYC). El método bGMYC toma como archivo de entrada un árbol filogenético ultramétrico de datos de secuencia de ADN formado por múltiples especies y múltiples individuos dentro de estas especies. Este modelo asume que los puntos de ramificación en el árbol corresponden a uno de dos eventos posibles: primero, eventos de divergencia entre taxones a nivel de especies (modelados por el proceso de Yule) o, segundo, eventos coalescentes entre linajes muestreados dentro de especies (modelado por la coalescencia). Debido a que la tasa de coalescencia se espera que sea mayor dentro de las especies que la tasa de cladogénesis, el modelo debe ser capaz de encontrar las diferencias entre estos tipos de ramificaciones. El objetivo del modelo bGMYC es determinar si los clados se han diversificado en grupos evolutivos independientes, especies, y si ha sido así, delimitar estas especies. En este sentido, el modelo nulo sería que los individuos dentro de la muestra pertenecen a una única especie o población, mientras que el modelo alternativo se refiere a que el clado se ha diversificado en diferentes especies y cada una de ellas se considera una entidad única. Las copias de los genes tienden a coalescer hacia el pasado a un único ancestro común dentro de cada especie. Si el tiempo hacia el ancestro común más reciente dentro de cada especie es más pequeño que el tiempo desde que la especie se separó de sus especies hermanas, esto dará lugar a un patrón de grupos genéticos: grupos de individuos estrechamente relacionados separados por ramas de otros grupos similares.

Un procedimiento similar al enfoque de GMYC es el modelo “Poisson Tree Processes” (PTP; Zhang et al., 2013). Ambos métodos intentan reducir las diferencias entre el árbol de especies y los métodos basados en distancia para la delimitación de especies. El modelo PTP también parte de un árbol de genes (no ultramétrico), pero con la longitud de las ramas proporcionales al número de cambios, en lugar del tiempo. El método PTP modela los procesos de ramificación

basado en el número de sustituciones acumuladas/esperadas entre los eventos de especiación. Este modelo intenta determinar el punto de transición de los procesos inter a intraespecíficos asumiendo un modelo de dos parámetros, un parámetro para la especiación y un parámetro para el proceso coalescente que mejor se ajusta a los datos. El supuesto subyacente es que cada sustitución tiene menor probabilidad de generar un evento de ramificación. Dentro de las especies, los eventos de ramificación serán más frecuentes, mientras que entre las especies serán más escasos.

Varios estudios han mostrado que el rendimiento del procedimiento bGMYC se ve afectado por la proporción en el tamaño de la población con respecto al tiempo de divergencia de las especies, número de especies involucradas y el número de alelos únicos. Además, se plantea que el modelo bGMYC, tiende a sobreestimar especies (Paz y Crawford, 2012; Pentinsaari et al., 2016; Renner et al., 2017). Por su parte, el método PTP tiende a superar al de GMYC cuando las distancias interespecíficas son pequeñas (Zhang et al., 2013), aunque ambos enfoques a menudo producen estimaciones de límites de especies similares. Los procedimientos GMYC y PTP asumen que los árboles de genes reflejan la diversificación de las especies. La incongruencia en los resultados de diferentes métodos es evidencia de diferencia en el poder para detectar linajes crípticos en uno o más de los enfoques usados para delimitar especie, y puede indicar que las asunciones de uno o varios de los métodos han sido violadas. En cualquier caso, las inferencias extraídas de los estudios de delimitación de especies deben ser conservadoras, ya que en la mayoría de los contextos es mejor no delimitar las especies que delimitar falsamente entidades que no representan linajes evolutivos reales.

1.4.2. Morfometría geométrica

Aunque los métodos de morfología tradicional se han empelado durante décadas como un recurso para evaluar la variación fenotípica entre grupos de organismos, se ha sugerido que este tipo de enfoques no son los más adecuados para detectar diferencias entre los taxa que presentan una elevada variación intraespecífica y por lo tanto se plantea la necesidad de métodos alternativos (Ruane, 2015). Según Schlick-Steiner et al. (2007) muchas de las especies crípticas pueden ser identificadas mediante caracteres físicos externos, empleando métodos como la morfometría geométrica (MG). La MG es una técnica que propone estudiar los cambios en el tamaño y la forma a partir del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de datos morfométricos o “*landmarks*” (Van der Molen et al., 2007). El modo de capturar la geometría (y por ende el tamaño y forma) del objeto en estudio en MG es mediante puntos anatómicos de referencia o *landmarks*. Los *landmarks* son caracteres basados en

coordenadas, de los cuales se puede deducir la forma de los organismos. Por tanto, un *landmark* es un punto en el espacio bi- o tridimensional que corresponde a la posición de un rasgo particular en el objeto. Por ejemplo, en el estudio de elementos osteológicos pueden ser definidos como el punto que marca la huella de una inserción muscular, o bien el foramen que marca el paso de un paquete neurovascular.

Para decidir cuantos *landmarks* es necesario emplear en un estudio, se deben considerarse varios factores. Primero, por definición cada *landmark* debe ser un punto anatómico homólogo para cada espécimen del estudio. Segundo, la configuración de los *landmarks* debe brindar un resumen adecuado de la morfología. Los *landmarks* son los únicos que proveen información en el marco geométrico, y la variación de forma restringida a regiones entre puntos de referencia no se puede detectar (Webster y Sheets, 2010).

En la MG no se emplean las distancias entre las marcas sino las coordenadas de las marcas. La escala geométrica para las coordenadas de los *landmarks* se calcula como tamaño de centroide (Swiderski, 2003). El centroide es la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde cada *landmarks* al centroide de la configuración que ellos definen (Van der Molen et al., 2007). De esta manera la forma depende de la posición relativa de los *landmarks* y no de la distancia entre ellos. La división de todas las coordenadas de *landmarks* de un individuo por su tamaño centroide, divide todas las distancias *interlandmarks* por el mismo factor. La configuración resultante tiene la forma original y un tamaño centroide de 1. La superposición Procrustes utiliza este reescalado con operaciones que eliminan las diferencias de ubicación y orientación, para producir conjuntos de coordenadas que reflejan únicamente las diferencias de forma entre los especímenes (Rohlf, 1996). Una ventaja de los métodos basados en coordenadas es que permiten la evaluación de la proporción de variación de forma asociada a la variación de tamaño, alometría (Swiderski, 2003). La eliminación de las diferencias de orientación entre dos configuraciones (referencia y objetivo) se logra al rotar una configuración (objetivo) alrededor de su centroide hasta que las diferencias entre los *landmarks* sean mínimas con respecto a otra configuración de referencia. La falta de coincidencia en la ubicación de los *landmarks* para ambas configuraciones se cuantifica como la distancia cuadrada entre sus *landmarks* sumados a todos los puntos de referencia, la raíz cuadrada de esta es la distancia Parcial Procrustes entre esas configuraciones (Webster y Sheets, 2010). Ambas configuraciones estarían óptimamente alineadas si la distancia Parcial Procrustes se minimiza. Este procedimiento de traducir todas las configuraciones de los *landmarks* a una ubicación común, reescalando al tamaño centroide, y

rotarlo todo en una alineación de mínimos cuadrados óptima con una forma de referencia media estimada, se denomina Análisis Procrustes Generalizado (Webster y Sheets, 2010).

En los métodos de deformación, se modifica el área o volumen de una configuración hasta que se corresponde con la configuración objetivo. La técnica de deformación más utilizada para estudiar las diferencias entre las formas es el Thin-plate spline (TPS, Deformación de lámina delgada) propuesta por Bookstein (1989). En la superficie curvada (TPS), se define como *principal warps*, al patrón de desplazamiento de los *landmarks* en el plano, en otras palabras, a los vectores que describen de qué modo es posible deformar una configuración de referencia para que coincida con el objetivo (Van der Molen et al., 2007). Dentro de los *principals warps* se encuentran los *partials warps*, que son aplicados separadamente a lo largo de cada eje de coordenadas y correctamente escalados, de manera que se corresponden con la parte no uniforme de la función TPS que transforman las coordenadas de la referencia X_c en aquellas del i -ésimo espécimen X_i (Rohlf, 1996). Estos valores de *warps* son calculados mediante la descomposición matemática del TPS, donde cada valor de *warps* cuantifica la contribución matemática de un estilo independiente de deformación entre las formas de referencia y la objetivo. Aunque los valores de los *warps* de cualquier transformación de forma dada se relacionan con estilos matemáticamente independientes de deformación de la forma de referencia, no pueden tratarse como biológicamente independientes y no deben analizarse o interpretarse aisladamente (Webster y Sheets, 2010).

¿Cómo se analizan estadísticamente los caracteres morfológicos?

Los patrones de variación en la forma pueden ser explorados por un Análisis de Componentes Principales (PCA, de sus siglas en inglés). Los datos empleados para el PCA pueden ser coordenadas de *landmarks* superpuestos o los valores de los *warps* obtenidos a partir de las rejillas de deformación TPS. Debido a los grados estadísticos de libertad es mejor analizar las diferencias de la forma entre grupos utilizando los valores de *warps*. En morfometría geométrica los ejes del PCA codifican información sobre el cambio de la forma en todo el conjunto de *landmarks*. Es común interpretar el primer eje de PCA de datos morfométricos tradicionales como "tamaño", aunque cuando se trabaja con datos de forma no es tan frecuente debido a la eliminación de información de escala (Webster y Sheets, 2010).

El Análisis de Variables Canónicas (CVA, por sus siglas en inglés) es otra prueba estadística que nos permite detectar diferencias entre las formas de grupos. El CVA está basado en los valores *warps*, y donde todas las configuraciones deben superponerse a la misma forma de

referencia. Además de detectar diferencias entre las formas de los grupos, el CVA determina la confianza de la clasificación *a priori* de los especímenes en base a los datos de forma. Este método también se puede usar para asignar muestras no clasificadas a grupos predefinidos, suponiendo que la muestra realmente pertenece a uno de los grupos predefinidos. La asignación estadística a los grupos se basa en la distancia (D) entre la muestra y una media del grupo, para la asignación de un espécimen a un grupo predicho este debe tener la D más baja (Webster y Sheets, 2010).

1.4.3. Modelado de Nicho

Otro recurso que ha sido recientemente utilizado en los análisis de delimitación de especies (el proceso de identificar y diagnosticar especies; Sites y Marshall, 2003) es el análisis de conservadurismo de nicho (o la ausencia de éste). Por ejemplo, si un grupo de poblaciones está adaptado a ciertas condiciones climáticas y éstas no se superpone con especies cercanas, es poco probable que exista flujo genético entre estas poblaciones y, en consecuencia, estas poblaciones seguramente representarán especies diferentes. Estas similitudes y diferencias en las características del nicho pueden ser visualizadas y analizadas estadísticamente con métodos de modelado de nicho ecológico.

El nicho ecológico es un conjunto de condiciones bióticas y abióticas donde las especies son capaces de persistir y mantener un tamaño de población estable (Hutchinson, 1957). No obstante, se pueden distinguir dos elementos que integran este concepto; el nicho fundamental y el nicho realizado. El nicho fundamental describe las condiciones abióticas en las cuales las especies son capaces de persistir, mientras que el nicho realizado describe las condiciones en las que las especies persisten teniendo en cuenta las interacciones con otras especies, como depredadores y competidores (Hutchinson, 1957). La tendencia de las especies de retener aspectos de su nicho fundamental a través del tiempo es conocido como “conservadurismo de nicho” (Wiens y Graham, 2005), el cual tiene relevancia en el estudio de la evolución, ecología y biología de la conservación de grupos biológicos (Wiens y Graham, 2005).

Según Peterson et al. (1999) en un estudio realizado donde combina datos geográficos, datos climáticos y modelado de nicho para diferentes grupos de mamíferos, aves y mariposas, plantea que los nichos climáticos se conservan entre diversos grupos hermanos. Este planteamiento ha sido soportado por otros estudios, como preferencia de microhabitats en reptiles (Losos et al., 2003), variación morfométrica en aves (Böhning -Gaese et al., 2003), y modelado de nicho en anfibios (Graham et al., 2004). Por otro lado, Ricklefs y Latham (1992), planteó que numerosas

plantas congénicas de Europa y Norte América presentan rangos geográficos similares en cada continente, un patrón interpretado como evidencia de conservadurismo de nicho. Las especies siempre habitarán en ambientes que tengan similitudes con las de sus parientes cercanos.

Cuando se habla de especiación es más común pensar en divergencia de los grupos (Coyne y Orr, 2004; Futuyma, 1998) y no en el mantenimiento de la similitud ecológica a través del tiempo. La separación geográfica de un linaje en dos es considerada esencial para la especiación alopátrica, la cual puede ser causado por barreras geográficas diversas (montañas, desiertos y océanos). No obstante, si una especie se puede adaptar a las condiciones ecológicas de la barrera, el flujo genético continuará y no ocurrirá la especiación alopátrica. En este sentido, el conservadurismo de nicho es importante en la especiación alopátrica porque puede potencialmente limitar la adaptación a las condiciones ecológicas a ambos lados de la barrera geográfica. En muchos casos estas barreras están relacionadas con diferentes preferencias de microhábitats. En otros casos están relacionadas con diferencias en los regímenes climáticos, como en el caso de especies endémicas de montaña separadas por tierras bajas intermedias o especies endémicas de tierras bajas separadas por cadenas montañosas intermedias.

¿Cómo se analiza el conservadurismo de nicho?

Las comparaciones de los diferentes hábitats idóneos generados por los Modelos de Nicho Ecológicos (MNEs) para diferentes especies o poblaciones pueden ayudar en la delimitación de especies o hipótesis de prueba sobre la conservación de nichos (Buermann et al., 2008; Lentz et al., 2008; Warren et al., 2008). Warren et al. (2008) propuso un conjunto de pruebas estadísticas y medidas de similitud que permiten una comparación cuantitativa de los MNEs. La “Prueba de Identidad” evalúa si los MNEs obtenidos para dos poblaciones son idénticos. Por tanto, la hipótesis nula plantea la equivalencia de nicho, y ésta se rechaza cuando los valores observados de los índices D e I son significativamente menores que los valores calculados para las pseudorélicas. Por otro lado, la “Prueba de Background” evalúa si los MNEs obtenidos para las especies son más similares que lo esperado por azar, teniendo en cuenta las regiones geográficas en las que residen. Esta prueba se puede utilizar para valorar si los MNEs obtenidos de dos poblaciones con distribución alopátrica, son más diferente de lo que se esperaría, debido a las diferencias ambientales subyacentes entre las regiones en las que habitan dichas poblaciones. En este caso si los valores observados de D e I de las poblaciones originales son significativamente mayores que la distribución nula se rechaza la hipótesis nula de similitud

entre poblaciones no es mayor que la esperada basado en la disponibilidad de hábitats (conservadurismo de nicho), mientras que si los valores de D e I son menores que la distribución nula, entonces se rechaza la hipótesis nula que plantea que la divergencia entre las poblaciones no es mayor que la esperada basada en la disponibilidad de hábitat (divergencia entre los nichos).

1.5. Hipótesis

Considerando que *Heteromys irroratus* es una especie con amplia distribución geográfica y altitudinal, y que se distribuye en una amplia variedad de hábitats, se predice que las distintas poblaciones de este grupo, adaptadas a diferentes condiciones ambientales, han experimentado procesos de aislamiento y diferenciación genética entre ellas, dando origen a distintos linajes a nivel de especie.

Para poner a prueba esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

1.6. Objetivo general

Determinar la diversidad taxonómica específica dentro del grupo *Heteromys irroratus* Gray 1868 sensu lato en función de sus relaciones filogenéticas y líneas de evidencia complementarias.

1.6.1. Objetivos particulares

1. Estimar la variación en secuencias del gen mitocondrial Citocromo b de poblaciones de *Heteromys irroratus* sensu lato.
2. Detectar y delimitar, filogenéticamente, linajes crípticos que puedan representar entidades taxonómicas específicas.
3. Evaluar si la variación y diferenciación en la forma del cráneo en poblaciones de *Heteromys irroratus* sensu lato respaldan las especies candidatas propuestas a partir de los datos moleculares.

Para darle cumplimiento a estos objetivos particulares se dividió el trabajo en los siguientes capítulos:

Capítulo 2A: “Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon”, se generaron datos moleculares para *H. i. bulleri* como parte de la tesis y se realizó una descripción morfológica general. Este capítulo fue publicado en la Revista *THERYA*.

Capítulo 2B: “Molecular data confirms multiple cryptic species within *Heteromys irroratus* Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae)”, se generaron datos moleculares para el grupo los cuales fueron analizados de conjunto con muestras obtenidas a partir de GenBank bajo un enfoque filogenético y se aplicaron los métodos de delimitación de especies. Este capítulo será enviado a la revista *Journal of Mammalogy*.

Capítulo 3: “Implementation of geometric morphometrics methods in the delimitation of putative species within *Heteromys irroratus* group Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae)”, para este capítulo se tomaron fotografías de las vistas dorsal y ventral del cráneo de ejemplares abarcando la mayor parte de la distribución del grupo y se analizaron bajo un enfoque de morfometría geométrica. Este capítulo será enviado a la revista *Organism Diversity and Evolution*.

Capítulo 4: Propuesta de descripción de especies reconocidas dentro de *Heteromys irroratus* group Gray 1868 sensu lato. En este capítulo se integran los datos obtenidos a partir de las diferentes metodologías y se realiza una propuesta formal de especies dentro del grupo *H. irroratus*.

1.7. Literatura Citada

- Agrellos RC. Bonvicino CR. Rosa EST. Marques AAR. D'Andrea PS. Weksle M. 2012. The taxonomic status of the Castelo dos Sonhos Hantavirus reservoir. *Oligoryzomys utiaritensis* Allen 1916 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae). *Zootaxa*. 3220: 1-28.
- Allen JA. 1881. List of mammals collected by Dr. Edward Palmer in north-eastern Mexico, with field-notes by the collector. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*. 8: 183-189.
- Allen JA. 1906. Mammals from the states of Sinaloa and Jalisco, México, collected by J. H. Batty during 1904 and 1905. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 14: 587-612.
- Allen JA. Chapman FM. 1897. On a collection of mammals from the Island of Trinidad, with descriptions of new species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 5: 203-234.
- Amman BR. Bradley RD. 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for a genetic subdivision in *B. musculus*. *Journal of Mammalogy*. 85: 162-165.
- Anderson RP. 2003. Taxonomy, distribution and natural history of the genus *Heteromys* (Rodentia: Heteromyidae) in western Venezuela, with the description of a dwarf species from the Península de Paraguaná. *American Museum Novitates*. 3396: 1-43.
- Anderson RP. Jarrín-V P. 2002. A new species of spiny pocket mouse (Heteromyidae: Heteromys) endemic to western Ecuador. *American Museum Novitates*. 3382: 1-26.
- Anderson RP. Timm RM. 2006. A new montane species of spiny pocket mouse (Rodentia: Heteromyidae: *Heteromys*) from northwestern Costa Rica. *American Museum Novitates*. 3509: 1-38.
- Anderson RP. Weksler M. Rogers DS. 2006. Phylogenetic analyses of Spiny Pocket Mice (Heteromyidae: Heteromyinae) based on allozymic and morphological data. *Journal of Mammalogy*. 87: 1218-1233.
- Andersson L. 1990. The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon*. 39: 375-382.
- Arellano E. González-Cozátl FX. Rogers DS. 2005. Molecular systematics of the Middle American harvest mice *Reithrodontomys* (Muridae). estimated from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 529-540.
- Avisé JC. Ball RM. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7: 45-67.
- Baker RJ. Bradley RD. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*. 87: 643-662.
- Barracough TG. Birky CW. Burt A. 2003. Diversification in sexual and asexual organisms. *Evolution*. 57: 2166-2172.
- Baum DA. Donoghue MJ. 1995. Choosing among alternative “phylogenetic” species concepts. *Systematic Botany*. 20: 560-73.

- Baum DA. Shaw KL. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pages 289-303 in *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics* (P.C. Hoch. and A.G. Stephenson. eds.). Missouri Botanical Garden. St. Louis.
- Bickford D. Lohman DJ. Sodhi NS. Ng PKL. Meier R. Winker K. Ingram KK. Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22: 148- 155.
- Boissin E. Féral JP. Chenuil A. 2008. Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). *Molecular Ecology*. 17: 1732-1744.
- Bookstein FL. 1989. Principal Warps: Thin-Plate Splines and the Decomposition of Deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 11: 567-588.
- Böhning-Gaese K. Schuda MD. Helbig AJ. 2003. Weak phylogenetic effects on ecological niches of *Sylvia warblers*. *Journal of Evolutionary Biology*. 16: 956-965.
- Bradley RD. Baker RJ. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*. 82: 960-973.
- Bradley RD. Menendez-Harclerode F. Hamilton MJ. Ceballos G. 2004. A new species of *Reithrodontomys* from Guerrero México. *Occasional Papers*. Museum of Texas Tech University. 231: 1-12.
- Bremer K. Wanntorp HE. 1979. Geographic populations or biological species in phylogeny reconstruction. *Systematic Zoology*. 28: 220-224.
- Butler RS. Mayden RL. 2003. Cryptic Biodiversity. *Endangered Species Bulletin*. 28: 24- 26.
- Buermann W. Saatchi S. Smith TB. Zutta BR. Chaves JA. Milá B. Graham CH. 2008. Predicting species distributions across the Amazonian and Andean regions using remote sensing data. *Journal of Biogeography*. 35: 1160-1176.
- Camargo A. Sites J Jr. 2013. Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. Open access peer-reviewed chapter. Capítulo 4. 225-247.
- Cardini A. Elton S. 2007. Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology*. 126: 121-134.
- Cardini A. Nagorsen D. O'Higgins P. Polly PD. ThoringTon Jr RW. Tongiorgi P. 2009. Detecting biological distinctiveness using geometric morphometrics: an example case from the Vancouver Island marmot. *Ethology Ecology and Evolution*. 21: 209-223.
- Carleton MD. Sánchez O. Urbano-Vidales G. 2002. A new species of *Habromys* (Muroidea: Neotominae) from Mexico. With generic review of species definitions and remarks on diversity patterns among Mesoamerican small mammals restricted to humid montane forest. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 115: 488-533.
- Carstens BC. Pelletier TA. Reid NM. Satler JD. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*. 22: 4369-4383.

- Claude J. Paradis E. Tong H. Auffray JC. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society*. 79: 485-501.
- Cornetti L. Ficetola GF. Hoban S. Vernesi C. 2015. Genetic and ecological data reveal species boundaries between viviparous and oviparous lizard lineages. *Heredity*. 115: 517-526.
- Coues E. 1875. A critical review of the North American Saccomyidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 27: 272-327.
- Coyne JA. Orr HA. 2004. *Speciation*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Cracraft J. 1983. Species concepts and speciation analysis. In: Johnston RF (ed). *Current Ornithology*. Plenum Press. New York. Pp. 153-187.
- Cracraft J. 1992. Species concepts and speciation analysis. In: Ereshefsky M (ed). *The units of evolution. Essays on the nature species* (pp. 93-120). The MIT press. Cambridge. Massachusetts London. England.
- Cracraft J. 2002. The seven great questions of systematic biology: An essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 89: pp-pp.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85: 407-415.
- de Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In *Endless Forms: Species and Speciation* (Howard. D.J. and Berlocher. S.H.. eds). pp. 57–75. Oxford University Press New York.
- de Queiroz K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 6600-6607.
- de Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. 56: 879–886.
- DobzhanskyT. 1950. Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist*. 84: 401-418.
- Dobzhansky T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press. New York.
- Donoghue MJ. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*. 88: 172-181.
- Dowler RC. Genoways HH. 1978. *Liomys irroratus*. *Mammalian species*. 82: 1-6.
- Edwards CW. Fulhorst CF. Bradley RD. 2001. Molecular phylogenetics of the *Neotoma albigula* species group: further evidence of a paraphyletic assemblage. *Journal of Mammalogy*. 82: 267-279.
- Edwards CW. Bradley RD. 2002a. Molecular systematics and of the genus *Neotoma*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 25: 489-500.

- Edwards CW. Bradley RD. 2002b. Molecular systematics and the historical phylogeography of the *Neotoma mexicana* species group. *Journal of Mammalogy*. 83: 20-30.
- Egge JJD. Simons AM. 2006. The challenge of truly cryptic diversity: diagnosis and description of a new madtom catfish (Ictaluridae: Noturus). *Zoologica Scripta*. 35: 581–595.
- Elliot DG. 1903. Descriptions of apparently new species of mammals of the genera *Heteromys* and *Ursus* from Washington and México. Publication, Field Columbian Museum. Zoological series. 3: 233-237.
- Espinoza LA. Chávez Tapia C. 2005. *Liomys irroratus*. Pp. 628-629. en Los mamíferos silvestres de México (G. Ceballos y G. Oliva. coordinadores). Fondo de Cultura Económica - CONABIO. México.
- Ferguson JWH. 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*. 75: 509-516.
- Fernández JA. Hafner MS. Hafner DJ. Cervantes FA. 2014. Conservation status of rodents of the families Geomyidae and Heteromyidae of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 576-588.
- Fontaneto D. Herniou EA. Boschetti C. Caprioli M. Melone G. Ricci C. Barraclough TG. 2007. Independently evolving species in asexual Bdelloid rotifers. *PLoS Biology*. 5: e87.
- Frost DR. Kluge AG. 1994. A consideration of epistemology in systematic biology. with special reference to species. *Cladistics*. 10: 259-294.
- Fujita MK. Leache AD. Burbrink FT. McGuire JA. Moritz G. 2012. Coalescent- based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. 27: 1-9.
- Futuyma DJ. 1998. *Evolutionary biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- García FJ. Sánchez-González E. 2013. Morfometría geométrica craneal en tres especies de roedores arborícolas neotropicales (Rodentia: Cricetidae: *Rhipidomys*) en Venezuela. *Therya*. 4: 157-178.
- Genoways HH. 1971. A new species of spiny pocket mouse (genus *Liomys*) from Jalisco, México. *Occasional papers of the Museum of Natural History, the University of Kansas*. 5: 1-7.
- Genoways HH. 1973. Systematics and Evolutionary Relationships of Spiny Pocket Mice. Genus *Liomys*. Special Publications The Museum Texas Tech University. 368 pp.
- Goldman EA. 1911. Revision of the spiny pocket mice (genera *Heteromys* and *Liomys*). *North America Fauna*. 34: 1-70.
- Goldstein PZ. DeSalle R. 2000. Phylogenetic species, nested hierarchies, and character fixation. *Cladistics*. 16: 364-84.
- González-Cózatl FX. Rogers DS. Arellano E. 2009. Diversidad críptica en la CNMA: descubriendo nuevas especies de roedores mexicanos. Pp. 55-66. en 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología. UNAM. Aportaciones al Conocimiento y Conservación de los Mamíferos Mexicanos (F. A. Cervantes. J. Vargas y Y. Hortelano. eds.).

- Goodwin GG. 1956. Seven new mammals from México. *American Museum Novitates*. 1791: 1-10.
- Goodwin GG. 1969. Mammals from the state of Oaxaca, México, in the American Museum of Natural History. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 141: 1-270.
- Graham CH. Ron SR. Santos JC. Schneider CJ. Moritz C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*. 58: 1781-1793.
- Gray JE. 1868. Synopsis of the species of *Sacomyninae*, or pouched mice, in the collection of the British Museum. *Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London*. 1868: 199-206.
- Gutiérrez-Costa MA. González-Cózatl FX. Ramírez-Martínez MM. Iñiguez-Dávalos LI. Rogers DS. 2021. Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon. *Therya*. 12: 139-148.
- Hafner JC. Light JE. Hafner DJ. Hafner MS. Reddington E. Rogers DS. Riddle BR. 2007. Basal clades and molecular systematics of *Heteromyd* rodents. *Journal of Mammalogy*. 88:1129-1145.
- Hafner D. Yensen E. Kirkland GL Jr. 1998. North American Rodents. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Rodent Specialist Group. 182 pp.
- Harris Jr WP. 1932. Four new mammals from Costa Rica. *Occasional Papers*. Museum of Zoology. University of Michigan. 248: 1-6.
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press. Urbana.
- Hooper ET. 1947. Notes on Mexican mammals. *Journal of Mammalogy*. 28: 40-57.
- Hooper ET. Handley CO. JR. 1948. Character gradients in the spiny pocket mouse, *Liomys irroratus*. *Occasional papers of the Museum of Zoology*. University of Michigan. 514: 1-34.
- Knowles LL. Carstens BC. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*. 56: 887-895.
- Hutchinson GE. 1957. *A treatise on Limnology*. New York: Wiley & Sons. 1015 pp.
- Lambert DM. Spencer HG (eds.) 1995. *Speciation and the recognition concept: Theory and application*. Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- Lentz DL. Bye R. Sánchez-Cordero V. 2008. Ecological niche modeling and distribution of wild sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Mexico. *International Journal of Plant Sciences*. 169: 541-549.
- Losos JB. Leal M. Glor RE. de Queiroz K. Hertz PE. Schettino L. Chamizo A. Jackman TR. Larson A. 2003. Niche lability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature*. 424: 542-545.
- Mallet J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 294-299.

- Martínez JJ. Gardenal CN. 2016. Phylogenetic relationships among species of the Neotropical genus *Graomys* (Rodentia: Cricetidae): contrasting patterns of skull morphometric variation and genetic divergence. *Biological Journal of the Linnean Society*. 118: 648-667.
- Masters JC. Rayner RJ. McKay IJ. Potts AD. Nails D. Ferguson JW. Weissenbacher BK. Allsopp M. Anderson ML. 1987. The concept of species: Recognition versus isolation. *South African Journal of Science*. 83: 534-537.
- Matocq MD. 2002. Morphological and molecular analysis of a contact zone in the *Neotoma fuscipes* species complex. *Journal of Mammalogy*. 83: 866-883.
- Mayden RL. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. En: M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson (eds). *Species: The units of biodiversity* (pp. 381-424). Chapman and Hall, Londres.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press. 349 pp.
- Mayr E. 1982. *The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance*. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts.
- Meier R. Willmann R. 2000. The Hennigian species concept. Pages 30-43 in *Species concepts and phylogenetic theory* (Q. D. Wheeler and R. Meier. eds.). Columbia University Press. New York.
- Merriam CH. 1902. Twenty new pocket mice (*Heteromys* and *Liomys*) from Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 15: 41-50.
- Michener CD. 1970. Diverse approaches to systematics. *Journal of Evolutionary Biology*. 4: 1.
- Mishler BD. 1985. The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *Bryologist*. 88: 207-214.
- Nava E. 2016. *Sistemática de *Reithrodontomys megalotis* a partir de datos moleculares y morfométricos*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Biodiversidad y Conservación. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). 165 pp.
- Nelson G. Platnick NI. 1981. *Systematics and biogeography*. Columbia University Press. New York.
- Nixon KC. Wheeler QD. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*. 6: 211-223.
- O'Meara BC. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology*. 59: 59-73.
- Padial JM. Miralles A. De la Riva I. Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 7: 16.
- Paterson HEH. 1985. The recognition concept of species. Pages 21-29 in *Species and speciation* (E. S. Vrba. ed.). Transvaal Museum. Pretoria.
- Patton JL. Conroy CJ. 2017. The conundrum of subspecies: morphological diversity among desert populations of the California vole (*Microtus californicus*, Cricetidae). *Journal of Mammalogy*, 98: 1010-1026.

- Paz A. Crawford AJ. 2012. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: A comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of Biosciences*. 37: 887-896.
- Pentinsaari M. Vos R. Mutanen M. 2016. Algorithmic single-locus species delimitation: effects of sampling effort, variation and non-monophyly in four methods and 1870 species of beetles. *Molecular Ecology Resources*. 17: 393-404.
- Peppers LL. Bradley RD. 2000. Cryptic species in *Sigmodon hispidus*: Evidence from DNA sequences. *Journal of Mammalogy*. 81: 332-343.
- Peters W. 1874. Die Taschenmäuse. Nager mit äusseren taschenförmigen Backentaschen. und eine neue Art Derselben. *Heteromys adpersus*. aus Panama Monatsb. preuss. Akademie Wiss. Berlin. 354-359.
- Peterson AT. Soberón J. Sánchez-Cordero V. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*. 285: 1265-1267.
- Pons J. Barraclough TG. Gomez-Zurita J. Cardoso A. Duran DP. Hazell S. Kamoun S. Sumlin WD. Vogler AP. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*. 55: 595-609.
- Puerto G. Da Graca SM. Theakston RDG. Thorpe RS. Warrell DA. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology*. 14: 527-38.
- Ramírez-Pulido J. González-Ruiz N. Gardner AL. Arroyo-Cabrales J. 2014. List of Recent Land Mammals of Mexico. 2014. Special publications. Museum of Texas Tech University. 76 pp.
- Reid NM. Carstens BC. 2012. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: A Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*. 12:196.
- Renner MAM. Heslewood MM. Patzak SDF. Schäfer-Verwimp A. Heinrichs J. 2017. By how much do we underestimate species diversity of liverworts using morphological evidence? An example from Australasian *Plagiochila* (Plagiochilaceae: Jungermanniopsida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 107: 576-593.
- Ricklefs RE. Latham RE. 1992. Intercontinental correlation of geographical ranges suggests stasis in ecological traits of relict genera of temperate perennial herbs. *The American Naturalist*. 139: 1305-1321.
- Riddle BR. Hafner DJ. Alexander LF. 2000a. Comparative phylogeography of Bailey's pocket mouse (*Chaetodipus baileyi*) and the *Peromyscus eremicus* species group: historical vicariance of the Baja California Peninsular desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17: 161-172.
- Riddle BR. Hafner DJ. Alexander LF. 2000b. Phylogeography and systematics of *Peromyscus eremicus* species group and historical biogeography of North American warm regional deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 17: 145-160.

- Ridley M. 1989. The cladistic solution to the species problem. *Biology and Philosophy*. 4: 1-16.
- Rivera PC. González-Ittig RE. Robainas Barcia A. Trimarchi LI. Levis S. Calderón GE. Gardenal CN. 2018. Molecular phylogenetics and environmental niche modeling reveal a cryptic species in the *Oligoryzomys flavescens* complex (Rodentia, Cricetidae). *Journal of Mammalogy*. 99: 363-376.
- Rogers DS. González MW. 2010. Phylogenetic relationships among spiny pocket mice (*Heteromys*) inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. *Journal of Mammalogy*. 91: 914-930.
- Rogers DS. Vance VL. 2005. Phylogenetics of Spiny Pocket Mice (Genus *Liomys*): Analysis of Cytochrome b based on multiple heuristic approaches. *Journal of Mammalogy*. 86 : 1085-1094.
- Rohlf FJ. 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor GJP, Slice DE (eds). *Advances in Morphometrics*. New York: Plenum Press. 117-129.
- Rosen DE. 1979. Fishes from the upland and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 162: 267-376.
- Ross KG. Gotzek D. Ascunce MS. Shoemaker DDW. 2010. Species delimitation: A case study in a problematic ant taxon. *Systematic Biology*. 59: 162-184.
- Ruane S. 2015. Using geometric morphometrics for integrative taxonomy: an examination of head shapes of milk snakes (genus *Lampropeltis*). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 174: 394-413.
- Sáez AG. Lozano E. 2005. Cryptic species: as we discover more examples of species that are morphologically indistinguishable, we need to ask why and how they exist. *Nature*. 433: 111.
- Santana SE. Cheung E. 2016. Go big or go fish: morphological specializations in carnivorous bats. *Proceedings of the Royal Society B*. 283: 1-9.
- Schlick-Steiner BC. Seifert B. Stauffer C. Christian E. Crozier RH. Steiner FM. 2007. Without morphology, cryptic species stay in taxonomic crypsis following discovery. *Trends in Ecology and Evolution*. 22: 148-155.
- Simpson GG. 1951. The species concept. *Evolution*. 5: 285-298.
- Sites Jr JW. Marshall JC. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 462-470.
- Sites Jr JW. Marshall JC. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 35: 199-227.
- Sneath PHA. Sokal RR. 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman. San Francisco.
- Sokal RR. Crovello TJ. 1970. The biological species concept: A critical evaluation. *The American Naturalist*. 104: 127-153.

- Soto-Vivas A. Liria J. De Luna E. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera. Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana*(n.s.). 27: 87-102.
- Struck TH. Feder JL. Bendiksbj M. Birkeland S. Cerca J. Gusarov VI. Kistenich S. Larsson KH. Liow LH. Nowak MD. Stedje B. Bachmann L. Dimitrov D. 2018. Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology & Evolution*. 33: 153-163.
- Sullivan J. Markert JA. Kilpatrick WC. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology*. 46: 426-440.
- Sullivan J. Arellano E. Rogers DS. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: Concerted versus independent responses to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*. 155: 755-768.
- Swiderski DL. 2003. Separating size from allometry: analysis of lower jaw morphology in the fox squirrel, *Sciurus niger*. *Journal of Mammalogy*. 84: 861-876.
- Taylor JW. Jacobson DJ. Kroken S. Kasuga T. Geiser DM. Hibbett DS. Fisher MC. 2000. Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 21-32.
- Templeton AR. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. Pages 3–27 in *Speciation and its consequences* (D. Otte and J. A. Endler. eds.). Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts.
- Templeton AR. 1998. Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. Pages 32-43 in *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard and S. H. Berlocher. eds.). Oxford University Press. New York.
- Templeton AR. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and boundaries. *Molecular Ecology*. 10: 779–91.
- Thomas O. 1893. Description of two new “pocket mice” of the genus *Heteromys*. *The Annals and magazine of natural history; zoology, botany, and geology*. 11: 329-332.
- Thomas O. 1901. New South-American *Sciuri*, *Heteromys*, *Cavia*, and *Caluromys*. *Annals and Magazine of Natural History*. 7: 192-196.
- Thompson JV. 1815. Description of a new species of the genus *Mus*, belonging to the section of pouched rats. *Transactions of the Linnean Society of London*. 11: 161-163.
- Vallejo RM. Guerrero JA. González-Cózatl FX. 2017. Patterns of differentiation and disparity in cranial morphology in rodent species of the genus *Megadontomys* (Rodentia: Cricetidae). *Zoological Studies*. 56: 1-14.
- Van der Molen. Martínez-Abadías SN. González-José R. 2007. *Introducción a la Morfometría Geométrica*. Conicet-Cenpat y Universitat de Barcelona.
- VanValen L. 1976. Ecological species. Multispecies, and oaks. *Taxon*. 25: 233-239.
- Villalba AL. 2006. Filogeografía de *Oryzomys chapmani* utilizando secuencias del gen mitocondrial citocromo b. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 71 p.

- Warren DL. Glor RE. Turelli M. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. 62: 2868-2883.
- Webster M. Sheets HD. 2010. A practical introducción to landmark-based geometric morphometrics. *The Paleontological Society Papers*. 16: 163-188.
- Weisrock DW. Shaffer HB. Storz BL. Storz SR. Voss SR. 2006. Multiple nuclear gene sequences identify phylogenetic species boundaries in the rapidly radiating clade of Mexican ambystomatid salamanders. *Molecular Ecology*. 15: 2489-2503.
- Wheeler QD. Meier R. eds. 2000. *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. New York: Columbia University Press. 256 pp.
- Wiens JJ. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 30: 327–362.
- Wiens JJ. Danoghue MJ. 2004. Historical biogeography. ecology and species richness. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: 639-644.
- Wiens JJ. Graham CH. 2005. Niche Conservatism: Integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 36: 519-39.
- Wiens JJ. Penkrot TA. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*. 51: 69–91.
- Wiens JJ. Servedio MR. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 267: 631–36.
- Wiley EO. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*. 27: 17-26.
- Williams DF. Genoways HH. Braun JK. 1993. Taxonomy and Systematics. Pp. 38-109 in *Biology of the Heteromyidae* (H. H. Genoways and J. H. Brown. eds.). Special Publication No. 10. American Society of Mammalogists.
- Wright S. 1940. The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. Pages 161–183 in *The new systematics* (J. Huxley. ed.). Oxford University Press. London.
- Zhang J. Kapli P. Pavlidis P. Stamatakis AA. 2013. General species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 29: 2869-2876.
- Zink RM. 1996. Bird species diversity. *Nature*. 381: 566.

Capítulo 2a. Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon

María A. Gutiérrez-Costa, Francisco X. González-Cózatl, María Magdalena Ramírez-Martínez, Luis Ignacio Iñiguez-Dávalos y Duke S. Rogers

[Este capítulo fue publicado en la Revista THERYA, 2021, Vol. 12(1):139-148, DOI:10.12933/therya-21-1051, ISSN 2007-3364]

Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon

MARÍA A. GUTIÉRREZ-COSTA¹, FRANCISCO X. GONZÁLEZ-CÓZATL^{1*}, MARÍA MAGDALENA RAMÍREZ-MARTÍNEZ², LUIS IGNACIO ÍÑIGUEZ-DÁVALOS², AND DUKE S. ROGERS³

¹ Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, CP.62209, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: maria.gutierrezcos@uaem.edu.mx (MAG-C), xavier@uaem.mx (FXG-C).

² Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara. Avenida Independencia Nacional 151, CP.48900, Autlán, Jalisco, México. E-mail: mmagdalena.ramirez@academicos.udg.mx (MMR-M), liniguez@cucsur.udg.mx (LII-D).

³ Monte L. Bean Life Science Museum and Department of Biology, Brigham Young University. CP.84602, Provo, Utah, United States. E-mail: duke_rogers@byu.edu (DSR).

* Corresponding author

Recent collecting surveys in the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, Jalisco (México), uncovered the existence of a new population of the Mexican spiny pocket mouse, *Heteromys irroratus*. Because the subspecies *H. i. bulleri* and *H. i. jaliscensis* occur nearby, our objective was to properly determine the taxonomic identity of the novel sample. Also, we evaluate its distinctiveness, both in terms of genetic divergence and phylogenetic placement, relative to other members of *H. irroratus*. Preliminary, we compared external and cranial measurements of recently collected individuals to those reported for representatives of the subspecies of *H. irroratus* occurring close by. In addition, we examined levels of genetic differentiation and phylogenetic relationships, based on sequence data of the Cytochrome *b*, among this population and other members of *H. irroratus*, including an individual from Sierra de Juanacatlán, Jalisco, the type locality of *H. i. bulleri*. Phylogenetic relationships were estimated using Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods and levels of genetic divergence were assessed employing Kimura-2-parameters genetic distances. Samples from Sierra de Manantlán and Sierra de Juanacatlán were grouped together in a well-supported haplogroup and genetic distances between them were lower than < 1.02 %. Our phylogenetic hypothesis shows that *H. i. bulleri* represents the sister group to all other samples of *H. irroratus* but that, genetically, is a very divergent lineage. Distances values between *H. i. bulleri* to any of the other groups were > 10.05 %. Comparison of external and cranial measurements showed that, in average, individuals from Sierra de Manantlán are larger than those of *H. i. jaliscensis*, but more similar in size to *H. i. bulleri*. Our results show that the new population of the Mexican spiny pocket mouse from Sierra de Manantlán belongs to *H. i. bulleri*. In addition, the phylogenetic separation and the high levels of genetic divergence of *H. i. bulleri*, relative to other members of *H. irroratus*, suggest that the first should be recognized as a species-level taxon. Considering the scarce collecting records of *H. i. bulleri* and the known area of occurrence, that is very restricted, this taxon may warrant special conservation status.

Colectas realizadas recientemente en la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco (México), permitieron descubrir la existencia de una nueva población del ratón espinoso de abazones mexicano, *Heteromys irroratus*. Debido a que las subespecies *H. i. bulleri* y *H. i. jaliscensis* ocurren en áreas cercanas, nuestro objetivo fue determinar de forma apropiada la identidad taxonómica de la nueva muestra. Adicionalmente, evaluamos su posible distinción, en términos de su divergencia genética y posición filogenética, en relación con otros miembros de *H. irroratus*. Inicialmente comparamos medidas externas y craneales de los individuos colectados recientemente con las reportadas para representantes de las subespecies de *H. irroratus* que ocurren en zonas cercanas. Adicionalmente, examinamos niveles de diferenciación genética y las relaciones filogenéticas, basadas en secuencias del gen Citocromo *b*, entre esta población y representantes de otros miembros de *H. irroratus*, incluyendo un individuo de Sierra de Juanacatlán, Jalisco, la localidad tipo de *H. i. bulleri*. Las relaciones filogenéticas fueron estimadas con métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana y los niveles de divergencia genética fueron evaluados con distancias genéticas corregidas con el modelo de 2 parámetros de Kimura. Las muestras de Sierra de Manantlán y Sierra de Juanacatlán fueron agrupadas en un haplogrupo bien soportado y las distancias genéticas entre ellas fueron menores a < 1.02 %. Nuestra hipótesis filogenética indica que *H. i. bulleri* representa el grupo hermano de todas las otras muestras de *H. irroratus*, pero que, genéticamente, es un linaje muy divergente. Los valores de distancia entre *H. i. bulleri* y cualquiera de los otros grupos fueron > 10.05 %. La comparación de medidas externas y craneales mostró que, en promedio, los individuos de Sierra de Manantlán son más grandes que los de *H. i. jaliscensis* y más similares en tamaño a los de *H. i. bulleri*. Nuestros resultados muestran que la nueva población del ratón espinoso de abazones mexicano de Sierra de Manantlán pertenece a *H. i. bulleri*. Adicionalmente, la separación filogenética y los altos niveles de divergencia genética de *H. i. bulleri*, en relación con otros miembros de *H. irroratus*, sugieren que el primero debe ser reconocido como un taxón con la categoría de especie. Considerando los escasos registros de colecta reportados para *H. i. bulleri* y el área de distribución conocida, que es muy restringida, este grupo podría ser candidato a tener un estatus especial de conservación.

Keywords: Cytochrome *b*; genetic divergence; Mexican spiny pocket mouse; phylogeny; valid species.

© 2021 Asociación Mexicana de Mastozoología, www.mastozoologiamexicana.org

Introduction

Heteromys irroratus, the Mexican spiny pocket mouse, is a species widely distributed in México and in a small portion of the United States. In México, it is found on the Mexican Plateau and in adjacent areas, and along the main mountain systems and coastal slopes (Genoways 1973; Dowler and Genoways 1978). Altitudinally, *H. irroratus* occurs from sea level, across the coasts of Tamaulipas and Veracruz to nearly 3,050 m in the highlands of the Sierra Madre de Sur, in México. It can be found mainly in xerophilous scrubland thorny forest, although it also occurs in coniferous and oak forests, and agricultural, and grazing lands (Dowler and Genoways 1978). Currently, seven subspecies are recognized (*H. irroratus alleni*, *H. i. bulleri*, *H. i. guerrensis*, *H. i. irroratus*, *H. i. jaliscensis*, *H. i. texensis*, and *H. i. torridus*; Genoways 1973; Dowler and Genoways 1978). Of the seven, *H. i. bulleri* has the most restricted distribution.

Heteromys i. bulleri was described by Thomas (1893) from La Laguna, Sierra de Juanacatlán, Jalisco (México) and is only known from seven specimens collected in the mid-1960's; two from the type locality and five more from the vicinity of Soyatlán del Oro, Jalisco (Genoways 1973). These two localities are approximately 60 km from each other in the western portion of the state (Figure 1). Although this taxon was described almost 130 years ago, little is known about its natural history.

Recent surveys in the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, in the southwestern portion of Jalisco (México), uncovered the existence of a new population of *H. irroratus*. Although *H. i. jaliscensis* has been reported from localities not far from the Biosphere Reserve and its type locality is about 50 km distant from Sierra de Manantlán, specimens representing this population did not resemble *H. i. jaliscensis* morphologically. External and cranial measurements of individuals of the new population (Table 1) are larger than the ones reported for individuals of *H. i. jaliscensis* (including samples from its type locality; Genoways 1973). Therefore, considering that *H. i. bulleri* also occurs in Jalisco, although in a different area, our aim was to assess the sub-specific assignment of the Manantlán Biosphere Reserve specimens. Due to the fact that there are only two specimens of *H. i. bulleri* from the type locality (holotype at the British Museum (Natural History), London, United Kingdom, and a topotype at the National Museum of Natural History, United States) and a direct comparison with them was not possible, field work was conducted at the type locality of *H. i. bulleri* to obtain samples to compare with specimens of the new population using Cytochrome *b* (Cyt *b*) sequences. In this study, we report the findings of the molecular identification of the novel samples and their distinctiveness, both in terms of genetic divergence and phylogenetic placement, compared to available sequence data for *H. irroratus*.

Material and methods

Eight specimens of the new population of *Heteromys irroratus* were collected at Las Joyas Scientific Station, located in the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, Municipality

of Autlán, Jalisco, México (19° 35.443' N, -104° 16.913' W) at 1,957 masl. The area is characterized by pine-oak forest and cloud forest, but spiny pocket mice were captured near a field of *Zea diploperennis*, an endemic perennial species of teosinte or wild corn. Voucher specimens (preserved in alcohol) were deposited in the Colección Zoológica de Vertebrados, Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara (CVUDG: 1675, 1676, 1710, 1711, 1713, 1714, 1715, 1716). An additional individual of *H. irroratus* was collected at La Laguna, Sierra de Juanacatlán, Municipality of Mascota, Jalisco, México (20° 37.687' N, -104° 43.752' W), at 2,050 masl, which represents the type locality of the subspecies *H. i. bulleri*. This specimen was caught in secondary vegetation within a pine-oak forest next to a lake. The voucher specimen (preserved as skin and skeleton) is stored in the Colección de Mamíferos del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CMC 3590). Sequences generated as part of this study were uploaded to GenBank and accession numbers are included in Appendix 1. Capture and handling methods followed the animal care and use guidelines of the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2016).

Three external and nine cranial measurements, described by Genoways (1973), were recorded for seven adult specimens of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán (four females and two males) and one adult specimen from Sierra de Juanacatlán (one female; see Table 1). External measurements were obtained from collecting field catalogs, while cranial measurements were recorded by means of a digital caliper with accuracy of 0.1 mm. Discrimination of age categories that represent adult individuals was based on tooth-wear patterns described by Genoways (1973). Measurements were compared to data recorded by Genoways (1973) for individuals of *H. i. bulleri* and *H. i. jaliscensis* occurring near Sierra de Manantlán and Sierra de Juanacatlán. Because

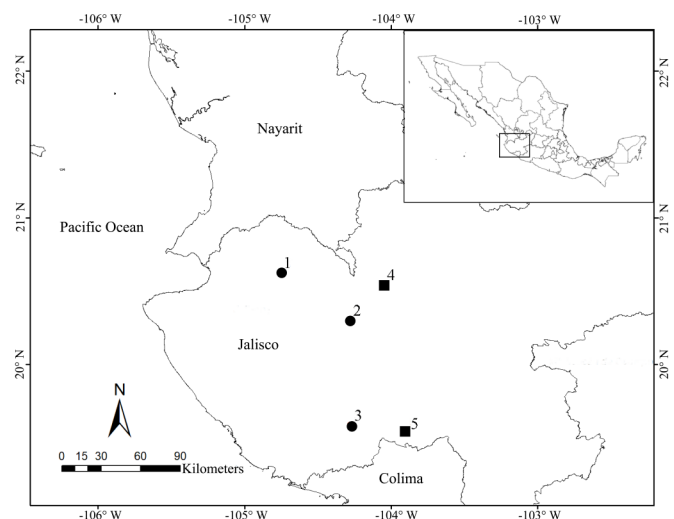


Figure 1. Map illustrating collecting records of *Heteromys irroratus bulleri* (dots) and *H. i. jaliscensis* (squares). 1) La Laguna, Sierra de Juanacatlán (*H. i. bulleri* type locality). 2) Soyatlán del Oro (Genoways 1973). 3) Sierra de Manantlán Biosphere Reserve (current study). 4) Vicinity of Ameca (molecular data from specimens collected at this locality are included in current study as *H. i. jaliscensis*). 5) Las Canoas (*H. i. jaliscensis* type locality).

[Genoways \(1973\)](#) documented that female specimens of *H. i. jaliscensis* are smaller than males, comparison of measurements among specimens of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán and Sierra de Juanacatlán and *H. i. jaliscensis* were performed by sex. Box plots of external and cranial measurements were generated using STATISTICA v.8.0 ([StatSoft 2007](#)).

Total genomic DNA from the newly collected specimens was extracted from liver tissue preserved in 95 % ethanol following the procedure described by [Fetzner \(1999\)](#). Four microliters of DNA were electrophoresed on 1.75 to 2.0 % agarose gels stained with SYBR Green to visualize quality of genomic DNA. MVZ05 and MVZ14 primers ([Smith and Patton 1993](#); [Arellano et al. 2005](#)) were used to amplify the Cyt *b* gene (1140 bp). PCR master mix contained: 1.0 µl of template DNA (approximate concentration estimated on a 2 % agarose gel), 1 µl of deoxynucleosidetriphosphates (10 mM), 5 µl of 10x Taq buffer containing MgCl₂, 1 µl of each primer (100 mM concentration), 40.7 µl of distilled water, and 0.3 µl of Taq polymerase (5 U/µl; Promega Corp., Madison, Wisconsin) for a 50 µl final volume. Standard amplification conditions consisted of 2 to 4 min at 94 °C for initial denaturation (1 cycle); then, 1 min at 94 °C for denaturation, 1 min at 45 °C for annealing, and 1 min at 72 °C for extension (35 cycles); lastly, 5 min at 72 °C for final extension (1 cycle). Four microliters of PCR-amplified product were assayed by electrophoresis on a 2 % agarose gel. PCR products were purified with a Gene-Clean PCR purification kit (Bio 101, La Jolla, California). Sequencing reactions of purified PCR products were done with the Perkin-Elmer ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, California). Excess dye terminator was removed using a Sephadex 50G solution (3 g/50 ml H₂O). Light- and heavy-strand sequences were determined with an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) housed in the DNA Sequencing Center at Brigham Young University. Final sequences were edited using BioEdit v.7.0.8.0 ([Hall 1999](#)). GenBank sequences accession numbers are MT709150, 709151, 709152, 709153, 709154, 709155, 709156, T709157, and (see Appendix 1 for correspondence of accession numbers and voucher collecting information).

New sequences were added to a matrix together with 33 Cyt *b* sequences of *H. irroratus* available from GenBank and representing the following subspecies: *H. i. alleni*, *H. i. guerrensis*, *H. i. irroratus*, *H. i. jaliscensis*, *H. i. torridus*, and *H. i. texensis* (first described by Rogers and Vance 2005; Appendix 1). Also, sequences of *H. pictus* accessible from GenBank were downloaded and used as the outgroup in phylogenetic analyses (Appendix 1). Our final matrix included 786 bp of Cyt *b*.

Sequence alignment was done with BioEdit v.7.0.8.0 ([Hall 1999](#)). Hypotheses concerning phylogenetic relationships among sequences were estimated using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) employing IQ-TREE v.1.6.10 ([Kalyanamoorthy et al. 2017](#); [Nguyen et al. 2015](#)) and MrBayes v.3.2.2 ([Ronquist et al. 2012](#)) on XSEDE, respectively. The model of DNA evolution most appropriate

for our data was selected using jModelTest2 on XSEDE ([Darriba et al. 2012](#)) under the Bayesian information criterion (BIC). To assess if data needed to be partitioned by codon position, we employed ModelFinder ([Kalyanamoorthy et al. 2017](#)). The transition model 2 with invariable sites and rate heterogeneity (TIM₂+I+G4; [Tamura and Nei 1993](#)) was determined as the best-fit model of nucleotide substitution ($\pi A = 0.288$, $\pi C = 0.248$, $\pi G = 0.142$, and $\pi T = 0.323$; rAC/AT = 1.000/1.000, rCG/GT = 1.000/1.000; I = 0.475; $\alpha = 0.224$), and the data were not partitioned. For the ML analysis, tree searches were performed employing IQ-TREE default search parameters. Branch support was assessed through ultrafast bootstrap (UB) with 1,000 replicates ([Hoang et al. 2018](#)). For the BI analyses, runs were specified with four of MCMC chains and 50,000,000 generations, with a sample frequency of 1,000 generations. This resulted in 50,000 samples from the posterior probability (PP) distribution. Burn-in value was set to 10,000. This resulted in 50,000 samples and the burn-in value was set to 10,000. The posterior probability (pP) was computed for individual branches by constructing a majority-rule consensus with the trees not discarded as burn-in. Once the main phylogenetic haplogroups were identified, uncorrected (p-distances) and Kimura-2-parameters (K2P; [Kimura 1980](#)) genetic distances were calculated employing Mega v.7.0.3 ([Kumar et al. 2016](#)). The former genetic measurement is provided for further comparison to other mammal taxa. The latter genetic distance was compared between selected sequences of *H. irroratus* since it has been widely used to compare levels of DNA sequence divergence in mammals under the Genetic Species Concept framework ([Bradley and Baker 2001](#); [Baker and Bradley 2006](#)).

Results

External and cranial measurements among specimens of the new population of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán and individuals of *H. i. jaliscensis* showed overlap in the ranges displayed by most variables for both females and males (Table 1; Figures 2, 3). On average, the four adult females of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán are larger than the females of *H. i. jaliscensis*. This is particularly evident for three external measurements (total length, length of tail, length of hind foot; Figures 2a-c) and five cranial variables (greatest length of skull, mastoid breadth, length of nasals, length of maxillary toothrow, depth of braincase; Table 1; Figures 2d-j). The two adult males from Sierra de Manantlán showed larger mean values for three cranial measurements (mastoid breadth, length of nasals, and depth of braincase) compared to males of *H. i. jaliscensis* (Table 1; Figures 3f-j). The only adult female specimen of *H. irroratus* from Sierra de Juanacatlán, also displayed larger values for all three external and seven cranial measurements compared to average values depicted by females of *H. i. jaliscensis* (Table 1; Figures 2a-j). Mean lengths of the adult females of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán and Sierra de Juanacatlán were more similar to the mean measurements of specimens of *H. i. bulleri* reported by

Table 1. External and cranial measurements (in mm) for specimens of *H. i. jaliscensis* and *H. i. bulleri*. When more than one individual was available, the range is shown for each variable. Mean values are in parentheses. Sierra de Manantlán (SM), Sierra de Jaunacatlán (SJ).

External and cranial measurements	Genoways (1973)			This study		
	<i>H. i. jaliscensis</i>		<i>H. i. bulleri</i> *	<i>H. i. bulleri</i> SM		<i>H. i. bulleri</i> SJ
	Females (n = 51)	Males (n = 38)	Females (n = 3)	Females (n = 4)	Males (n = 2)	Female (n = 1)
Total length	207.0-251.0 (226.9)	212.0-272.0 (238.3)	245.0-250.0 (247.4)**	226.0-255.0 (245.5)	228.0-249.0 (238.0)	249.0
Length of tail	101.0-131.0 (114.1)	103.0-140.0 (118.7)	127.0-128.0 (127.4)**	113.0-134.0 (125.0)	125.0	128.0
Length of hind foot	25.0-30.0 (27.3)	26.5-32.0 (28.9)	27.0-32.0 (29.3)**	26.0-32.0 (29.2)	25.9-30.0 (27.8)	33.0
Greatest length of skull	30.1-33.2 (31.6)	30.4-35.1 (32.6)	33.5-34.1 (33.8)	31.8-33.5 (32.7)	33.7	32.0
Interorbital constriction	7.2-8.6 (7.8)	7.2-9.0 (8.0)	8.2-8.7 (8.5)	7.6-8.1 (8.0)	7.7-7.9 (7.8)	8.7
Mastoid breadth	13.8-14.7 (14.2)	13.8-15.9 (14.8)	14.8-15.5 (15.1)	14.4-15.4 (14.8)	14.8-15.3 (15.0)	14.6
Length of nasals	11.0-13.5 (12.1)	11.4-13.4 (12.3)	13.2-14.1 (13.6)	13.2-14.6 (14.1)	14.4-14.6 (14.5)	13.9
Length of rostrum	12.9-14.9 (13.8)	12.2-15.7 (13.7)	15.3** (15.3)	12.8-14.4 (13.9)	14.1-14.5 (14.3)	13.6
Length of maxillary toothrow	4.4-5.4 (4.8)	4.8-5.8 (5.3)	5.9-6.0 (5.9)	5.5-5.9 (5.6)	5.2-5.3 (5.2)	5.3
Depth of braincase	8.2-9.1 (8.6)	8.2-9.3 (8.7)	9.4-10.0 (9.7)**	9.2-9.8 (9.5)	9.4-9.7 (9.5)	9.4
Interparietal width	7.3-9.5 (8.3)	7.9-9.8 (8.7)	5.4-8.0 (6.7)	7.4-7.8 (7.8)	7.4	8.6
Interparietal length	2.5-4.4 (3.2)	3.0-4.4 (3.6)	3.2-3.9 (3.6)	3.7-4.2 (3.9)	3.9	4.1

*Samples included two adult females from La Laguna, Sierra de Jaunacatlán (type locality) and one adult female from Soyatlán del Oro.

**Data preceded by two asterisks were recorded for only two specimens.

Genoways (1973), particularly two external variables (total length and length of tail; Table 1; Figures 2a, 2b) and one cranial measurement (length of nasals; Table 1; Figure 2g).

Phylogenies derived from ML (Figure 4) and BI (not shown) were highly congruent. Sequences from Sierra de Manantlán grouped together with high nodal support (UB = 91 and PP = 0.99). In turn, the sequence from Sierra de Jaunacatlán (CMC 3590) joined those sequences from Sierra de Manantlán forming a strongly supported haplogroup (UB = 100 and PP = 1.0; Figure 4). The *H. i. bulleri* haplogroup was positioned as a divergent sister group to the other sequences of *H. irroratus*. The remaining sequences of *H. irroratus* formed a monophyletic group with strong nodal support values (84 / 0.99). This clade contained representatives of the other six subspecies of *H. irroratus* (*alleni*, *guerrensis*, *irroratus*, *jaliscensis*, *texensis*, and *torridus*). Sequences

of each subspecies formed separate haplogroups, with the exception of *H. i. alleni*. Sequences representing this subspecies split into two independent lineages, *H. i. alleni* (1) and *H. i. alleni* (2). Although two divergent lineages were also found within *H. i. texensis*, they are sister to each other. In summary, we identified a total of eight haplogroups within *H. irroratus*.

Pairwise K2P genetic distances (Kimura 1980) between localities 1 and 3 of *H. i. bulleri* (Figure 1) ranged between 0.63 % and 1.02 % with a mean of 0.84 % (Table 2). In contrast, the mean K2P genetic distance between individuals of *H. i. bulleri* and the other haplogroups ranged from 10.05 % (*H. i. jaliscensis*) to 11.94 % (*H. i. irroratus*). Among all haplogroups of *H. irroratus*, except *H. i. bulleri*, K2P distances ranged between 1.59 % (*H. i. guerrensis*-*H. i. irroratus*) and 8.34 % (*H. i. jaliscensis*-*H. i. alleni* (2); Table 2).

Table 2. Pairwise Kimura-2-parameter distances (below the diagonal) and p-distances (above the diagonal), between samples of *Heteromys irroratus* based on 786 bp of the Cytochrome *b* gene.

Taxon	<i>H. i. irroratus</i>	<i>H. i. texensis</i>	<i>H. i. alleni</i> (1)	<i>H. i. jaliscensis</i>	<i>H. i. alleni</i> (2)	<i>H. i. guerrensis</i>	<i>H. i. torridus</i>	<i>H. i. bulleri</i>
<i>H. i. irroratus</i>		0.0694	0.0635	0.0705	0.0734	0.0157	0.0564	0.1079
<i>H. i. texensis</i>	0.0742		0.0407	0.0505	0.0744	0.0637	0.0405	0.1016
<i>H. i. alleni</i> (1)	0.0675	0.0423		0.0364	0.0657	0.0619	0.0233	0.0930
<i>H. i. jaliscensis</i>	0.0751	0.0527	0.0375		0.0776	0.0636	0.0449	0.0927
<i>H. i. alleni</i> (2)	0.0789	0.0800	0.0701	0.0834		0.0725	0.0623	0.1049
<i>H. i. guerrensis</i>	0.0159	0.0678	0.0659	0.0674	0.0780		0.0534	0.1025
<i>H. i. torridus</i>	0.0595	0.0421	0.0238	0.0467	0.0662	0.0563		0.0973
<i>H. i. bulleri</i>	0.1194	0.1116	0.1013	0.1005	0.1160	0.1129	0.1064	

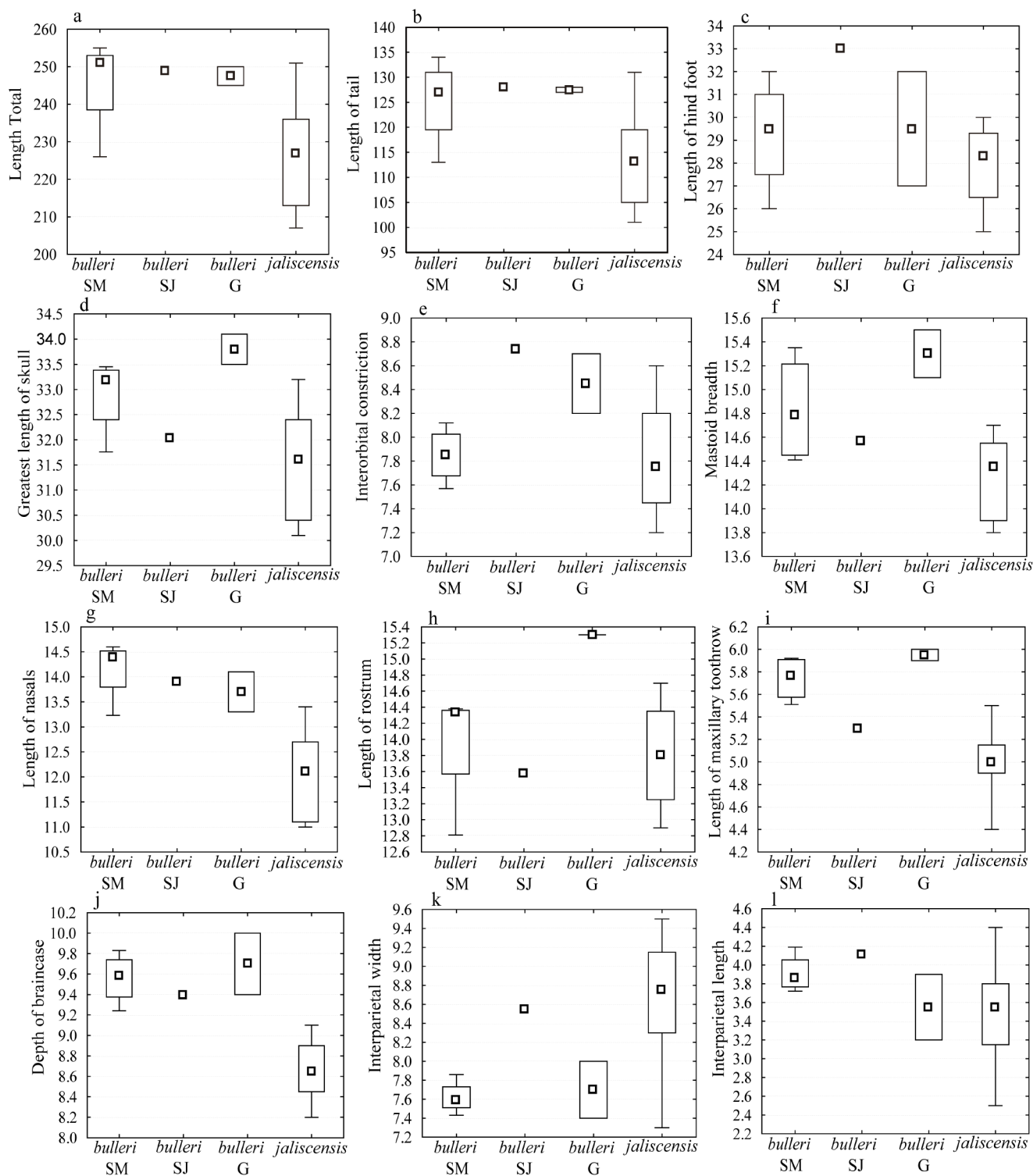


Figure 2. Box plots of female measurements of individuals of *H. i. bulleri* from Sierra de Manantlán (*bulleri* SM), *H. i. bulleri* from Sierra de Juanacatlán (*bulleri* SJ), *H. i. bulleri* from Genoways (1973; *bulleri* G), and *H. i. jaliscensis* from Genoways (1973; *jaliscensis*). Median (small squares), 25% to 75% confidence interval (rectangles), and minimum and maximum values (whiskers).

Discussion

This study focuses on the molecular taxonomic identification of individuals of a new populations of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, a locality in southern Jalisco (México), and its phylogenetic placement within this group. Our initial identification assessment involved the comparison of external and cranial measurements to *H. i. jaliscensis* and *H. i. bulleri*, two subspecies of this taxon

occurring not far from this new collecting locality. Yet, ranges of measurements between adult females from Sierra de Manantlán and those of *H. i. jaliscensis* overlap, the former are on average larger than the latter (Table 1, Figures 2, 3). Although differences in length between males from Sierra de Manantlán and *H. i. jaliscensis* were not evident for most variables, specimens from Sierra de Manantlán displayed larger mastoid breadth, length of nasals, length of rostrum,

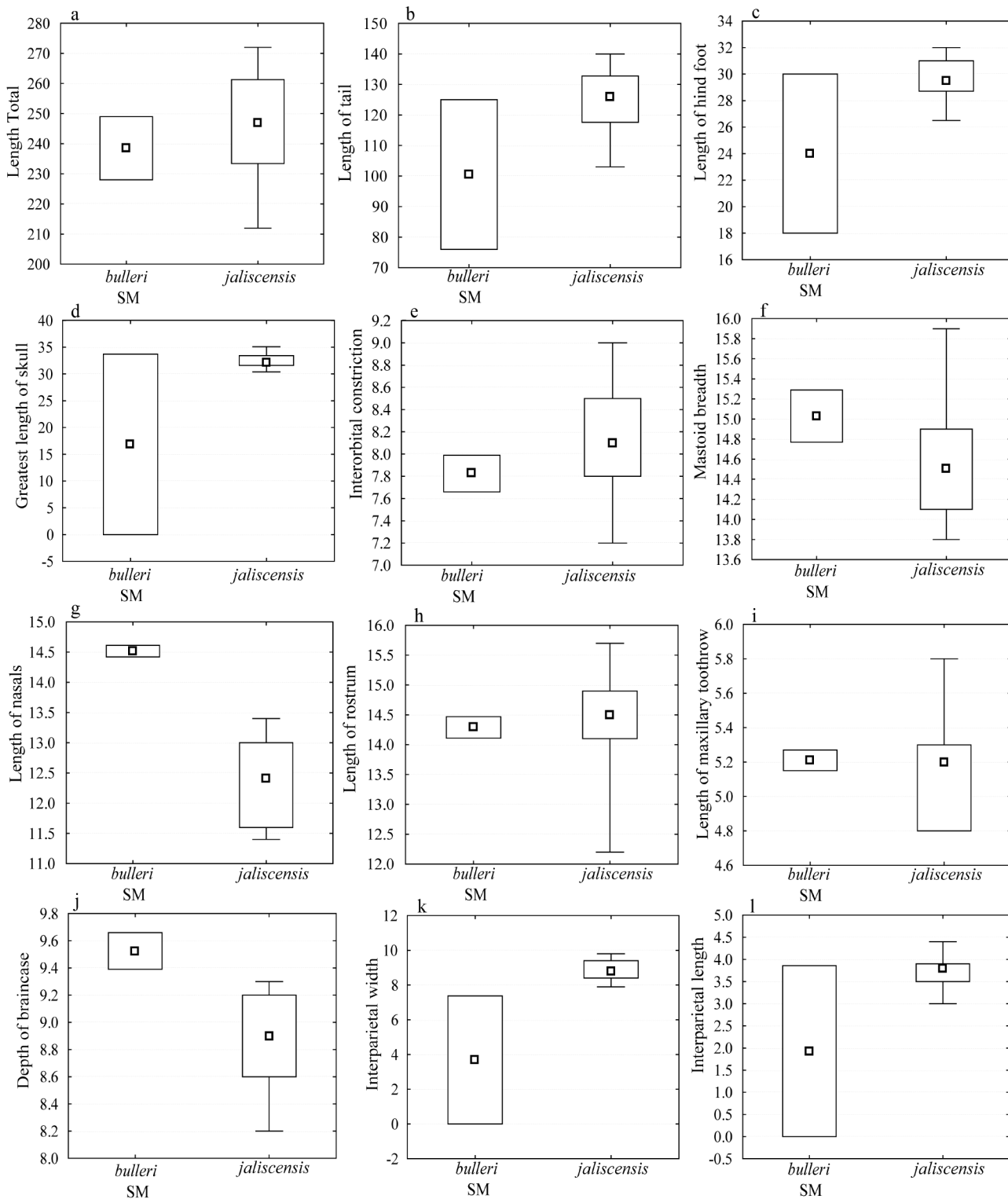


Figure 3. Box plots of male measurements of individuals of *H. i. bulleri* from Sierra de Manantlán (*bulleri* SM) and *H. i. jaliscensis* from Genoways (1973; *jaliscensis*). Median (small squares), 25% to 75% confidence interval (rectangles), and minimum and maximum values (whiskers).

and depth of braincase. On the other hand, measurements of females from Sierra de Manantlán were similar to those of *H. i. bulleri* reported by [Genoways \(1973\)](#). These results, principally the data recorded for females, preliminary suggest that specimens of the new population of *H. irroratus* from Sierra de Manantlán were not representatives of *H. i. jaliscensis*, but rather, represented the subspecies *H. i. bulleri*. In addition, the female specimen collected at the

type locality of *H. i. bulleri* (La Laguna, Sierra de Juanacatlán), exhibited measurements that better agree with those reported for *H. i. bulleri* than for *H. i. jaliscensis* (Genoways, 1973 [Genoways 1973](#)), suggesting that this individual also belongs to the former taxon. This is in agreement with the findings reported by [Genoways \(1973\)](#) who concluded that *H. i. bulleri* can be discriminated from *H. i. jaliscensis* (and other subspecies) by its larger external and cranial size.

Although, it was not possible to make a comparison with type specimens of *H. i. bulleri*, color patterns (fresh pelage) of the individual collected at the type locality (upperparts gray mixed with black and ochraceous hairs; sides with a pale ochraceous line; underparts white; feet white; ears dusky with a white edge; tail bicolor, brown above and white below) match those described for *H. i. bulleri* (Thomas 1893; Goldman 1911), supporting the assignment of this specimen to this taxon. Although *Heteromys pictus* could also occur at the type locality of *H. i. bulleri*, it can be distinguished from *H. irroratus* by the presence of six plantar tubercles on each hind foot (compared to five plantar tubercles displayed by *H. irroratus*; Genoways 1973) and overall smaller size. The fact that all the specimens of *Heteromys* from Sierra de Manantlán and Sierra de Juanacatlán collected for our study possess five plantar tubercles on each hind foot, supports the hypothesis they are representatives of *H. irroratus*.

When comparing Cyt *b* sequence data between the sample from Sierra de Juanacatlán (type locality of *H. i. bulleri*) to any of the individuals from Sierra de Manantlán, the genetic distance values were < 1.02 % (mean 0.84 %), lower than the upper bound (1.8 %) of the intrasubspecific range reported by Bradley and Baker (2001) for Cyt *b* in rodents. This suggests a close affinity between individuals from the Sierras de Juanacatlán and Manantlán and supports that

they represent the same subspecies. This hypothesis is also supported by the fact that all these sequences formed a single haplogroup with strong nodal support. Since the sample from Sierra de Juanacatlán represents the type locality of *H. i. bulleri*, we propose that specimens from the Sierra de Manantlán also represent *H. i. bulleri*. Certainly, confirmation of this findings would be desirable by analyzing additional data such as nuclear markers and morphological features.

Although we did not have molecular data for *H. i. jaliscensis* from its type locality (Las Canoas, Jalisco) to confirm that specimens from Sierra de Manantlán do not belong to that subspecies, we included representatives of *H. i. jaliscensis* from Ameca, Jalisco. Samples of *H. irroratus* from these two localities (Las Canoas and Ameca), were analyzed morphologically by Genoways (1973) and regarded as the same subspecies. The levels of genetic differentiation between *H. i. jaliscensis* and specimens from Sierra de Manantlán were comparatively high (10.05 %; Table 2), supporting the hypothesis that they represent distinct subspecies.

Our phylogenetic hypothesis places *H. i. bulleri* as the sister group to all other forms of *H. irroratus* (Figure 4). The reciprocal monophyly of these two clades was well supported (*H. i. bulleri* = 100/1.0; other *H. irroratus* = 84/0.98). Likewise, the high degree of genetic divergence among sequences of these two clades was documented with K2P;

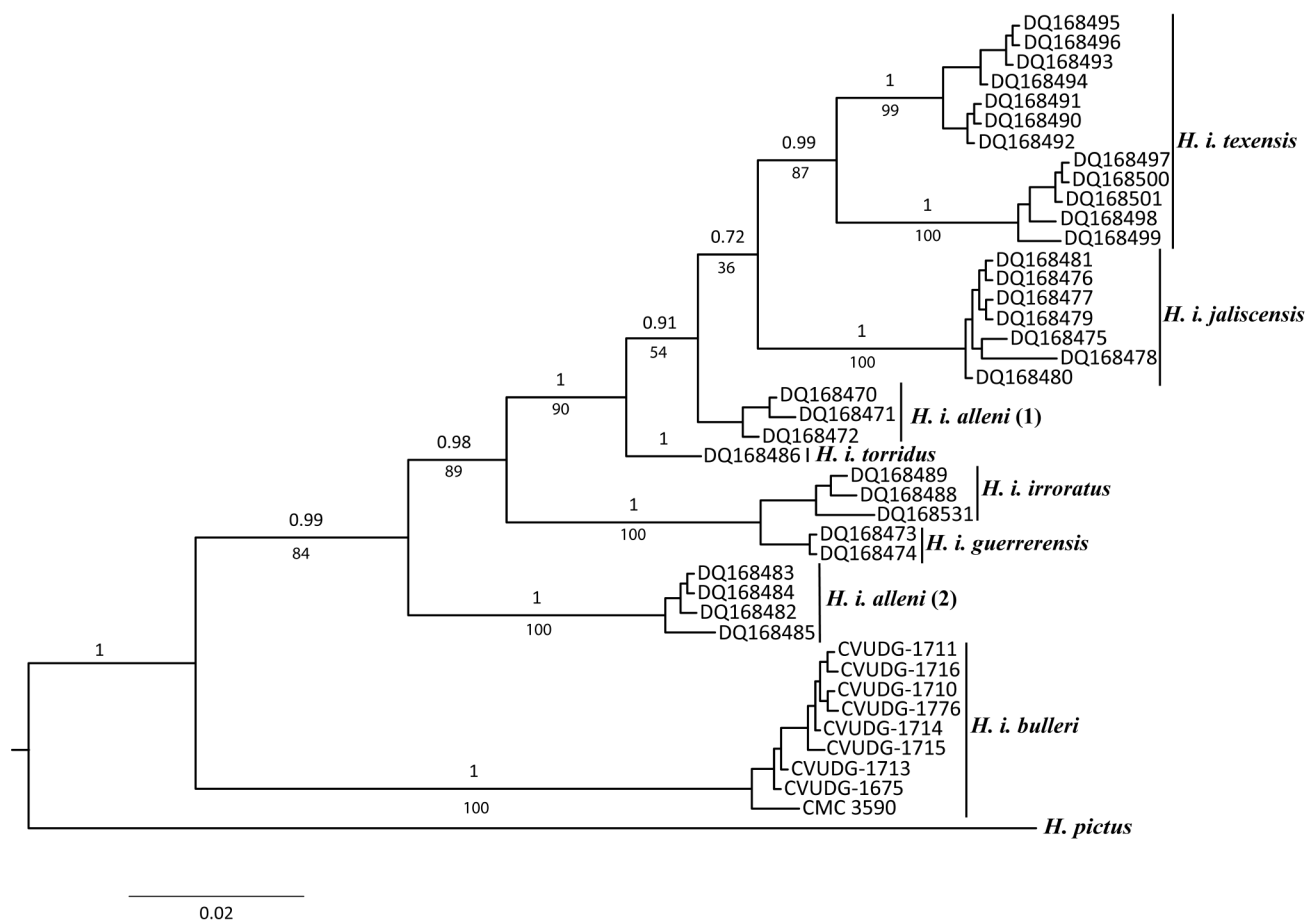


Figure 4. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* sequences based on 786 bp of the Cytochrome *b* gene (lnL = -3357.567). Posterior probability estimates are shown above branches and bootstrap values are below branches.

in any pairwise comparison between these two groups, genetic distances exceeded 10%. This level of *Cyt b* genetic differentiation can be indicative of distinct species (Bradley and Baker 2001; Baker and Bradley 2006).

Although *H. i. bulleri* is currently recognized as a subspecies (Genoways 1973), it was originally described as a species by Thomas (1893:330) because it had a “skull strong and stoutly built, differing mainly from that of *H. alleni* in its much greater size, and from that of *H. irroratus* by its differently shaped interparietal”. The specific status of *H. i. bulleri* was supported by Goldman (1911:62) who wrote: “In external appearance it resembles *alleni* and *jaliscensis*, but the cranial characters, especially the decidedly smaller size and more triangular shape of the interparietal, distinguish it from either”. Genoways (1973), based on a morphological analysis of all known forms of the Mexican spiny pocket mouse, found that samples of *H. i. bulleri* possessed deeper braincases, compared to other groups of *H. irroratus*. *Heteromys i. bulleri* also was separated from all other samples of *H. irroratus* in a Principal Component Analysis. In addition, a UPGMA phenogram showed that, at least for the sample from Soyatlán del Oro, is quite distinct from the rest of samples representing the Mexican spiny pocket mouse. Finally, Genoways (1973:106) observed that “the small size of the interparietal is rather unique” for *bulleri*, although he pointed out that this feature was shared with a population of *H. i. alleni* from Michoacán. However, he concluded that, due to the high variation of the shape and size of the interparietal bone in *H. irroratus* and other species in the genus, specific distinction of *bulleri* should not be based on that single character, and therefore, he relegated it to the sub-specific level.

Although our molecular data represent a portion of a single mitochondrial gene, the level of genetic differentiation documented by this marker for *H. i. bulleri* relative to other samples of *H. irroratus*, suggest that it represents a distinct species-level taxon. However, we believe that additional data (both molecular and morphological) are necessary to further test the specific status of this taxon.

The fact that *H. i. bulleri* should be considered a distinct species supports previous views suggesting that *H. irroratus* is a species complex containing some species-level lineages (Rogers and Vance 2005). It has been demonstrated that individuals of *H. irroratus* from near Pátzcuaro, Michoacán, México (represented by our *H. i. alleni* (2) haplogroup; Figure 2) were genetically distinct and can be considered as a candidate species. Also, it was concluded that populations of *H. irroratus* from Guerrero and Oaxaca are genetically differentiated and may represent a second candidate species (Rogers and Vance 2005).

Since its description in 1893, only 16 specimens of *H. i. bulleri* have been collected: two reported at the time of its description, five more collected between 1956 and 1966, and nine more reported in this study were trapped between 2014 and 2020. The scarce number of voucher specimens collected in almost 130 years suggests that either the trap-

ping efforts have been insufficient to properly sample it or this taxon is uncommon. The Sierra de Manantlán is a new locality for *H. i. bulleri* and represents a range extension of about 125 km southeast from the type locality and 80 km south from Soyatlán del Oro. Given that *H. i. bulleri* is distinctive molecularly and morphologically and coupled with its restricted distribution, it is crucial to pay attention to conservation issues surrounding this taxon.

Acknowledgments

We acknowledge financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 623012; to MAG-C) and the Department of Biology, Brigham Young University (to DSR). Collecting permits for fieldwork were issued by the Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT) to MMR-M (SGPA/DGVS/8540/19) and FXG-C (SGPA/DGVS713602/19). Special thanks to the Dirección de la Reserva de la Biósfera Sierra de Manantlán for its authorization to collect in that protected area. We also thank the following people for their assistance in the field and laboratory work: E. Arellano, D. D. Cruz, N. I. López, and N. Lewis-Rogers, and two anonymous reviewers who kindly read drafts of this work and supplied valuable comments.

Literature cited

- ARELLANO, E., F. X. GONZÁLEZ-COZÁTL, AND D. S. ROGERS. 2005. Molecular systematics of the Middle American harvest mice *Reithrodontomys* (Muridae), estimated from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:529-540.
- BAKER, R. J., AND R. D. BRADLEY. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy* 87:643-662.
- BRADLEY, R. D., AND R. J. BAKER. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82:960-973.
- DARRIBA, D., G. L. TABOADA, R. DOALLO, AND D. POSADA. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- DOWLER, R. C., AND H. H. GENOWAYS. 1978. *Liomys irroratus*. *Mammalian Species* 82:1-6.
- FETZNER, J. W., JR. 1999. Extracting high quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Biotechniques* 26:1052-1054.
- GENOWAYS, H. H. 1973. Systematics and evolutionary relationships of spiny pocket mice, genus *Liomys*. *Special Publications The Museum Texas Tech University* 5:1-368.
- GOLDMAN, E. A. 1911. Revision of the spiny pocket mice (genera *Heteromys* and *Liomys*). *North American Fauna* 34:1-70.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- HOANG, D. T., O. CHERNOMOR, A. VON HAESLER, B. Q. MINH, AND L. S. VINH. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35:518-522.
- KALYANAMOORTHY, S., B. Q. MINH, T. K. F. WONG, A. VON HAESLER, AND L. S. JERMIIN. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14:587-589.

- KIMURA, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- KUMAR, S., G. STECHER, AND K. TAMURA.** 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- NGUYEN, L. T., H. A. SCHMIDT, A. VON HAESLER, AND B. Q. MINH.** 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268-274.
- ROGERS, D. S., AND V. L. VANCE.** 2005. Phylogenetic relationships among spiny pocket mice (*Liomys*: Family Heteromyidae): Analysis of cytochrome *b* based on multiple heuristic approaches. *Journal of Mammalogy* 86:1085-1094.
- RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D. L. AYRES, A. DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, L. LIU, M. A. SUCHARD, AND J. P. HUELSENBECK.** 2012. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.
- SIKES, R. S., AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS.** 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy* 97:663-688.
- SMITH, M., AND J. PATTON.** 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149-177.
- STATSOFT, INC.** 2007. STATISTICA (data analysis software system). version 8.0. www.statsoft.com.
- TAMURA, K., AND 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.
- THOMAS, O.** 1893. Description of two new "pocket-mice" of the genus *Heteromys*. *The Annals and Magazine of Natural History* 11:329-332.

Associated editor: Mónica Díaz

Submitted: July 28, 2020; Reviewed: August 8, 2020;

Accepted: January 18, 2020; Published on line: January 22, 2021.

Appendix 1

Specimens of Mexican *Heteromys* used in the molecular analysis listed by subspecies, state, collecting locality (specific locality, elevation, and geographic coordinates), museum voucher (acronym and number), and GenBank accession number (DQ series first reported by Rogers and Vance 2005). Museum abbreviations are as follows: Brigham Young University (BYU); Colección de Mamíferos at Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CMC); Carnegie Museum of Natural History (CM); Biodiversity Research and Teaching Collection, Texas A&M University (TCWC); Colección Zoológica de Vertebrados, Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara (CVUDG).

Taxon (Haplogroup)	State	Collecting locality	Museum Voucher	GenBank Accession No.
			BYU 15765	DQ 168470
<i>H. i. alleni</i> (1)	Durango	25 km E, 22 km S Vicente Guerrero, Municipio Vicente Guerrero, 1,950 m (23.713, -104.000)	BYU 15766	DQ 168471
			BYU 15767	DQ 168472
			BYU 16051	DQ 168482
<i>H. i. alleni</i> (2)	Michoacán	10 km S (by road) Pátzcuaro, 2,200 m (19.470, -101.609)	BYU 16052	DQ 168483
			BYU 16053	DQ 168484
			BYU 16055	DQ 168485
			CVUDG 1675	MT 709150
			CVUDG 1713	MT 709151
			CVUDG 1711	MT 709152
<i>H. i. bulleri</i>	Jalisco	Estación Científica las Joyas, Reserva de la Biósfera Sierra de Manantlán, 1,957 m (19.586, -104.2743)	CVUDG 1710	MT 709153
			CVUDG 1714	MT 709154
			CVUDG 1715	MT 709155
			CVUDG 1716	MT 709156
			CVUDG 1676	MT 709157
<i>H. i. bulleri</i>	Jalisco	La Laguna, Sierra de Juanacatlán, 2,050 m (20.499, -103.145)	CMC 3590	MT 709149
<i>H. i. guerrerensis</i>	Guerrero	6.1 km SW (by road) Omiltemi, 2,490 m (17.549, -99.721)	BYU 20646	DQ 168473
			CMC 399	DQ 168474
<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	El Polvorín, 5.3 km turn off Lachao Viejo (by road), 1,735 m (16.453, -97.002)	CMC 408	DQ 168488
			CMC 410	DQ 168489
<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	18.5 km S (by road) Sola de Vega, 2,175 m (16.199, -97.134)	BYU 20652	DQ 168487
			CMC 419	DQ 168531
			BYU 16044	DQ 168481
			BYU 16045	DQ 168475
			BYU 16046	DQ 168476
<i>H. i. jaliscensis</i>	Jalisco	24 km W (by road) Ameca, 1,470 m (20.522, -104.076)	BYU 16047	DQ 168477
			BYU 16048	DQ 168478
			BYU 16049	DQ 168479
			BYU 16050	DQ 168480
			BYU 15265	DQ 168493
<i>H. i. texensis</i>	San Luis Potosí	Rancho Plan de la Laja, Xilitlilla, 6 km W Xilitla, Municipio Xilitla, 785 m (21.355, -99.031)	BYU 15266	DQ 168494
			BYU 15267	DQ 168495
			BYU 15268	DQ 168496
			TCWC 41724	DQ 168490
<i>H. i. texensis</i>	Puebla	3.5 miles SW Xicotepec de Juárez (20.279, -97.964)	CM 70450	DQ 168491
			CM 70451	DQ 168492
			TCWC 42044	DQ 168497
			TCWC 42045	DQ 168498
<i>H. i. texensis</i>	Tamaulipas	2.2 miles N Soto la Marina (23.814, -98.189)	TCWC 42046	DQ 168499
			TCWC 42047	DQ 168500
			TCWC 42048	DQ 168501
<i>H. i. torridus</i>	Morelos	Cuernavaca, 2,210 m (18.986, -99.236)	CMC 404	DQ 168486
<i>H. pictus</i>	Oaxaca	El Polvorín, 5.3 km turn off Lachao Viejo (by road), 1,735 m (16.453, -97.002)	BYU 20656	DQ 168534

Capítulo 2b. Molecular data confirms multiple cryptic species within *Heteromys irroratus* Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae).

María Agustina Gutiérrez-Costa, Francisco Xavier González-Cózatl, Nicole Lewis-Rogers,
Duke S. Rogers

[Este capítulo será enviado a Journal of Mammalogy]

Molecular data confirms multiple cryptic species within *Heteromys irroratus* Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae)

María Agustina Gutiérrez-Costa¹, Francisco Xavier González-Cózatl^{1*}, Nicole Lewis-Rogers², Duke S. Rogers³

¹*Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, CP.62209, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: maria.gutierrezcos@uaem.edu.mx (MAG-C), xavier@uaem.mx (FXG-C).*

²*Department of Biology, Brigham Young University. CP.84602, Provo, Utah, United States. E-mail: n.lewisrogers@gmail.com (NLR).*

³*Monte L. Bean Life Science Museum and Department of Biology, Brigham Young University. CP.84602, Provo, Utah, United States. E-mail: duke_rogers@byu.edu (DSR).*

INTRODUCTION

Heteromys irroratus is a species that is widely distributed in México and in a small portion of the US. In the US, it only occurs in southern Texas, but in México, it is found on the Mexican Plateau, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, and is also distributed in various parts of the Transmexican Volcanic Belt. Its distribution to the south, seems to be limited by the Isthmus of Tehuantepec (Genoways, 1973; Dowler and Genoways, 1978). Altitudinally, this species occurs from sea level, along the coasts of Tamaulipas and Veracruz in México, to nearly 3050 m in Cerro San Felipe and Mount Zempoaltepec in Oaxaca, also in México. *H. irroratus* prefers relatively arid habitats and can be mainly found in xerophilous scrub and thorny forest, although it also occurs in coniferous and oak forests, and in agricultural and grazing lands (Dowler and Genoways, 1978). The taxonomic diversity at the infraspecific level is high; currently seven subspecies are recognized (Genoways, 1973; *H. i. irroratus* [Gray, 1868], *H. i. alleni* [Allen, 1881], *H. i. bulleri* [Thomas, 1893], *H. i. guerrerensis* [Goldman, 1911], *H. i. jaliscensis* [Allen, 1906], *H. i. texensis* [Merriam, 1902], and *H. i. torridus* [Merriam, 1902]). Historically, taxonomic studies of rodents, and other groups of mammals, have been mainly based on morphology and geographic distribution. However, the recent use of molecular markers in the systematics of these groups has shown the existence of cryptic species, which indicates that the diversity of rodents is underestimated (Harris et al., 2000, Sullivan et al., 2000, Hafner et al., 2005, Arellano et al., 2005, González-Cózatl et al., 2009). Particularly, in the case of *H. irroratus*, Rogers and Vance (2005), employing Cytochrome b (Cyt *b*) sequences revealed the existence of two well-supported monophyletic lineages that are genetically differentiated and may represent cryptic species within *H. irroratus*. One of these candidate species is made up of samples close to Omiltemi, Guerrero, that seem to correspond to the subspecies *H. i. guerrerensis*, and samples from western Oaxaca that could represent *H. i. irroratus*. The second candidate species comprises

samples from Pátzcuaro, Michoacán. These individuals represent the type locality for *H. i. acutus*, a taxon that Genoways (1973) placed as synonymy of *H. i. alleni*. Nonetheless, it is concluded that it is essential to do a formal revision of the taxonomy of the complete complex of members within *H. irroratus* that incorporates a broader sampling of the species, including type localities (Rogers and Vance, 2005). More recently, Gutiérrez-Costa et al. (2021), also analyzing data of the Cyt *b* gene, found evidence suggesting that *H. i. bulleri* could also represent a valid species. Therefore, considering the ample geographic and altitudinal distribution of *H. irroratus*, as well as the occurrence in a variety of habitats, it is not surprising that the taxonomy of this species has been very controversial (Merriam, 1902; Goldman, 1911; Genoways, 1973; Rogers and Vance, 2005; Anderson et al., 2006; Hafner et al., 2007; Rogers and González, 2010; Gutiérrez-Costa et al., 2021) and that different populations could represent distinct species, as suggested by molecular markers. Certainly, precise species delimitation is essential in biology, since species are the basic units of various areas of study in biogeography, ecology, and macroevolution (Brown et al., 1996 ; Blackburn and Gaston, 1998 ; Brooks and McLennan, 1999 ; Barraclough and Nee, 2001). In this context, the goal of this chapter is to determine the taxonomic diversity at the species level within the *H. irroratus* complex employing molecular data of the Cyt *b* gene and including geographic representatives of the different subspecies recognized in this taxon.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and processing—Most samples of *Heteromys irroratus* were obtained through loan tissue requested to different biological collections in México and in the United States. (Appendix 1). Total genomic DNA was extracted from liver tissue preserved in 95 % ethanol following the procedure described by Fetzner (1999). For selected samples that could not be extracted using Fetzner procedures, the QIAGEN DNeasy Tissue Kit was used for DNA extraction following manufacturer protocol. The complete Cyt *b* mitochondrial gene (1140

bp) was amplified for 76 individuals (Appendix 1) using the MVZ-05-M and MVZ-14- M primers described by Smith and Patton (1993) and modified by Arellano et al. (2005). PCR reaction contained 1 µl of template DNA, 1 µl of deoxynucleosidetriphosphates (10 mM), 5 µl of Taq Buffer (10X), 1 µl of each primer (100 mM), 0.3 µl of GoTaq Polimerasa (5 U/ µl; Promega Corp., Madison, Wisconsin) and 40.7 µl of Destiled water, final volume of 50 µl. Thermal profile for Cytb were 2–4 min at 94°C, 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 45°C, and 1 min at 72°C), plus 5 min at 72°C. PCR products were visualized using Agarose 2% gels with GelRed®. PCR products were purified with a Gene-Clean PCR purification kit (Bio 101, La Jolla, California). Sequencing reactions of purified PCR products were done with the Perkin–Elmer ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, California). Excess dye terminator was removed using a Sephadex 50G solution (3 g/50 ml H₂O). Light- and heavy-strand sequences were determined with an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) housed at the DNA Sequencing Center at Brigham Young University. Sequences were visually inspected using the BioEdit v.7.0.8.0 program and aligned in UGENE v.1.26.3 with MUSCLE (Okonechnikov et al., 2012).

Sequences generated in this study were added into a matrix together with 33 Cyt *b* sequences of *H. irroratus* available from GenBank. and representing the following subspecies: *H. i. alleni*, *H. i. guerrerensis*, *H. i. irroratus*, *H. i. jaliscensis*, *H. i. torridus*, *H. i. texensis* (published by Rogers and Vance, 2005), and *H. i. bulleri* (published by Gutiérrez-Costa et al., 2021; Appendix 1). Also, sequences of *H. pictus* accessible from GenBank were downloaded and used as the outgroup in phylogenetic analyses (Appendix 1). Cyt *b* gene phylogenetic analysis included 115 individuals and 52 localities. In addition, we used 20 sequences of *Heteromys* species (*H. gaumeri*, *H. desmarestianus* and *H. anomalus*) and *Perognathus* (*P. merriami*, *P. fasciatus*, *P. flavescens*, *P. apache* and *P. alticola*) to calibrate divergence times analysis (Appendix 2).

Cytochrome b phylogenetic analyses —The nucleotide substitution model that best fits the Cyt *b* data was selected using JModelTest2 v2.1.6 (Taboada and Posada, 2012) and the Bayesian Information Criterion (BIC), available on the CIPRES XSEDE science gateway v.3.3. To evaluate whether the data needed to be partitioned by codon position it was employed PartitionFinder2 v.2.1.1 (Lanfear et al., 2016, also available on the CIPRES XSEDE platform. The data must be analyzed using two codons partitions, the first codon position, with TN+F+I(0.212)+G4(1.720) as substitution model (this model TN is like HKY but unequal purine/pyrimidine rates (Tamura and Nei, 1993) and +F means that the model has unequal base frequencies, A = 0.315, C = 0.265, G = 0.061, T = 0.357) and the second partition comprise second and third codon positions with TIM2+F+I(0.562)+G4(0.785) as substitution model (AC = AT, CG = GT and unequal base frequencies, A = 0.279, C = 0.252, G = 0.172, T = 0.295). Phylogenies were estimated by using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI), employing IQTree v.2.0.5 (Kalyaanamoorthy et al., 2017, Nguyen et al., 2015) and MrBayes v.3.2.7a (Ronquist et al., 2012) respectively on CIPRES XSEDE. In an initial round of analysis was used a data matrix that included all external groups used for the divergence times calibration analysis to verify if they had effect on the tree topology in the relation as using only *H. pictus* as external group. As no change in the topology occurred, we recovered the same monophyletic groups, in the final analyzes only *H. pictus* was included as an external group. Branch support in ML analysis was assessed through ultrafast bootstrap (UB) with 1,000 replicates (UB, Hoang et al., 2018). In partition type was selected the parameter (--p) that allow partitions to have different speeds. BI phylogeny was estimated with 50 millions of generations and four Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Trees were sampled every 1000 generations and the burn-in value was set to 10,000. Generated trees from both methodologies were edited using FigTree v.1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Divergence time estimation — Divergence time estimates among lineages were assessed in BEAST v.2.5.2 (Bouckaert et al., 2019). Cyt *b* data of representatives of heteromyids were used to generate an ultrametric tree (*H. pictus*, *H. desmarestianus*, *H. gaumeri*, and *H. anomalus*; see Appendix 2). Also, Cyt *b* sequences of members of Perognathidae (*P. merriami*, *P. fasciatus*, *P. flavescens*, *P. apache* and *P. alticola*; see Appendix 2) were employed to calibrate heteromyids phylogeny, as suggested by Hafner et al. (2007). The parameters for nucleotide substitution were the same as those used for Cyt *b* phylogenetic analysis (see above). The analysis were performed under the assumption of a Relaxed Molecular Clock with a Lognormal distribution (Drummond et al., 2006), which assumes that the substitution rate associated with each branch is independent and presents a discrete lognormal distribution. The Birth-Death speciation model was used, which assumes that, at any time, lineages can undergo speciation at a rate λ or extinctions at a rate μ (Kendall, 1948; Thompson, 1975; Nee et al., 1994; Rannala and Yang, 1996; Yang and Rannala, 1997; Popovic, 2004; Aldous and Popovic, 2005; Gernhard, 2008). Trees were calibrated based on three second-order priors: 1) the divergence times proposed by Hafner et al. (2007) for the Heteromyinae subfamily was 12.71-18.01 millions of years ago (Ma) to calibrate Heteromyids node, 2) Moreover, Hafner et al. (2007) proposed 22-20 Ma fossil to calibrate molecular time analyses for the Perognathidae node, 3) a substitution rate was set with a normal distribution prior using mean 0.0586 substitutions per site per Ma and standard deviation of 0.025 (da Cruz and Weksler, 2018). Two MCMC runs were performed for 100,000,000 generations, and the trees were sampled every 50,000 generations. Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al., 2018) was used to analyze log files and ESS parameters values generated by BEAST, and if they reached the stationary phase with ESS values higher than 200. The trees and logs from those independents runs were combined in a single file using LogCombiner v.2.6.2 (Bouckaert et al., 2019), and the first 20% of trees were discarded. The Maximum Credibility Tree was

obtained in the TreeAnnotator v.2.6.2 (Bouckaert et al., 2019) software available in BEAST2 package.

Single locus species delimitation— Following Carstens et al. (2013) who suggests the use of a wide range of species delimitation analyses and look for congruence across methods, we employed four approaches. Initially, we use the “Multi-rate Poisson tree processes” species delimitation method (mPTP, Kapli et al., 2017) available on The Exelixis Lab (<http://www.exelixis-lab.org/>) platform. The analysis was carried out using the null model method (minimum branch length of 0.0001, 100 000 steps, burn-in value of 1000, sampling every 1000 trees). Additionally, the Bayesian version of the “Poisson tree processes” (bPTP, Zhang et al., 2013) was also implemented, which incorporates a MCMC sampling and provides Bayesian support to the species delimitation by assigning a posterior probability value. For this analysis was used a MCMC value of 100 000, which is recommended for trees under 50 taxa. Alternatively, we also used the General Mixed Yule Coalescent Model and its Bayesian version GMYC (Fujisawa and Barraclough, 2013) bGMYC (Reid and Carstens, 2012), respectively. The GMYC analysis was performed on the website of The Exelixis Lab portal (<http://www.exelixis-lab.org/>), while bGMYC was performed in RStudio v1.3.959 (RStudio Team (2020), <http://www.rstudio.com/>). The GMYC analysis was performed using the multiple method, a probability of null models of 859.4361 and the maximum probability of the GMYC model 885.268. The bGMYC started from an initial time t_1 with 1 specie and a final time t_2 of 44 species (upper range of putative species detected with the GMYC), $py_1 = 1.0$, $py_2 = 2.0$, $pc_1 = 0.1$, $pc_2 = 0.5$ and $start = c(1.5, 0.25, 25)$, MCMC = 10,000, burn-in = 5,000, and 100 = thinning.

Complementarily, Kimura 2 parameter distance values (Kimura, 1980) between lineages were calculated in the MEGA X (Kumar et al., 2018) to evaluate if the degree of genetic divergence also supports species delimitations hypotheses according to the Genetic Species

Concept (Bradley and Baker, 2001; Baker and Bradley, 2006). Baker and Bradley (2006) proposed a cutoff value of 5% to efficiently recognize cryptic or currently unrecognized genetic species of mammals. Thereby, genetic divergence in the *Cyt b* gene above 5% will be indicative of unrecognized genetic species.

RESULTS

Phylogenetic reconstruction using Cytochrome b —Phylogenetic trees generated with BI and ML methods resulted in similar grouping patterns, although there are also some important differences to mention (Figures 2 and 3, respectively). In general, individuals of each of the currently recognized subspecies were grouped monophyletically (*H. i. jaliscensis* = haplogroup 3, *H. i. texensis* = haplogroups 4a and 4b, *H. i. irroratus* = haplogroup 5, *H. i. guerrensis* = haplogroup 6, and *H. i. bulleri* = haplogroup 7). However, this was not the case for samples of *H. i. alleni* and *H. i. torridus*. Sequences of *H. i. alleni* were divided into two groups polyphyletic; samples from Durango, Zacatecas and San Luis Potosí (haplogroup 1a) were placed into a distant clade from individuals of Michoacán (haplogroup 1b). Similarly, samples of *H. i. torridus* were divided into two groups paraphyletic, where individuals from Puebla, Oaxaca and one from Morelos (haplogroup 2a) were closer related to the *H. i. alleni* haplogroup 1a (PP = 0.99, UB = 90), than to the rest of the *H. i. torridus* sequences from Morelos (haplogroup 2b). In addition, one individual of *H. i. torridus* from Morelos (Puente de Ixtla; CMC3008) was positioned as a sister clade to *H. i. alleni* + *H. i. torridus* (haplogroups 1a, 2a, and 2b; PP = 0.99, UB = 96). The main difference between BI and ML trees is the ambiguous position of clades V (haplogroups 4a and 4b) and haplogroup 5 with respect to clade I (haplogroups 1a, 2a, and 2b). In the BI tree, clade V is closer related to clade I (Figure 2), whereas in the ML tree, haplogroup 5 is the sister group of clade I (Figure 3). Consequently, support values for each of these alternative scenarios were low (PP = 0.38, UB = 36). The rest of the phylogenetic relationships were congruent. Haplogroups 5 and 6 were

placed as sister lineages (clade VI; PP = 1, UB = 100), and in turn, clade VI was the sister group of clade II (haplogroups 1a, 2a, 2b, 3, 4a, and 4b; (PP = 1, UB = 98). In addition, haplogroup 1b displayed a sister relationship to clade III (clades II and VI; PP = 1, UB = 100). Finally, haplogroup 7 was placed as the sister group of clade IV (remaining haplogroups of *H. irroratus*; (PP = 1, UB = 100). Although all individuals of *H. i. texensis* formed a monophyletic group (PP = 0.99, UB = 92), they were split into two relatively divergent haplogroups; one made up of samples from Tamaulipas (haplogroup 4a; PP = 1, UB = 100) and the other constituted of individuals from San Luis Potosí and Puebla (haplogroup 4b; PP = 1, UB = 100).

Divergence time estimation — The standard deviation of the uncorrelated lognormal relaxed clock for Cyt *b* had a mean of 0.697 and the substitution rate mean (per site per million years) was 0.257 for Cyt *b*. The root was placed on the *Perognathus* clade with a mean age of 20.96 Ma and highest posterior density interval [95% HPD] = 20.06 – 21.95 Ma, Figure 4. A mean divergence time of 11.45 Ma was estimated for the *H. irroratus* clade with 95% HPD = 7.82 – 14.87 Ma with respect to the rest of Heteromids. *H. i. bulleri* diverged from others *irroratus* about 4.06 – 10.84 Ma and *H. i. alleni* haplogroup 1b about 2.33 – 6.45 Ma. Divergence time of the clade *H. i. irroratus* + *H. i. guerrerensis* from *H. i. alleni* (haplogroup 1a), *H. i. torridus*, *H. i. jaliscensis* and *H. i. texensis* is 1.97 – 5.09 Ma.

Species delimitation — According to the mPTP species delimitation analysis (Figure 4) samples of *H. irroratus* represent 9 candidate species (CS): CS1 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a) + *H. i. torridus* (haplogroups 2a and 2b), CS2 = sample CMC3008, CS3 = *H. i. jaliscensis* (haplogroup 3), CS4 = sample CIB16616, CS5 = *H. i. texensis* (haplogroup 4a), CS6 = *H. i. texensis* (haplogroup 4b), CS7 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) + *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6), CS8 = *H. i. alleni* (haplogroup 1b), and CS9 = *H. i. bulleri* (haplogroup 7). The bPTP method proposed the existence of 12 CS: CS1 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a), CS2 =

H. i. torridus (haplogroup 2a), CS3 = *H. i. torridus* (haplogroup 2b), CS4 = sample CMC3008, CS5 = *H. i. jaliscensis*, CS6 = sample CIB16616, CS7 = *H. i. texensis* (haplogroup 4a), CS8 = *H. i. texensis* (haplogroup 4b), CS9 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5), CS10 = *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6), CS11 = *H. i. alleni* (haplogroup 1b), and CS12 = *H. i. bulleri* (haplogroup 7). The GMYC approach estimated 18 CS proposed as follow: CS1 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a) individuals from Durango, Zacatecas, San Luis Potosí and Estado de México, CS2 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a) individuals from Durango and Zacatecas, CS3 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a) samples from Hidalgo and Estado de México, CS4 = *H. i. torridus* (haplogroup 2a), CS5 = *H. i. torridus* (haplogroup 2b), CS6 = sample CMC3008, CS7 = *H. i. jaliscensis* (haplogroup 3), CS8 = sample CIB16616, CS9 = *H. i. texensis* (haplogroup 4a), CS10 = sample CRD6316, CS11 = *H. i. texensis* (haplogroup 4b), CS12 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) samples from San Jose Chiltepec, San Juan Mixtepec and Sola de Vega (localities 43, 49 and 50, Figure 1), CS13 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) individuals from San Juan Quiahije, El Polvorín and Sola de Vega (localities 47, 48 and 49, Figure 1), CS14 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) samples from Santuario de las Aves and La Cumbre (localities 44 and 45, Figure 1), CS15 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) from San Pedro Nexicho, El Tejocote and CMC1511 (localities 41 and 46, Figure 1), CS16 = *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6), CS17 = *H. i. alleni* (haplogroup 1b), and CS18 = *H. i. bulleri* (haplogroup 7). Finally, the bGMYC model suggested 10 CS referred as: CS1 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a), CS2 = *H. i. torridus* (haplogroup 2a), CS3 = *H. i. torridus* (haplogroup 2b), CS4 = *H. i. jaliscensis* (haplogroup 3), CS5 = *H. i. texensis* (haplogroup 4a), CS6 = *H. i. texensis* (haplogroup 4b), CS7 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5), CS8 = *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6), CS9 = *H. i. alleni* (haplogroup 1b), and CS10 = *H. i. bulleri* (haplogroup 7).

Kimura-2-parameters genetic distance values (Kimura, 1980) among the different haplogroups (Table 1) ranged from 2.21 % (*H. i. irroratus* – *H. i. guerrerensis*) to 11.22 %

(*H. i. alleni* (haplogroup 1b) – *H. i. bulleri*). However, only four pairwise comparisons showed relatively low values of genetic distances (< 3%; haplogroup 1a - haplogroup 2a, haplogroup 1a - haplogroup 2b, haplogroup 2a - haplogroup 2b, and haplogroup 5 - haplogroup 6). Another four pairwise comparisons displayed genetic distances between 4% - 5% (haplogroup 1a – haplogroup 3, haplogroup 1a – haplogroup 4b, haplogroup 2b – haplogroup 4b, and haplogroup 4a – haplogroup 4b). The remaining pairwise comparisons showed higher genetic distance values > 5% (Table 1).

DISCUSSION

Phylogenetic patterns within the H. irroratus group – Certainly, most methods for the molecular delimitation of species, appeal to the phylogenetic species concept (Luo et al., 2018), which defines them as “irreducible (basal) clusters of organisms...” (Cracraft, 1983). Therefore, recognition of entities at the subspecific level would not necessarily fit within this conceptual framework. Nonetheless, we initially assessed if the subspecies currently recognized within *H. irroratus* (Genoways, 1973), follow a phylogenetic pattern that may suggest that each of them represents a natural (monophyletic) entity. Phylogenies generated by BI and ML methods showed that, in general, all subspecies represent monophyletic lineages, except in the case of *H. i. alleni* and *H. i. torridus*. Sequences representing *H. i. alleni* were split into two haplogroups (1a and 1b) that were not close related, suggesting a polyphyletic origin of these lineages. Also, two haplogroups were identified within *H. i. torridus*, but one of them (haplogroup 2a) was phylogenetically closer related to haplogroup 1a of *H. i. alleni* than to the rest of sequences of *H. i. torridus* (haplogroup 2b), indicating that, as currently viewed, *H. i. torridus* is a paraphyletic entity. These results show that, in most cases, subspecies of *H. irroratus* represent natural entities with a common evolutionary origin (haplogroups 3, 4, 5, 6, and 7). Interestingly, sample CMC3008, which originally was identified as *H. i. torridus*, did not cluster monophyletically with neither of the *H. i. torridus*

haplogroups (2a or 2b). It rather was placed as the sister group of the clade that included haplogroups 1a, 2a, and 2b. Because CMC3008 represents a single individual, it would be premature to make any interpretation of the clustering pattern displayed by this sample. Overall, phylogenetic relationships estimated with BI and ML agree, and most of the basal nodes were strongly supported by PP and UB values (Figures 2 and 3). In addition, these phylogenetic patterns, based on a more ample sampling of representatives of *H. irroratus*, are pretty much congruent with previous hypothesis (Rogers and Vance, 2005; Gutiérrez-Costa et al. 2021). What seems to be unresolved is the phylogenetic affinities between clades I (*H. i. alleni* [Haplogroup 1a], *H. i. torridus*, and CMC 3008), clade V (*H. i. texensis*), and haplogroup 3 (*H. i. jaliscensis*). Phylogenetic patterns among these groups were not well supported neither in the BI and ML trees generated in this study, nor in the hypotheses generated by Rogers and Vance (2005) and Gutiérrez-Costa et al. (2021). Certainly, it is interesting to note that the length of the branch that separates *H. i. texensis* from its sister group (BI tree; Figure 2) or *H. i. jaliscensis* from the respective sister clade (ML tree; Figure 3), is short, which suggest that divergence of these groups from each other, took very little time. Admittedly, all these phylogenetics hypotheses are derived from a single mitochondrial gene (*Cyt b*), so it would be desirable to explore the use of alternative molecular markers (i. e. nuclear genes) to corroborate if phylogenetic patterns agree between genes, and if those uncertain relationships can be solved.

Heteromys irroratus species delimitations – As suggested by previous molecular studies (Rogers and Vance, 2005; Gutiérrez-Costa et al., 2021), the taxonomic diversity within *H. irroratus* could include several cryptic species. *Cyt b* data generated in this study and complemented with available sequences from GenBank, support the view that *H. irroratus* is a composite taxon that is formed by at least seven putative species. Because the appropriate recognition of lineages at the species level is not a straightforward procedure, distinct

approaches trying to look for congruence were employed, but ultimately, adopting a conservative point of view. In this regard, although bPTP, GMYC, and bGMYC methods suggested the existence of 12, 18, and 10 candidate species, respectively, the PTP procedure proposed only nine species within *H. irroratus* (Figure 4). Nonetheless, this last method recognizes samples CMC 3008 (*H. i. torridus*) and CIB 16616 (*H. i. jaliscensis*) as putative species. Although it could be possible that those samples constitute different species, they represent single individuals. Therefore, a definitive conclusion on the validity of these samples as a putative species will certainly require the evaluation of additional samples. Empirical studies have shown that GMYC model tend to oversplit species (Paz and Crawford, 2012 ; Pentinsaari et al., 2017 ; Renner et al., 2017), and our results confirm this in our data set. GMYC method estimate the largest number of entities (18), in comparison with other single locus methods; 9 entities (PTP), 12 (bPTP) and 10 (bGMYC). Zhang et al. (2013) suggest that PTP tends to outperform GMYC when interspecific distances are small, and Tang et al. (2014) propose that PTP often yields more accurate delimitations than GMYC method. Thus, putting on hold samples CMC 3008 (*H. i. torridus*) and CIB 16616 (*H. i. jaliscensis*), the PTP procedure turned out to be the more conservative approach, suggesting the existence of seven candidate species within *H. irroratus*.

Comparatively, the use of Kimura-2-parameters genetic distances, under the framework of the genetic species concept, adopted for the determination of species boundaries in mammals (Bradley and Baker, 2001; Baker and Bradley, 2006), also suggests the existence of several species within *H. irroratus*. Although there is not a threshold value of genetic distance that guarantees that two groups represent distinct species, it has been suggested that values of a magnitude of divergence >5% in the Cyt *b*, is more associated with taxa recognized as species (Bradley and Baker, 2001; Baker and Bradley, 2006). Pair-wise values of genetic divergence that invariably exceeded 5% to other haplogroups were identified in *H. i. alleni* (haplogroup

1b), *H. i. irroratus* + *H. i. guerrerensis* (haplogroup 5 and haplogroup 6), and *H. i. bulleri* (haplogroup 7). Nonetheless, there were other scenarios where most pair-wise comparisons also were >5% and only few of them were slightly lower than 5%, like in the case of *H. i. jaliscensis* (haplogroup 3), *H. i. texensis* (haplogroup 4a), *H. i. texensis* (haplogroup 4b), and *H. i. alleni* + *H. i. torridus* (haplogroup 1a, haplogroup 2a, and haplogroup 2b). Certainly, there are a few comparisons whose range of genetic divergence oscillates between 4% and 5% and would question the recognition of those groups as different species. However, as indicated above, there is not an absolute threshold value for the determination of species boundaries and valid species have even been recognized with values lower than 5% (Bradley and Baker, 2001; Baker and Bradley, 2006).

Thus, overall Cyt *b* sequence data analyzed under the context of both, the phylogenetic species concept (PTP delimitation method) and the genetic species concept (Kimura-2-parameters genetic distances), suggest the recognition of seven candidate species within *H. irroratus* as follow: CS1 = *H. i. alleni* (haplogroup 1a) + *H. i. torridus* (haplogroups 2a and 2b), CS2 = *H. i. alleni* (haplogroup 1b); CS3 = *H. i. jaliscensis* (haplogroup 3); CS4 = *H. i. texensis* (haplogroup 4a); CS5 = *H. i. texensis* (haplogroup 4b); CS6 = *H. i. irroratus* (haplogroup 5) + *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6); and CS7 = *H. i. bulleri* (haplogroup 7).

CS1 = *H. i. alleni* (Coues, 1881)

This species would include populations of *H. i. alleni* (haplogroup 1a; Durango, Zacatecas, and San Luis Potosí) and populations of *H. i. torridus* (haplogroups 2a; Morelos, Puebla, and Oaxaca, and 2b; Morelos). All of them, together, constitute a monophyletic assemblage recovered in both, BI and ML trees. Cyt *b* divergence values between all different haplogroups do not exceed 3%. On the other hand, genetic distances between any of these haplogroups ranged from 4.2 % to 16.1%, were most comparisons were clearly higher than

5%. Although previously, Genoways (1973) had include several subspecies (*H. i. canus* and *H. i. pullus*) under the name *H. i. alleni*, this study supports the view that *H. i. canus* should be view as part of *H. alleni*, since we included a sample (UACH2538) from near Parral, Chihuahua (type locality of *H. i. canus*) and was placed within haplogroup 1a of *H. i. alleni*. Unfortunately, since there were not available samples *H. i. pullus* (type locality Tlalpan, Mexico City) for this study, it was not possible to validate whether or not this group should be regarded as part of *H. alleni*. *H. torridus* was described by Merriam (1902 : 45) with type locality in Cuicatlán (Oaxaca, Figure 1), only taking into account external characteristics, author presented that *H. torridus* is decidedly smaller than *H. alleni*, with much smaller hind feet, much less distinct ear edgings and whitish forelegs. Because the term "*alleni*" (Coues, 1881 precedes the name "*torridus*" (Merriam, 1902), under the principle of priority, this candidate species should receive the specific epithete "*alleni*".

CS2 = *H. acutus* (Hall and Villa-R, 1948)

Recognition of *H. i. alleni* (haplogroup 1b) from near Pátzcuaro, Michoacán as a valid species, was supported by all species delimitation methods. This taxon would represent populations of *H. i. alleni* (haplogroup 1b; Pátzcuaro, Michoacán). Samples of this haplogroup were clustered monophyletically, but clearly separated from other samples of *H. i. alleni* (haplogroup 1a). This lineage was positioned as the sister group of clade III (includes the rest of samples of *H. irroratus*, excluding *H. i. bulleri*). Genetic distances to other haplogroups ranged from 7.8 % to 16.1%. Individuals of this CS represent the type locality of *H. i. acutus*, a taxon originally described by Hall and Villa-R. (1948). Nonetheless, Genoways (1973) subsumed *H. i. acutus* (together with *H. i. canus* and *H. i. pullus*) under the name *H. i. alleni*. Previously, Rogers and Vance (2005) had already pointed out that samples of *H. irroratus* from near Pátzcuaro (Michoacán) were genetically distinct from other samples of

this taxon and suggested that they could represent a different species. This view was also supported by Gutiérrez-Costa et al. (2021).

CS3 = *H. jaliscensis* (Allen, 1906)

The recognition of this group as a species was proposed by three of the species delimitation approaches. This species would be formed by samples clustered in haplogroup 3 from Ameca, Jalisco. In addition, genetic distances between these haplogroup and other, were in most cases >5% (ranged from 5.5 % to 9.5%). Only when compared to *H. i. alleni* (haplogroup 1a), the divergence value was 4.9 %. Although there is an individual (CIB 16616) from Jalpa, Zacatecas that is closed related to haplogroup 3, most species delimitation methods suggest that it represents a distinct species and should not considered as part of *H. jaliscensis*. Certainly, additional sampling would be required to assess the taxonomic status of that sample.

CS4 = *H. texensis* (Merriam, 1902)

Recognition of samples of *H. i. texensis* (haplogroup 4a) as species was supported by three species delimitation methods based on trees. This group includes samples from Tamaulipas on the border with Texas. Moreover, most pair-wise comparison with other haplogroups showed genetic distances values over 5% (ranged from 5.3% to 10.4%). Only when compared to haplogroup 4b of *H. i. texensis* genetic distance was 4.3%. Therefore, considering that samples clustered in haplogroup 4 represent localities in the northern distribution of *H. i. texensis* (Tamaulipas) and that the type locality (Brownsville, Texas) is at the border between Mexico and the Unites States, it is suggested that this candidate species retains the term "*texensis*" as specific epithet.

CS5 = *H. pretiosus* (Goldman, 1911)

Samples of *H. i. texensis* from San Luis Potosí and Puebla constituted an independent haplogroup (4b) that is suggested to represent a valid species by all four species delimitation methods. Also, the genetic distance values between this haplogroup and others, ranged between 4.2% to 10.3%. Overall, this evidence suggests that samples included in haplogroup 4b should be viewed as a candidate species. The term "*pretiosus*" was previously assigned to representatives of *H. i. texensis* from Metleltoyuca (Puebla), currently considered as a synonym, in the present study was included one locality near of this type locality (locality 35, Figure 1) that was grouped with this haplogroup 4b. In this case, we are proposing to name this putative species as *H. pretiosus*.

CS 6 = *H. guerrerensis* (Goldman, 1911) or *H. irroratus* (Gray, 1868)

Samples of *H. i. irroratus* (haplogroup 5) from Oaxaca and *H. i. guerrerensis* (haplogroup 6) from Guerrero were clustered together in all phylogenetic analyses, although each one seems to represent an independent lineage. Only one of the species delimitation methods (PTP) recognizes both haplogroups as a single species. In addition, genetic distance between these groups is relatively low (2.2%) which supports the suggestion of the PTP model that both represent the same species. On the other hand, genetic divergence between this putative species to other haplogroups ranged from 6.0% to 10.6%. Previously, Rogers and Vance (2005) had pointed out that *H. irroratus* from western Oaxaca and *H. i. guerrerensis* formed a well-supported clade and could represent a species-level taxon. Also, they noted that these two groups occur in relatively high-elevation sites, compared to other groups within *H. irroratus*, which supports the view that they constitute species-level taxon. Because the term "*irroratus*" (Gray, 1868) precedes the name "*guerrerensis*" (Goldman, 1911), under the principle of priority, this candidate species should receive the specific epithet "*irroratus*". Certainly, it would have been desirable if a sample from the type locality of *H. i. irroratus* (restricted to Oaxaca, Oaxaca, by Genoways (1973)) had been included in the work, however

this was not the case. Nonetheless, samples of *H. i. irroratus* from localities around Oaxaca, Oaxaca were included and, apparently, they are representative of this taxon.

CS 7 = *H. bulleri* (Thomas, 1893)

Samples of *H. i. bulleri* (haplogroup 7) were already suggested to represent a valid species by Gutiérrez-Costa et. al (2021) based on the assessment of Cyt *b* sequence data and external and cranial measurements. This hypothesis was clearly supported by all species delimitation methods. Further, in all pair-wise comparison between *H. i. bulleri* and any other haplogroup, genetic divergence values were relatively high (ranged from 9.5 % to 11.2%). This group had a restricted geographic distribution and apparently it only inhabits temperate forest in Jalisco. Until recently it was only known from La Laguna, Sierra de Juanacatlán (type locality) and Soyatlán del Oro (Genoways, 1973). Based on recent collecting records, Gutiérrez-Costa et. al (2021) extend their distribution to the southwestern region of Jalisco, in the Biosphere Reserve Sierra de Manantlán. For this candidate species, it is proposed to use the original specific epithet assigned by Thomas (1893) when he described it as valid species, *H. bulleri*.

LITERATURE CITED

- Aldous D. Popovic L. 2005. A critical branching process model for biodiversity. *Advances in Applied Probability*. 37: 1094–1115.
- Allen JA. 1881. List of mammals collected by Dr. Edward Palmer in north-eastern México, with field-notes by the collector. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*. 8: 183-189.
- Allen JA. 1906. Mammals from the states of Sinaloa and Jalisco. México, collected by J. H. Batty during 1904 and 1905. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 14: 587-612.
- Anderson RP. Weksler M. Rogers DS. 2006. Phylogenetic analyses of Spiny Pocket Mice (Heteromyidae: Heteromyiinae) based on allozymic and morphological data. *Journal of Mammalogy*. 87: 1218-1233.
- Arellano E. González-Cozátl FX. Rogers DS. 2005. Molecular systematics of the Middle American harvest mice *Reithrodontomys* (Muridae), estimated from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 529-540.
- Baker RJ. Bradley RD. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*. 87: 643–662.
- Barracough TG. Nee S. 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*. 16: 391– 99.
- Blackburn TM. Gaston KJ. 1998. Some methodological issues in macroecology. *The American Naturalist*. 51: 68. 14–83.
- Bouckaert R. Vaughan TG. Barido-Sottani J. Duchêne S. Fourment M. Gavryushkina A. Heled J. Jones G. Kühnert D. De Maio N. Matschiner M. Mendes FK. Müller NF. Ogilvie HA. du Plessis L. Poppinga A. Rambaut A. Rasmussen D. Siveroni I. Suchard MA. Wu Ch-H. Xie D. Zhang Ch. Stadler T. Drummond AJ. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *Plos computational biology*. 15: e1006650.
- Bradley RD. Baker RJ. 2001. A test of genetic species concept: Cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*. 82: 960–973.
- Brooks DR. McLennan DA. 1999. Species: turning a conundrum into a research program. *Journal of Nematology*. 31: 117–33.
- Brown JH. Stevens GC. Kaufman DM. 1996. The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 27: 597–623.
- Carstens BC. Pelletier TA. Reid NM. Satler JD. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*. 22: 4369-4383.
- Cracraft J. 1983. Species Concepts and Speciation Analysis. In: Johnston R.F. (eds) *Current Ornithology*. Current Ornithology, vol 1. Springer, New York, NY.

- da Cruz MOR, Weksler M. 2018. Impact of tree priors in species delimitation and phylogenetics of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia: Cricetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 119: 1-12.
- Dowler RC. Genoways HH. 1978. *Liomys irroratus*. *Mammalian species*. 82: 1-6.
- Drummond AJ. Simon YWH. Phillips MJ. Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology*. 4: e88.
- Fetzner JW. 1999. Extracting high quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Biotechniques*. 26: 1052–1054.
- Fujisawa T. Barraclough T. 2013. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic biology*. 62: 707–724.
- Genoways HH. 1973. Systematics and Evolutionary Relationships of Spiny Pocket Mice. Genus *Liomys*. Special Publications The Museum Texas Tech University. 368 pp.
- Gernhard T. 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology*. 253: 769-778.
- Goldman EA. 1911. Revision of the spiny pocket mice (genera *Heteromys* and *Liomys*). *North America Fauna*. 34: 1-70.
- González-Cózatl FX. Rogers DS. Arellano E. 2009. Diversidad críptica en la CNMA: descubriendo nuevas especies de roedores mexicanos. Pp. 55-66. en 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología. UNAM. Aportaciones al Conocimiento y Conservación de los Mamíferos Mexicanos (F. A. Cervantes. J. Vargas y Y. Hortelano. eds.).
- Gray JE. 1868. Synopsis of the species of Saccomyinae, or pouched mice, in the collection of British Museum. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 199- 206 pp.
- Gutiérrez-Costa MA. González-Cózatl FX. Ramírez-Martínez MM. Iñiguez-Dávalos LI. Rogers DS. 2021. Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon. *Therya*. 12: 139-148.
- Hafner MS. Light JE. Hafner DJ. Brant SV. Spradling TA. Demastes JW. 2005. Cryptic species in the Mexican pocket gopher *Cratogeomys merriami*. *Journal of Mammalogy*. 86: 1095-1108.
- Hafner JC. Light JE. Hafner DJ. Hafner MS. Reddington E. Rogers DS. Riddle BR. 2007. Basal clades and molecular systematics of Heteromyd rodents. *Journal of Mammalogy*. 88:1129-1145.
- Hall ER. Villa R B. 1948. A new pocket gopher (*Thomomys*) and a new spiny pocket mouse (*Liomys*) from Michoacán, México. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*. 1: 249–256.
- Harris DJ. Rogers DS. Sullivan J. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia: Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology*. 9: 2129–2135.
- Hoang DT. Chernomor O. von Haeseler A. Minh BQ. Vinh LS. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 518–522.

- Kalyaanamoorthy S. Minh BQ. Wong TKF, von Haeseler A. Jermini LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14: 587–589.
- Kapli P. Lutteropp S. Zhang J. Kobert K. Pavlidis P. Stamatakis A. Flouri T. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 33: 1630–1638.
- Kendall DG. 1948. On the Generalized "Birth-and-Death" Process. *The Annals of Mathematical Statistics*. 19: 1 – 15.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kumar S. Stecher G. Li M. Knyaz C. Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549.
- Lanfear R. Frandsen PB. Wright AM. Senfeld T. Calcott B. 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*. 34: 772-773.
- Luo A. Ling C. Ho SYW. Zhu CD. 2018. Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*. 67: 830–846.
- Merriam CH. 1902. Twenty new pocket mice (*Heteromys* and *Liomys*) from Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 15: 41–50.
- Nee S. May RM. Harvey PH. 1994. The reconstructed evolutionary process. *Royal Society*. 344: 305-311.
- Nguyen LT. Schmidt HA. Von Haeseler I. Minh BQ. 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32: 268–274.
- Okonechnikov K. Golosova O. Fursov M. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012. 28: 1166-1167.
- Paz A. Crawford AJ. 2012. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: A comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of Biosciences*. 37: 887–896.
- Pentinsaari M. Vos RA. Mutanen M. 2017. Algorithmic single-locus species delimitation: Effects of sampling effort, variation and nonmonophyly in four methods and 1870 species of beetles. *Molecular Ecology Resources*. 17.
- Popovic L. 2004. Asymptotic genealogy of a critical branching process. *Annals of Applied Probability*. 14: 2120–2148.
- Rambaut A. Drummond AJ. Xie D. Baele G. Suchard MA. 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67: 901–904.

- Rannala B. Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 43: 304–311.
- Reid NM. Carstens BC. 2012. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*. 196.
- Renner MAM. Heslewood MM. Patzak S. Schäfer-Verwimp A. Heinrichs J. 2017. By how much do we underestimate species diversity of liverworts using morphological evidence? An example from Australasian *Plagiochila* (Plagiochilaceae: Jungermanniopsida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 107: 576-593.
- Rogers DS. González MW. 2010. Phylogenetic relationships among spiny pocket mice (*Heteromys*) inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. *Journal of Mammalogy*. 91: 914-930.
- Rogers DS. Vance VL. 2005. Phylogenetics of Spiny Pocket Mice (Genus *Liomys*): Analysis of Cytochrome b based on multiple heuristic approaches. *Journal of Mammalogy*. 86 : 1085-1094.
- Ronquist F. Teslenko M. van der Mark P. Ayres DL. Darling A. Höhna S. Larget B. Liu L. Suchard MA. Huelsenbeck JP. 2012. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology*. 61: 539-542.
- Smith MF. Patton JL. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*. 50: 149–177.
- Sullivan J. Arellano E. Rogers DS. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: Concerted versus independent responses to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*. 155: 755-768.
- Taboada DD. Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- Tamura K. Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512-26.
- Tang CQ. Humphreys AM. Fontaneto D. Barraclough TG. 2014. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods in Ecology and Evolution*. 5: 1086–1094.
- Thomas O. 1893. Description of two new “pocket-mice” of the genus *Heteromys*. *The Annals and Magazine of Natural History*. 11: 329-332.
- Thompson EA. 1975. *Human evolutionary trees*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Yang Z. Rannala B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 717-724.

Zhang J. Kapli P. Pavlidis P. Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 29: 2869-2876.

SUPPLEMENTARY DATA

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Map of localities of *Heteromys irroratus* samples (black circles) used for the phylogenetics analysis. *H. pictus*, black squares. Localities information is provided in Appendix 1. Red stars represent type localities: A = *Heteromys canus*; B = *H. i. bulleri*; C = *H. i. jaliscensis*; D = *H. i. texensis*; E = *H. i. alleni*; F = *H. i. pretiosus*; G = *H. i. acutus*; H = *H. pullus*; I = *H. i. guerrerensis*; J = *H. i. torridus*; and K = *H. i. irroratus*. Continuous line delimited *H. irroratus* distribution proposed by the IUCN.

Figure 2. Bayesian inference phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome b gene. Posterior probability values are shown above branches.

Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome b gene (lnL = -7708.002). Ultrafast bootstrap values are shown above branches.

Figure 4. Ultrametric tree of Cytochrome b gene, using Birth Death model and Relaxed Molecular Clock with lognormal distribution. Branches levels indicate divergence times estimates in Ma, (*) means (0.32, 0.92) Ma and (**) means (0.26, 0.81) Ma. Vertical black bars represent candidate species identified by the alternative species delimitation methods: mPTP = Multi-rate Poisson tree processes; bPTP = bayesian version of Poisson tree processes; GMYC = General mixed Yule coalescent model; bGMYC = bayesian version of General mixed Yule coalescent model ; and GD = Kimura-2-parameters model Genetic Distances in the context of the Genetic Species Concept.

Table 1. Mean pairwise genetic distance values (in percentage) corrected with Kimura-2-parameters model between *Heteromys irroratus* haplogroups identified in the phylogenetics analyzes.

<i>Haplogroups</i>	<i>H. i. alleni</i> 1a	<i>H. i. torridus</i> 2a	<i>H. i. torridus</i> 2b	<i>H. i. jaliscensis</i> 3	<i>H. i. texensis</i> 4a	<i>H. i. texensis</i> 4b	<i>H. i. irroratus</i> 5	<i>H. i. guerrerensis</i> 6	<i>H. i. alleni</i> 1b
<i>H. i. alleni</i> 1a									
<i>H. i. torridus</i> 2a	2.53								
<i>H. i. torridus</i> 2b	2.52	2.94							
<i>H. i. jaliscensis</i> 3	4.89	5.58	5.50						
<i>H. i. texensis</i> 4a	5.29	6.30	5.69	5.61					
<i>H. i. texensis</i> 4b	4.40	5.26	4.19	5.69	4.32				
<i>H. i. irroratus</i> 5	7.06	7.63	6.47	7.51	7.54	6.99			
<i>H. i. guerrerensis</i> 6	6.67	7.21	6.01	7.10	6.92	6.35	2.21		
<i>H. i. alleni</i> 1b	8.06	16.17	7.98	8.72	8.65	7.88	8.25	8.08	
<i>H. i. bulleri</i> 7	10.08	10.96	10.07	9.52	10.48	10.38	10.63	10.61	11.22

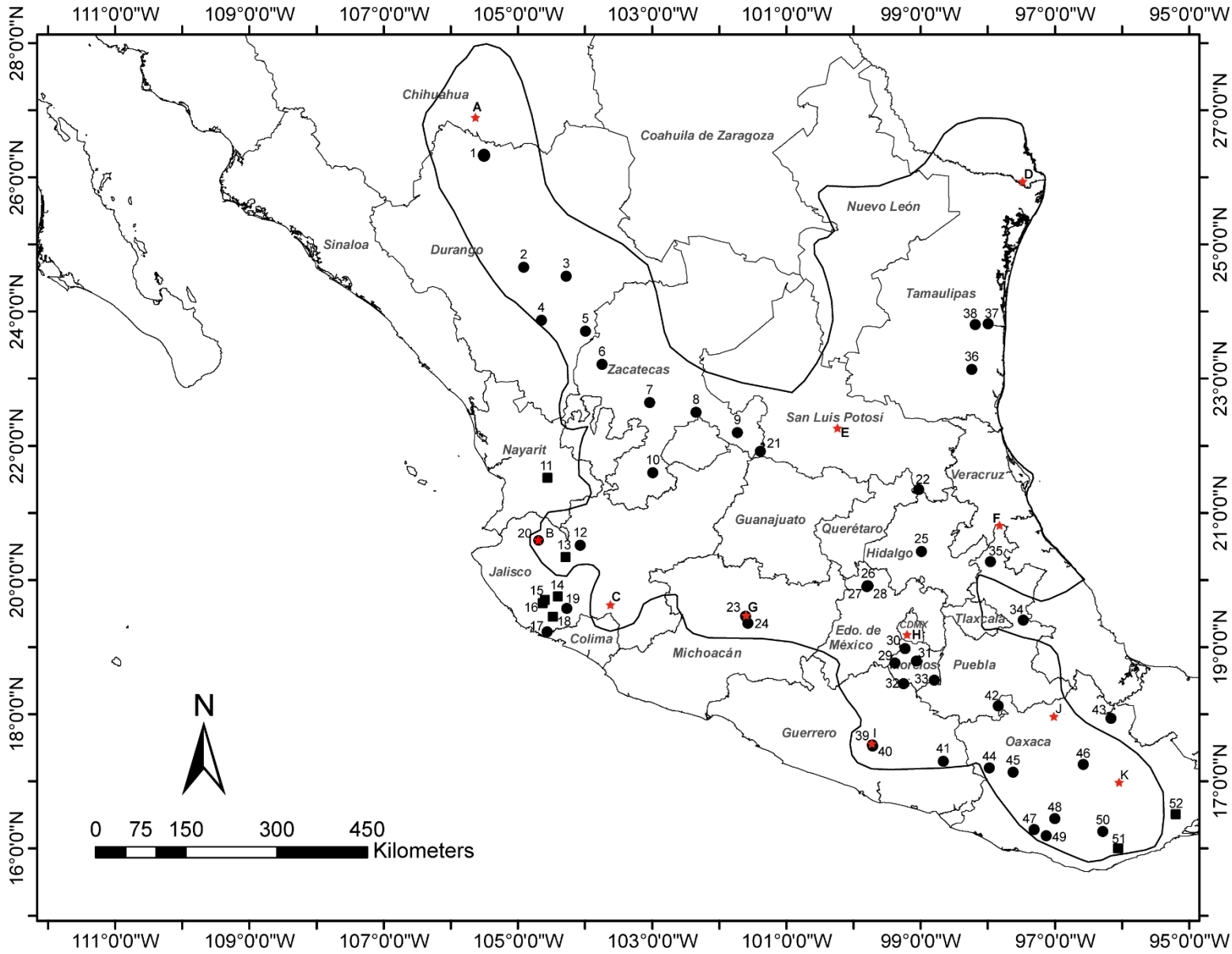


Figure 1. Map of localities of *Heteromys irroratus* samples (black circles) used for the phylogenetics analysis. *H. pictus*, black squares. Localities information is provided in Appendix 1. Red stars represent type localities: A = *Heteromys canus*; B = *H. i. bulleri*; C = *H. i. jaliscensis*; D = *H. i. texensis*; E = *H. i. alleni*; F = *H. i. pretiosus*; G = *H. i. acutus*; H = *H. pullus*; I = *H. i. guerrerensis*; J = *H. i. torridus*; and K = *H. i. irroratus*. Continuous line delimited *H. irroratus* distribution proposed by la UICN.

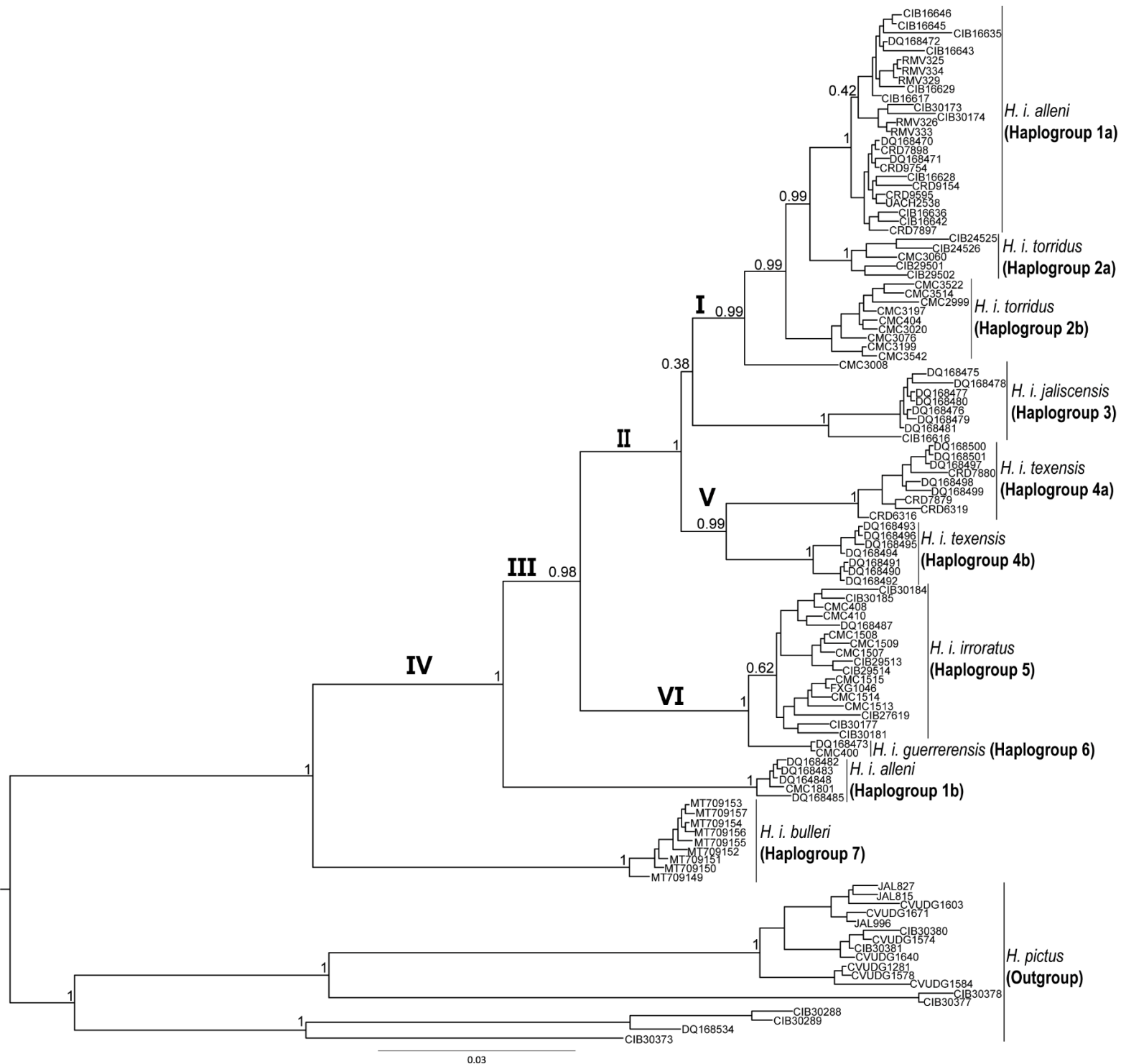


Figure 2. Bayesian inference phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome b gene. Posterior probability values are shown above branches.

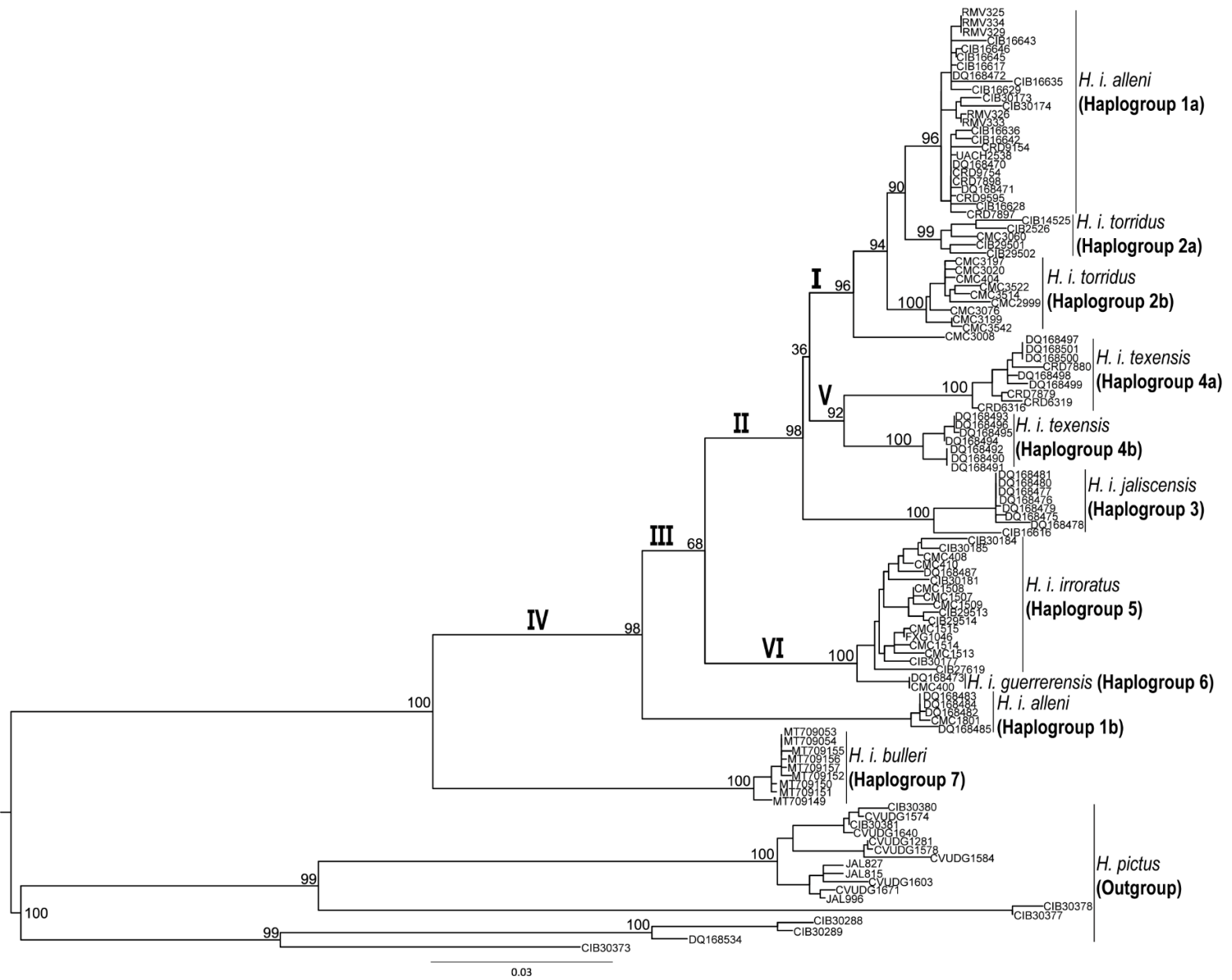


Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree of *Heteromys irroratus* generated with the complete Cytochrome b gene (lnL = -7708.002). Ultrafast bootstrap values are showed above branches.

b
b
GG
PPMM
TTY
PPCC

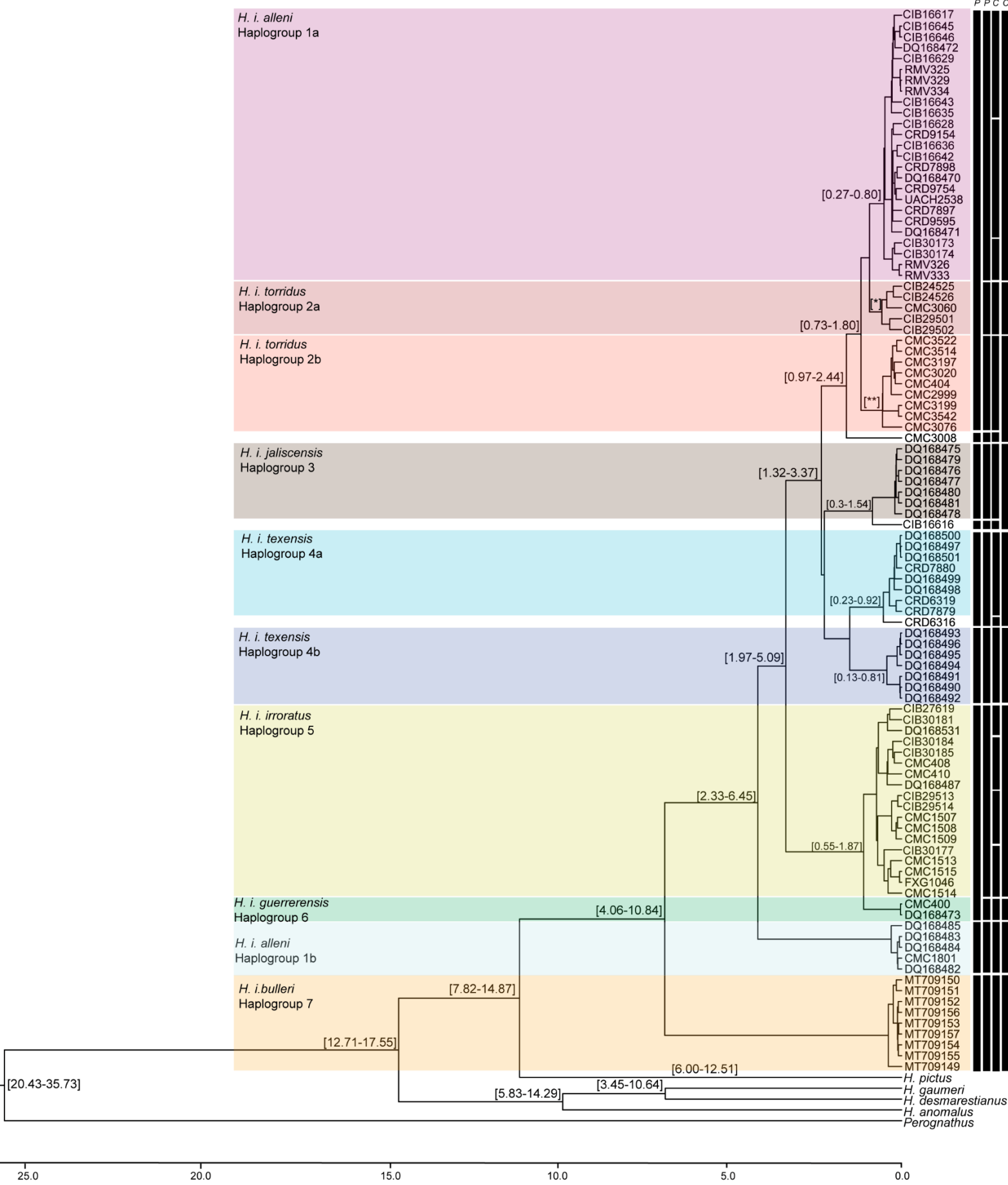


Figure 4. Ultrametric tree of Cytochrome b gene, using Birth Death model and Relaxed Molecular Clock with lognormal distribution. Branches labels indicate divergence times estimates in Ma, (*) means (0.32, 0.92) Ma and (**) means (0.26, 0.81) Ma. Vertical black bars represent candidate species identified by the alternative species delimitation methods: mPTP = Multi-rate Poisson tree processes; bPTP = Bayesian version of Poisson tree processes; GMYC = General mixed Yule coalescent model; bGMYC = Bayesian version of General mixed Yule coalescent model ; and GD = Kimura-2-parameters model Genetic Distances in the context of the Genetic Species Concept.

APPENDICES

Appendix 1. Specimens of *Heteromys* used in the molecular analysis listed by subspecies, state, collecting locality (specific locality, elevation and geographic coordinates), museum voucher (acronym and number), papers where sequences used were published, and GenBank accession number. Museum abbreviations are as follows: Brigham Young University (BYU); Colección de Mamíferos at Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CMC); Carnegie Museum of Natural History (CM); Biodiversity Research and Teaching Collection, Texas A&M University (TCWC); Colección Zoológica de Vertebrados, Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara (CVUDG); Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB); Colección Regional Durango, Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CRD); Colección de Vertebrados de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH).

Map code	Scientific Name	State	Collecting locality	Museum Voucher No.	GenBank Accession Nos. Cytb	Published by
1	<i>H. i. alleni</i>	Durango	41 Km E entronque a la Zarca, Municipio de Villa Hidalgo, 1812 m (25.807, -104.403)	UACH 2538	Done	Present study
2	<i>H. i. alleni</i>	Durango	2.7 km N, 8 km W Los Pinos, 2300 m (24.664, -104.9168)	CRD 9754	Done	Present study
3	<i>H. i. alleni</i>	Durango	1 km N, 1.5 km E San José Avino, 2320 m (24.534, -104.2803)	CRD 9154	Done	Present study
4	<i>H. i. alleni</i>	Durango	1 km NE Santiago Bayacora, 1926 m (23.877, -104.6526)	CRD 9595	Done	Present study
5	<i>H. i. alleni</i>	Durango	25 km E, 22 km S Vicente Guerrero, 1950 m (23.713, -104.000)	BYU 15765 BYU 15766 BYU 15767	DQ 168470 DQ 168471 DQ 168472	Rogers and Vance, 2005
6	<i>H. i. alleni</i>	Zacatecas	3.8 Km S, 4.7 Km E Jiménez de Teúl, 2609 m (23.219, -103.7492)	CRD 7897 CRD 7898	Done Done	Present study
7	<i>H. i. alleni</i>	Zacatecas	4.5 km W Jerez, 2019 m (22.648, -103.0377)	CIB 16635 CIB 16636	Done Done	Present study
8	<i>H. i. alleni</i>	Zacatecas	7 km SW Berriozabal, 2111 m (22.505, -102.3467)	CIB 16628 CIB 16629	Done Done	Present study

9	<i>H. i. alleni</i>	Zacatecas	6 km NW El Nigromante, 2232 m (22.203, -101.735)	CIB 16642 CIB 16643	Done Done	Present study
10	<i>H. i. jaliscensis</i>	Zacatecas	3 km S Jalpa, 1390 m (21.603, -102.9905)	CIB 16616	Done	Present study
10	<i>H. i. alleni</i>	Zacatecas	3 km S Jalpa, 1390 m (21.603, -102.9905)	CIB 16617	Done	Present study
11	<i>H. i. pictus</i>	Nayarit	20.23 km N, Santa Maria del Oro, 614 m (21.52, -104.58)	CIB 30377 CIB 30378	Done Done	Present study
12	<i>H. i. jaliscensis</i>	Jalisco	24 km W (by road) Ameca, 1470 m (20.522, -104.076)	BYU 16044 BYU 16045 BYU 16046 BYU 16047 BYU 16048 BYU 16049 BYU 16050	DQ 168481 DQ 168475 DQ 168476 DQ 168477 DQ 168478 DQ 168479 DQ 168480	Rogers and Vance, 2005
13	<i>H. pictus</i>	Jalisco	66.41 km NW, Soyatlán del Oro, 1552 m (20.34, -104.32)	CIB 30380 CIB 30381	Done Done	Present study
14	<i>H. pictus</i>	Jalisco	Chiquihuitan, 991 m (19.769, -104.4156)	CVUDG 1574	Done	Present study
15	<i>H. pictus</i>	Jalisco	La Rinconada, 510 m (19.739, -104.597)	JAL 996 CVUDG 1640 CVUDG 1281 CVUDG 1578	Done Done Done	Present study
16	<i>H. pictus</i>	Jalisco	El Naranjo, 510 m (19.718, -104.606)	CVUDG 1584 CVUDG 1671	Done Done	Present study
17	<i>H. pictus</i>	Jalisco	Ejido el Totole, 106 m (19.237, -104.568)	CVUDG 1603	Done	Present study
18	<i>H. pictus</i>	Jalisco	El Coyame, 319 m (19.497, -104.521)	CVUDG 1613 CVUDG 1656	Done Done	Present study
19	<i>H. i. bulleri</i>	Jalisco	Estación Científica las Joyas, 1957 m (19.586, -104.274)	CVUDG 1675 CVUDG 1713 CVUDG 1711 CVUDG 1710 CVUDG 1714 CVUDG 1715 CVUDG 1716 CVUDG 1676	MT 709150 MT 709151 MT 709152 MT 709153 MT 709154 MT 709155 MT 709156 MT 709157	
20	<i>H. i. bulleri</i>	Jalisco	La Laguna, Sierra de Juanacatlán,	CMC 3590	MT 709149	Gutiérrez-Costa et al., 2021

			2050 m (20.499, -103.145)			
21	<i>H. i. alleni</i>	San Luis Potosí	1 km W Villa de Arriaga, 2176 m (21.923, -101.387)	CIB 16645 CIB 16646	Done Done	Present study
22	<i>H. i. texensis</i>	San Luis Potosí	Rancho Plan de la Laja, Xilitlilla, 6 km W Xilitla, 785 m (21.355, -99.031)	BYU 15265 BYU 15266 BYU 15267 BYU 15268	DQ 168493 DQ 168494 DQ 168495 DQ 168496	Rogers and Vance, 2005
23	<i>H. i. acutus</i>	Michoacán	10 km S (by road) Pátzcuaro, 2200 m (19.470, -101.609)	BYU 16051 BYU 16052 BYU 16053 BYU 16055	DQ 168482 DQ 168483 DQ 168484 DQ 168485	Rogers and Vance, 2005
24	<i>H. i. acutus</i>	Michoacán	4.9 Km (by road) Santa Clara, 1600 m (19.361, -101.573)	CMC 1801	Done	Present study
25	<i>H. i. alleni</i>	Hidalgo	6.28 km S, Santiago Anaya, 2117 m (20.43, -98.99)	CIB 30173 CIB 30174	Done Done	Present study
26	<i>H. i. alleni</i>	Estado de México	Rancho Castillo del Aguila, 2654 m (19.9194, -99.800)	RMV325 RMV326	Done Done	Present study
27	<i>H. i. alleni</i>	Estado de México	Rancho la Venta, 2647 m (19.919, -99.787)	RMV329	Done	Present study
28	<i>H. i. alleni</i>	Estado de México	Rancho la Venta, 2740 m (19.911, -99.806)	RMV333 RMV334	Done Done	Present study
29	<i>H. i. torridus</i>	Morelos	3 km E de Miacatlán, 1048 m (18.769, -99.388)	CMC 3542	Done	Present study
30	<i>H. i. torridus</i>	Morelos	Cuernavaca, 2210 m (18.986, -99.236)	CMC 404	Done	Present study
31	<i>H. i. torridus</i>	Morelos	1.2 km E de la Nopalera, 1182 m (18.799, -99.069)	CMC 3197 CMC 3199	Done Done	Present study
32	<i>H. i. torridus</i>	Morelos	3 km carretera Tilzapotla-Coaxitlan, Puente de Ixtla, 1259 m (18.464, -99.257)	CMC 2999 CMC 3008 CMC 3020 CMC 3514 CMC 3522	Done Repeat Repeat Done Done	Present study
33	<i>H. i. torridus</i>	Morelos	2.23 Km by road Quebrantadero-Contla, 1053 m (18.516, -98.801)	CMC 3060 CMC 3076	Done Done	Present study
34	<i>H. i. torridus</i>	Puebla	3.6 km N, 4.22 km W, Techachalco,	CIB 24525 CIB 24526	Done Done	Present study

			2392 m (19.412, -97.475)			
35	<i>H. i. texensis</i>	Puebla	3.5 miles SW Xicotepc de Juarez, 1167 m (20.279, -97.964)	TCWC 41724 CM 79450 CM 70451	DQ 168490 DQ 168491 DQ 168492	Rogers and Vance, 2005
36	<i>H. i. texensis</i>	Tamaulipas	Ejido El Plomo, 26 km S, 10 km W La Peña, 693 m (23.144, -98.240)	CRD 6316 CRD 6319	Done Done	Present study
37	<i>H. i. texensis</i>	Tamaulipas	Rancho Sargento, 3 mi SE Ejido Los Arroyos, 65 m (23.826, -97.998)	CRD 7879 CRD 7880	Done Done	Present study
38	<i>H. i. texensis</i>	Tamaulipas	2.2 miles N Soto la Marina, 24 m (23.814, -98.189)	TCWC 42044 TCWC 42045 TCWC 42046 TCWC 42047 TCWC 42048	DQ 168497 DQ 168498 DQ 168499 DQ 168500 DQ 168501	Rogers and Vance, 2005
39	<i>H. i. guerrerensis</i>	Guerrero	6.1 km SW (by road) Omiltemi, 2,490 m (17.549, -99.721)	BYU 20646	DQ 168473	Rogers and Vance, 2005
40	<i>H. i. guerrerensis</i>	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo, 1802 m (17.533, -99.716)	CMC 400	Done	Present study
41	<i>H. i. irroratus</i>	Guerrero	4.8 Km S El Tejocote, Malinaltepec, 2509 m (17.305, -98.667)	CMC 1510 CMC1511 CMC 1513 CMC 1514 CMC 1515	Done Done Done Done	Present study
42	<i>H. i. torridus</i>	Oaxaca	6.35 km W Cosoltepec, 1584 m (18.131, -97.848)	CIB 29501 CIB 29502	Done Done	Present study
43	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	San Jose Chiltepec, 57 m (17.948, -96.167)	CIB 27619	Done	Present study
44	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	La Cumbre 1.2 Km SE ± 0.6 Km S Agua Fria, 1951 m (17.209, -97.979)	CMC 1507 CMC 1508 CMC 1509	Done Done Done	Present study
45	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	Santuario de las aves. 10.5 km N, 2 km W, 2785 m (17.142, -97.624)	CIB 29513 CIB 29514	Done Done	Present study
46	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	1 km S, 1 km W San Pedro Nexicho, 2131 m (17.26, -96.58)	CIB 30177 CIB 30178	Done Done	Present study

47	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	1.34 km S, San Juan Quiahije, 2147 m (16.29, -97.31)	CIB 30184 CIB 30185	Done Done	Present study
48	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	El Polvorín, 5.3 km turn off Lachao Viejo (by road), 1735 m (16.453, -97.002)	CMC 408 CMC 410	Done Done	Present study
48	<i>H. i. pictus</i>	Oaxaca	El Polvorín, 5.3 km turn off Lachao Viejo (by road), 1735 m (16.453, -97.002)	BYU 20656	DQ 168534	Rogers and Vance, 2005
49	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	18.5 km S (by road) Sola de Vega, 2175 m (16.199, -97.134)	BYU 20652 CMC 419	DQ 168487 DQ 168531	Rogers and Vance, 2005
50	<i>H. i. irroratus</i>	Oaxaca	2.5 km NE, San Juan Mixtepec, 2193 m (16.26, -96.29)	CIB 30181	Done	Present study
51	<i>H. pictus</i>	Oaxaca	0.5 km W, San Felipe Lachillu, 897 m (16, -96.15)	CIB 30288 CIB 30289	Done Done	Present study
52	<i>H. pictus</i>	Oaxaca	2 km N, Magdalena Tacotepec, 142 m (16.53, -95.2)	CIB 30373	Done	Present study

Appendix 2. Samples of *Heteromys* and *Perognathus* species used for calibrations of divergence time estimations listed by species, number of employed sequences by specie, citation of the paper where sequences were published, and GenBank accession numbers.

Specie	Employed sequences	Citation of original paper	GenBank Accession No.
<i>Heteromys pictus</i>	32	Rogers and Vance, 2005	DQ168503 DQ168504 DQ168505 DQ168506 DQ168507 DQ168508 DQ168509 DQ168510 DQ168511 DQ168512 DQ168514 DQ168515 DQ168516 DQ168517 DQ168518 DQ168519 DQ168520 DQ168521 DQ168522 DQ168523 DQ168524 DQ168525 DQ168526 DQ168527 DQ168528 DQ168529 DQ168530 DQ168532 DQ168533 DQ168534 DQ168535
<i>Heteromys pictus</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926359
<i>Heteromys desmarestianus</i>	4	Rogers and Gonzalez, 2010	GU646923 GU646925 GU646995 GU646996
<i>Heteromys desmarestianus</i>	2	Rogers and Vance, 2005	DQ168466 DQ168467
<i>Heteromys gaumeri</i>	3	Rogers and Gonzalez, 2010	GU646997 GU646998 GU646999
<i>Heteromys gaumeri</i>	1	Montgelard et al. 2002	AJ389536

<i>Heteromys anomalus</i>	1	Rogers and Vance, 2005	DQ168468
<i>Perognathus amplus</i>	1	Rogers and Vance, 2005	DQ168552
<i>Perognathus flavus</i>	1	Rogers and Vance, 2005	DQ168551
<i>Perognathus amplus</i>	1	Smith, 1998	U65301
<i>Perognathus longimembris</i>	1	Smith, 1998	U65302
<i>Perognathus merriami</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926409
<i>Perognathus fasciatus</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926410
<i>Perognathus flavescens</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926411
<i>Perognathus apache</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926412
<i>Perognathus alticola</i>	1	Alexander and Riddle, 2005	AY926413

Capítulo 3. Implementation of geometric morphometrics methods in the delimitation of putative species within *Heteromys irroratus* group Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae).

María Agustina Gutiérrez-Costa, Sandra Milena Ospina Garcés, Francisco Xavier González-Cózatl, Duke Sanford Rogers

[Este capítulo será enviado a Organism Diversity and Evolution]

Implementation of geometric morphometrics methods in the delimitation of putative species within *Heteromys irroratus* group Gray 1868 sensu lato (Rodentia: Heteromyidae).

María Agustina Gutiérrez-Costa¹, Sandra Milena Ospina Garcés², Francisco Xavier González-Cózat¹, Duke Sanford Rogers^{3*}

¹Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, CP.62209, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: maria.gutierrezcos@uaem.edu.mx (MAG-C), xavier@uaem.mx (FXG-C).

²Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana, José María Morelos No. 44 y 46. Col. Centro, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México. E-mail: ospinagarcess@gmail.com (SMOG).

³Monte L. Bean Life Science Museum and Department of Biology, Brigham Young University. CP.84602, Provo, Utah, United States. E-mail: *duke_rogers@byu.edu (DSR).

3.1. Introduction

Heteromys irroratus is a species with a wide distribution in México and has been recognized as a diverse taxonomic group with seven subspecies (Genoways, 1973). Distinction of these subspecific entities was mostly based on information of conventional external measurements and color patterns, skull structures, and geographic distribution (Genoways, 1973; Dowler and Genoways, 1978; Williams et al., 1993). Nonetheless, Rogers and Vance (2005), based on sequence data of the Cytochrome *b* (Cyt *b*), suggested the existence of at least two cryptic species within *H. irroratus*; one candidate species would be represented by populations of *H. i irroratus* and *H. i. guerrerensis* from Oaxaca and Guerrero, respectively, and the other putative species would include samples of *H. i alleni* from near Pátzcuaro, Michoacán. Later, Gutiérrez-Costa et al. (2021), also using data of the same gene but with a more extensive population sample, identified an additional lineage within *H. irroratus* from Jalisco that could represent a valid species, *H. i bulleri*. More recently, Gutiérrez-Costa et al. (*in prep.*), also analyzing Cyt *b* data of a comprehensive geographic sample of members of *H. irroratus*, proposed that this group could include at least seven candidate species: *H. alleni*, *H. jaliscensis*, *H. texensis*, *H. pretiosus*, *H. irroratus*, *H. acutus*, and *H. bulleri*. Admittedly, suggestions that indicate the existence of all of these species rest on the evidence of a single molecular marker, so it would be desirable to test if these proposed species can also be delimited considering alternative attributes.

Species delimitation has always been an important issue in biology, particularly for cases when cryptic species exist (Mayr, 1942). Recent studies suggest that an appropriate way for the delimitation of species should include the analyzes of different characters (i.e. molecular markers, morphology, geographic distribution, ecological attributes, and reproductive isolation, among others; Padial et al., 2010; Puillandre et. al., 2012; Jörger

and Schrödl, 2013). In regard to the assessment of morphological attributes, geometric morphometrics (GM) has proven to be a very useful tool to delimit species that are hyperdiverse or do not have apparently marked morphological differences (Cardini and Elton, 2007). GM methods have been successfully used to describe variations in different taxonomic groups such as mammals (Cardini et al., 2009; Soto-Vivas et al., 2011; García and Sánchez-González, 2013; Nava, 2016; Santana and Cheun, 2016; Platton and Conroy, 2017; Vallejo et al., 2017). Therefore, the goal of this study is to analyze morphological attributes (ventral and dorsal shape of the skull) employing GM tools to assess if there are differences between the candidate species within *H. irroratus* that may be useful to delimit them. A two-dimensional geometric morphometrics protocol was implemented to describe cranial shape and size variation, morphological differences were quantified, and morphological characters were estimated for the putative species forming the *H. irroratus* sensu lato complex.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Sampling

Skull of 526 adult specimens (300 females and 226 males) representing the seven candidate species suggested by Cyt b data (*H. alleni*, *H. jaliscensis*, *H. texensis*, *H. pretiosus*, *H. irroratus*, *H. acutus*, and *H. bulleri*) were examined. This material is held at the following mammals collections: Colección de Mamíferos del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM), Colección de Mamíferos Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI), Colección Mastozoológica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM), Laboratorio de Mastozoolología, Facultad de Biología de la Universidad

Michoacana San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), National Museum of Natural History (NMNH) and Brigham Young University (BYU). Sampling covered most of the distribution range of the species (Figure 1, Supplementary data 1), including 113 localities. In addition, sampling included the examination of vouchers from the type localities of seven of the candidate species (currently recognized as subspecies): Río Verde, San Luis Potosí (*H. alleni*); Sierra de Juanacatlán, Jalisco (*H. bulleri*); Zapotlán el Grande, Jalisco (*H. jaliscensis*); Pátzcuaro, Michoacán (*H. acutus*); Oaxaca (*H. irroratus*) and Metlaltoyuca, Francisco Z. Mena, Puebla (*H. pretiosus*). Moreover, specimens from additional type localities of groups that were, at some point, synonymized were also included: Puente de Ixtla, Morelos (*H. exiguus*, synonymized with *H. i. torridus*); Tlalpan, Ciudad de México (*H. i. pullus*, synonymized with *H. i. alleni*) and Close to Parral, Chihuahua (*H. i. canus*, synonymized with *H. i. alleni*). Discrimination of age categories that represent adult individuals was based on toothrow wear patterns described by Genoways (1973). Skull of each voucher was photographed in dorsal and ventral views with a Canon digital camera with a 58-millimeter lens. When taking the photographs, skulls were positioned in a plane parallel to the camera lens to avoid parallax errors. Also, a graduated ruler was placed in the lower part of each skull in order to have a reference scale for comparative purposes between images.

3.2.2. Digitization of images and configurations

Two-dimensional configurations of landmarks and semilandmarks were used to describe cranial shape and size variation. These landmarks configuration was selected taking into account previous studies using GM in rodents (Nava, 2016). A digitalization file was created in the software TPSUtil v.1.72 (Rohlf, 2017) and then landmark coordinates were obtained from photographs using the software TPSDig2 v.2.29 (Rohlf, 2017). Two landmark configurations were designed to examine cranial shape: I) 18 landmarks and 9

semilandmarks to the ventral view of the skull (Figure 2A) and II) 14 landmarks and 9 semilandmarks to the dorsal view of the skull (Figure 2B). Semilandmarks were set using guides drawn with the program Make Fan (Sheets, 2014) and described the arch zygomatic process contour.

3.2.3. Statistical analysis

The Generalized Procrustes Analysis (GPA) was used to remove the differences in scale, location and orientation between geometric configurations of each cranial configuration. GPA translates configurations to the origin, scales, and rotates it using a least squares distance criterion to obtain the shape information once all other variance factors have been removed (Rohlf and Slice, 1990). To align the configurations used in subsequent statistical analyses the *gpagen* function was used from the package Geomorph 3.1.2 (Adams et al., 2019) in R version 3.6.0 (R Core Team 2019). Semilandmarks were declared using a protocol and aligned along the contour to minimize the bending energy necessary to produce the change in the target outline to the consensus shape (Mitteroecker et al. 2013). Prior to the superposition procedures, the Centroid Size (CS), a size descriptor of the geometric configurations, was obtained by the square root of the sum of distances from each landmark to the centroid (Bookstein 1997). All geometric morphometric analyses were carried out in the package Geomorph 3.1.2 (Adams et al., 2019) in R version 3.6.0 (R Core Team 2019).

Sexual dimorphism

To evaluate if there were shape and size differences between sexes (sexual dimorphism) a Procrustes Analysis of Variance (ANOVA) was performed. This procedure tests the effect of CS, species, interaction between sex and species, and interaction between sex, species and CS, on shape variance, through the calculation of the Procrustes distance variance respect to the mean shape of each factor (Adams and Otálora-Castillo, 2013).

Shape differences between sexes in each species were explored using paired comparisons between group means, and their significance was tested by permutation testing, comparing the observed Procrustes distance (Pdis) to those obtained from random assignment of observation to groups in the R package Morpho (Schlager, 2017).

Allometry and pairwise distances

To evaluate differences in the intensity of relationships between shape and CS (allometric vectors) among species, comparisons of allometric growth vectors between species were undertaken. We calculated distances and angles between allometric vectors (shape projected on CS) in *H. irroratus* sensu lato, since heterogeneity of slopes was detected in these groups. We used a permutation procedure with 1000 replicates to test the significance of pairwise comparisons. Finally, the differences in the direction of the allometric trajectories among species were plotted.

Species shape variation

To evaluate if there were differences in shape between species, two approaches were implemented. Initially, pair-wise distances were estimated, including the level of significance, which were evaluated by a permutation test. These shape data were analyzed under a linear model evaluation with 1,000 replicates in the package RRPP version 0.4.2 (Collyer and Adams, 2018; Collyer and Adams, 2019).

Species shape variation

Alternatively, differences in shape between candidate species were explored using ordination methods. Differences in mean shape configurations of species were evaluated with Canonical Variate Analysis (CVA) on a previous Principal Components Analyses. To avoid bias caused by differences in sample size among species, the first five PCs were selected as shape variables. For both views of skull (ventral and dorsal) we obtained Mahalanobis distances between mean shapes for each of the species, as well as their P-

value, assessed by a permutation test on the original data matrix, with 1,000 replicates. Deformation grids were generated by pairs of species using nominal species of this species complex, *H. irroratus*, as reference configuration, and cranial variations were determined. Deformation grids were exaggerated by a magnitude of three in order to better appreciate changes in the morphological attributes. This was done with the R package Morpho version 2.7 (Schlager, 2017).

In order to assess overall similarity relationships of species, a hierarchical cluster analysis was performed using the `hclust` function of the `stats v.3.5.3` package [R Core Team (2019)]. Dendrograms were constructed from a dissimilarities matrix of Mahalanobis distances (D^2) obtained from the CVA, the “complete” grouping method.

3.3. Results

Sexual dimorphism

The Procrustes ANOVA approach indicated that there are statistical differences in ventral view of skull for shape and size as responses variables with sex nested in species ($p = 0.001$), unlike the dorsal view of skull where no significant differences were appreciated for this comparison ($p = 0.133$) (Table 1). In order to assess which species presented differences between males and females, a pairwise comparison between cranial shapes using Procrustes distances were performed, showed no significant differences for most groups (Supplementary data 2). In the case of the ventral view of the skull, only the comparisons between females and males of *H. alleni* and *H. irroratus* were significant ($p < 0.05$). When considering the dorsal view of the skull, no comparison was significant. Thus, only *H. alleni* and *H. irroratus* are contributing to the level of significance of sexual dimorphism in terms of the shape of the skull. Therefore, all subsequent analyzes were carried by pooled sexes.

Allometry and pairwise distances

The fitted linear models suggested a significant effect of size on shape variation where allometric slopes intersect each other (Figure 3). *H. irroratus* is the species with largest size for both views of skull (Figure 3A and 3B), and moreover *H. alleni* also has a larger size for the dorsal view (Figure 3B). However, *H. texensis* is the smallest size species for both views of the skull.

Pairwise comparisons between distances of shape means of each species showed significant differences ($p < 0.05$). The exceptions were between *H. jaliscensis* - *H. pretiosus* ($p = 0.088$) for the ventral view of skull and between *H. alleni* - *H. jaliscensis* ($p = 0.087$) for the dorsal view of skull (Table 2). Finally, pairwise comparisons of allometric vectors support significant differences between allometric vectors of proposed species for both views of skull (Dorsal: angles > 0.415 , $p < 0.05$, distances > 0.007 , $p < 0.05$; Ventral: angles > 0.665 , $p < 0.05$, distances > 0.009 , $p < 0.05$).

Species shape variation

Dispersion in the ordinal space defined by CVA (dimensions 1 and 2) show that *H. bulleri* and *H. acutus*, are the most differentiated forms on the axis of the first variable for both views of the skull (Figure 4). Complementarily, on the axis of the second canonical variable *H. pretiosus* is the most differentiated group. *H. jaliscensis* and *H. alleni* overlap for both skull views. In the dorsal view of the skull, *H. texensis* and *H. pretiosus* differ on the second axis variable (Figure 4A). However, analysis of the ventral view showed no differentiation between these two groups (Figure 4B). All grids of paired comparisons indicate that the greatest variation occur in the rostrum region. Also, grids show that *H. texensis* and *H. pretiosus* have shorter rostrum with respect to the other groups (Figure 4G, H, M and N). Furthermore, for the ventral view of skull, *H. jaliscensis*, *H. texensis* and *H. pretiosus* have a broad zygomatic width (Figure 4L, M and N). In addition, *H.*

irroratus exhibits the greatest length of skull. With respect to the mastoid width, it is bigger in *H. texensis* (Figure 4G and M), while it is narrower in *H. bulleri*, compared to the rest of the groups (Figure 4E and K).

Hierarchical Clustering

Dendrograms generated with Mahalanobis distances shows different clustering patterns for the dorsal and ventral views of the skull (Figure 5). The only consistent grouping pattern was the placement of *H. bulleri* as the sister group of the rest of the groups (Figure 5). For the dorsal view, *H. alleni* and *H. jaliscensis* are more similar to each other (Figure 5a). For the ventral view, *H. alleni* and *H. irroratus*, and *H. texensis* and *H. pretiosus* are more similar to each other, compared to other groups. The groups with the largest D^2 are *H. bulleri* – *H. pretiosus* ($D^2 = 8.388$) and those that were least differentiated are *H. alleni* – *H. jaliscensis* ($D^2 = 1.824$).

3.4. Discussion

Although *H. irroratus* has been viewed as species-level taxon with several subspecies (Genoways, 1973), it has recently been suggested that, at least seven putative species are represented in this group (Rogers and Vance, 2005; Gutiérrez-Costa et al. 2021; Gutiérrez-Costa et al. *in preparation*), based on molecular data: *H. alleni*, *H. bulleri*, *H. jaliscensis*, *H. irroratus*, *H. texensis*, *H. pretiosus* and *H. irroratus*. In this study, we evaluated if there are morphological features that can be useful in the delimitation of these groups. Admittedly, some of the evaluated traits displayed some degree of overlapping among groups, which agrees with previous observations that pointed out the difficulties to construct a useful key to members of the *H. irroratus* group because some of the most easily observed characters, external and cranial measurements, exhibit a high degree of geographic variation (Genoways, 1973). However, it was also demonstrated that there are

morphological attributes that can be useful in the taxonomic delimitation of these candidate species.

Our results of allometric trajectories showed that the candidate species *H. irroratus* is the largest form in skull size, which is congruent with what Genoways (1973) suggested in his taxonomic revision of spiny pocket mice. According to him, males and females from Omiltemi, Guerrero and south-central Oaxaca have, in average, the greatest total length compared to other groups. *H. irroratus* was described by Gray (1868) based on a single specimen from the state of Oaxaca, and its distribution was confined to central and south-central Oaxaca (western Oaxaca Sierra Madre del Sur high-elevation sites). Recently, Gutierrez-Costa et al. (*in preparation*) expanded the distribution range to humid heavily forested Pacific slopes of the Sierra Madre del Sur and Basin Depression of Guerrero state, considering that *H. guerrerensis*, described by Goldman (1911) as a monotypic species restricted to the vicinity of the type locality (Omiltemi, Guerrero) must be a synonym of *H. irroratus*. Original description of cranial characteristics of this species includes a massive skull, short and broad, with short, heavy rostrum, broad frontal region, narrow palate, and heavy dentition (Goldman, 1911). Additionally, our data also suggests that *H. irroratus* has rounded shape of posterior margin of nasals and premaxillary bones longer than nasals (Figure 4; landmarks 3, 4 and 5) that can be used a distinctive characters for this group.

The CVA analysis shows that the candidate species *H. acutus* could be discriminated in both views of skull (Figure 4A and B). This group was originally described by Hall and Villa (1948) as *H. i. acutus* with specimens from near Pátzcuaro, Michoacán (type locality) with a distribution range restricted to the type locality vicinity. Our data included samples from the northwest and northeast of type locality, and all were grouped as part of *H. acutus*. Therefore, we suggest that the distribution range of this species extends

from east-central Michoacán state along Transmexican Volcanic Belt in Michoacán state. This species has a large size comparable with *H. irroratus* (Figure 4C and I), but unlike this, *H. acutus* has emarginate shape of posterior border of nasals (Figure 4C; landmarks 3, 4 and 5). Moreover, *H. acutus* has the largest length of nasals with respect to the rest of species (the longitude of nasals can be appreciate regarding landmarks 1, 3 and 4; Figure 4C). In the original description of this group, Hall and Villa (1983) described the anterior border of interparietal bone as subcircular. In addition, our results suggest that this species has the narrowest interparietal compared to the rest of species (Figure 4C; landmarks 7, 8 and 9). Genoways (1973) placed *H. acutus* as a synonymy of *H. alleni*, despite the fact that, two qualitative cranial characters (divided interparietal and truncate nasals posteriorly) appear to distinguish the sample of *acutus* from other samples of *alleni*. This author found that a much smaller percentage of individuals of *acutus* have a divided interparietal when compared with other samples of *alleni*, and a much smaller percentage of the specimens of *acutus* have truncate nasals posteriorly than do specimens in other samples of *alleni*. Also, a reflectance analysis showed that *H. acutus* was slightly darker than other samples of *alleni* (Genoways, 1973). Although previously it was already suggested that *H. acutus* is genetically different (Rogers and Vance, 2005; Gutiérrez-Costa et al. *in preparation*), our data indicate that this group is also morphologically different from the rest of the samples of the *irroratus* group.

Our results from pairwise shape comparison and CVA ordination suggest that, in general, there are no significant differences between the candidate species *H. alleni* and *H. jaliscensis*. The specific taxonomic status of *H. alleni* and *H. jaliscensis* was proposed by Gutiérrez-Costa et al. (*in preparation*) based on molecular data. Although Goldman (1911) considered that the skull of *jaliscensis* is smaller with respect to *alleni*, it has also been mentioned that none of the qualitative cranial characteristics used in the revision of

spiny pocket mice by Genoways 1973 appear to be sufficiently distinctive to distinguish these two groups. Our results shows that *H. jaliscensis* and *H. alleni* have a similar skull in length, and the shape of posterior margin of nasals rounded with length of premaxillary bones longer than nasals. Nonetheless, our data also shows that *H. jaliscensis* has a much wider zygomatic process in the maxilla in relation to *H. alleni* (Figure 4J and L). In this context, it is proposed that the difference in this attribute can be used as a diagnostic character to distinguish between them. Geographically, *H. alleni* is widely distributed in the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Transmexican Volcanic Belt, while *H. jaliscensis* seems to be restricted to the Transmexican Volcanic Belt.

The candidate species *H. bulleri* could clearly be separated from other groups in the CVA ordination for ventral and dorsal views of skull (Figure 4A and B). Our results shows that *H. bulleri* has a narrow interparietal bone, in comparison with *H. alleni*, *H. irroratus*, *H. texensis* and *H. pretiosus* (Figure 4E; landmarks 7, 8 and 9). A distinctiveness characteristic of *H. bulleri* is that the mastoid width (Figure 4K, MW) is much narrower than the zygomatic process in the maxilla width (Figure 4K, ZW). These agrees with that proposed by Genoways (1973), who suggested that specimens from west central Jalisco (corresponding to *H. bulleri*) have a relatively much narrower mastoid region than the zygomatic process. Our data show that the shape of posterior margin of nasals is emarginate and the length of premaxillary bones is equal to nasals (Figure 4E; landmarks 3, 4 and 5). Also, Genoways (1973) suggested that *H. bulleri* can be distinguished from *H. alleni* and *H. irroratus* by its small triangular or subtriangular interparietal bone. Overall, our data show that *H. bulleri* is the candidate species with the highest levels of morphological divergence with respect to other putative species within *H. irroratus*, as depicted in the phenetic trees generated for both views of skull (Figure 5A and B). Until recently the geographic range of this form was restricted to La Laguna, Sierra de

Juanacatlán (type locality) and Soyatlán del Oro in the state of Jalisco. Gutiérrez-Costa et al. (2021), based on the molecular analysis of samples from suggested that the geographic range of this group would include the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, also in Jalisco, about 125 km southeast from the type locality and 80 km south from Soyatlán del Oro.

H. texensis and *H. pretiosus* are two candidate species that, until recently have been consider as the same taxon (Genoways, 1973). Nonetheless, Cyt *b* data suggest that they represent distinct species (Gutiérrez-Costa et al., 2021). Our data support this distinction since there are some morphological differences between these two forms. *H. texensis* has a much wider and larger interparietal compared to *H. pretiosus* (Figure 4G and H; landmarks 7, 8 and 9). Moreover, *H. texensis* show the greatest width across parietal bones in relation to other species (Figure 4G, PW), entailing a characteristic oval shape of skull in the posterior region. In addition, the shape of posterior margin of nasals is distinct; in *H. texensis*, the posterior margin of nasals is truncated whilst in *H. pretiosus* it is rounded (Figure 4G and H; landmarks 3, 4 and 5). However, both species have premaxillary bones much longer than nasals. Also, *H. pretiosus* and *H. texensis* have the base of incisors wider with respect to other species (Figure 4M and N; landmark 1 and semilandmark a) and zygomatic process in maxilla more wider in relation to *H. alleni*, *H. irroratus*, *H. acutus* and *H. bulleri* (Figure 4M and N; semilandmarks d-g). *H. pretiosus* is restricted in distribution to the Humid Tropical Zone in extreme eastern San Luis Potosí, northern Querétaro, eastern Puebla, and northern Veracruz, whilst *H. texensis* occupied low plains from southern Texas to southern Tamaulipas, west in eastern Nuevo León to China.

Taking into account the previous characteristics published for this group as well as our findings using geometric morphometrics, and knowing the lack of a taxonomic key that

permits separate the candidate species of *H. irroratus*, we propose the following Taxonomic key to identify candidate species within the *H. irroratus* group (sensu Genoways, 1973), based on previously published data (external body size, coloration patterns and distribution ranges ; Genoways 1973) and cranial morphological attributes evaluated by geometrics morphometrics analysis (this study).

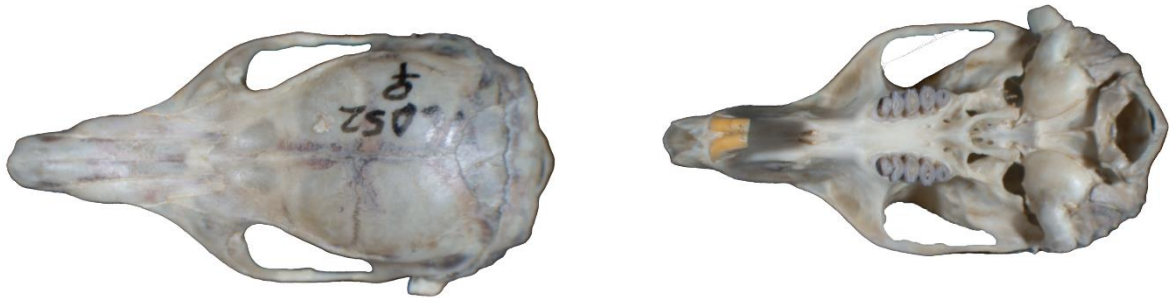
1. Large body size (175 mm – 251 mm), narrow zygomatic process in the maxilla, narrow base of incisors, longer or equal length of premaxillary and rounded or emarginate margin of nasals -----2
 Medium-small size, wider zygomatic process in the maxilla, narrow or wider base of incisors, longer length of premaxillary and rounded or truncate margin of nasals -----5
2. Longer length of premaxillary and rounded margin of nasals -----3
 Equal length of premaxillary and emarginate margin of nasals -----4
3. Color top of head and back fresh deep glossy black, distributed in the Sierra Madre del Sur in Guerrero and Oaxaca -----*H. irroratus*



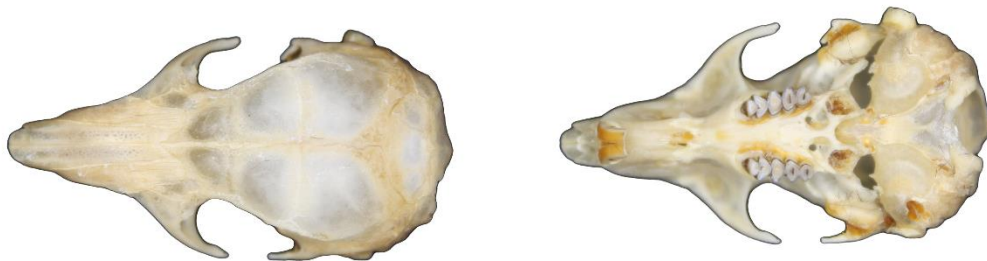
Color of the upper parts is blackish intimately grizzled with gray and sandy, extensive geographic range in the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and the Transmexican Volcanic Belt-----*H. alleni*



4. Color upper parts dark brown, has the largest length of nasals and narrowest interparietal, distribution in the Transmexican Volcanic Belt in Michoacán -----
-----*H. acutus*



Color above smokey gray, grizzled and lightened with yellowish, mastoid width much narrower than the zygomatic width, geographic range restricted to Sierra de Juanacatlán, Soyatlán del Oro and Biosphere Reserve Sierra de Manantlán, al in Jalisco-----
-----*H. bulleri*

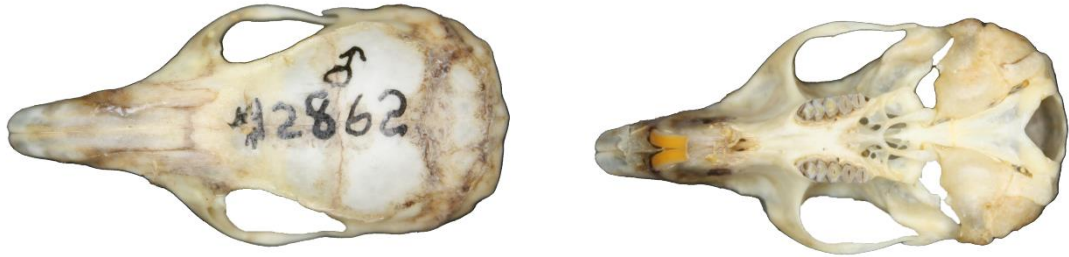


5. Color of the upper parts being dusky gray with a slight admixture of fulvous, narrow base of incisors, rounded shape of posterior margin of nasals, distribution restricted to the Transmexican Volcanic Belt in Jalisco and southwestern Zacatecas -----
-----*H. jaliscensis*

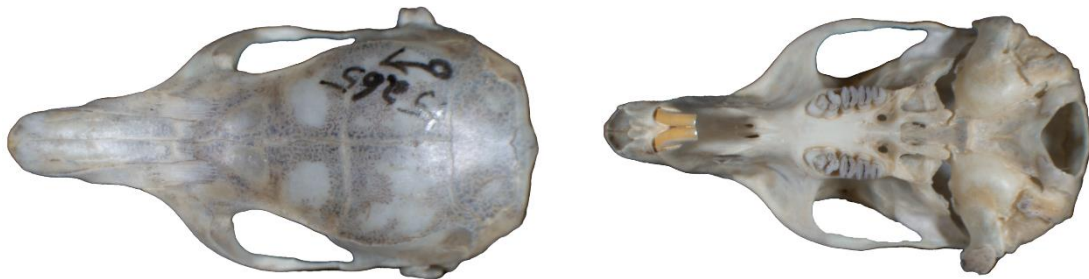


Rounded or truncated margin shape of nasals -----6

6. Color of upper parts pale grayish brown or drab, coarsely grizzled with red and blackish hair (the red predominating), truncate posterior margin of nasals, distribution restricted to low plains from southern Texas to southern Tamaulipas and eastern Nuevo León -----*H. texensis*



Color upper parts dark mouse gray, rounded posterior margin of nasals, distribution restricted to humid basal mountain slopes in eastern San Luis Potosi, northern Querétaro, eastern Puebla, and northern Veracruz -----
-----*H. pretiosus*



Literatura cited

- Adams DC. Otárola-Castillo E. 2013. Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution*. 4: 393–399.
- Adams DC. Collyer ML. Kaliontzopoulou A. 2019. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.1.0. <https://cran.r704project.org/package=geomorph>.
- Cardini A. Nagorsen D. O’Higgins P. Polly PD. ThoringTon Jr RW. Tongiorgi P. 2009. Detecting biological distinctiveness using geometric morphometrics: an example case from the Vancouver Island marmot. *Ethology Ecology & Evolution*. 21: 209-223.
- Collyer ML. Adams DC. 2018. RRPP: An R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods in Ecology and Evolution*. 9: 1772–1779.
- Collyer ML. Adams DC. 2019. RRPP: Linear Model Evaluation with Randomized Residuals in a Permutation Procedure. R package version 0.4.0. <https://cran.r-project.org/package=RRPP>.
- Dowler RC. Genoways HH. 1978. *Liomys irroratus*. *Mammalian species*. 82: 1-6.
- García FJ. Sánchez-González E. 2013. Morfometría geométrica craneal en tres especies de roedores arborícolas neotropicales (Rodentia: Cricetidae: *Rhipidomys*) en Venezuela. *Therya*. 4:157-178.
- Genoways HH. 1973. Systematics and Evolutionary Relationships of Spiny Pocket Mice. Genus *Liomys*. Special Publications The Museum Texas Tech University. 368 pp.
- Goldman EA. 1911. Revision of the spiny pocket mice (genera *Heteromys* and *Liomys*). *North America Fauna*. 34: 1-70.
- Gray JE. 1868. Synopsis of the species of Saccomyinae, or pouched mice, in the collection of British Museum. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 199- 206 pp.
- Gutiérrez-Costa MA. González-Cózatl FX. Ramírez-Martínez MM. Iñiguez-Dávalos LI. Rogers DS. 2021. Molecular data suggest that *Heteromys irroratus bulleri* should be recognized as a species-level taxon. *Therya*. 12: 139-148.
- Hall ER. Villa RB. 1948. A new pocket gopher (*Thomomys*) and a new spiny pocket mouse (*Liomys*) from Michoacán, México. University of Kansas Publications, Museum of Natural History. 1: 249–256.
- Jörger KM. Schrödl M. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers Zoology*. 10: 59.
- Mayr E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press. 349 pp.
- Mitteroecker P. Gunz P. Windhager S. Schaefer K. 2013. A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24: 59–66.

- Nava E. 2016. Sistemática de *Reithrodontomys megalotis* a partir de datos moleculares y morfométricos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Biodiversidad y Conservación. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). 165 pp.
- Padial JM. Miralles A. De la Riva I. Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*. 7: 16.
- Patton JL. Conroy CJ. 2017. The conundrum of subspecies: morphological diversity among desert populations of the California vole (*Microtus californicus*, Cricetidae). *Journal of Mammalogy*. 98: 1010–1026.
- Puillandre N. Modica M. Zhang Y. Sirovich L. Boisselier MC. 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*. 21: 2671-2691.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rogers DS. Vance VL. 2005. Phylogenetics of Spiny Pocket Mice (Genus *Liomys*): Analysis of Cytochrome b based on multiple heuristic approaches. *Journal of Mammalogy*. 86: 1085-1094.
- Rohlf FJ. Slice D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*. 39: 40–59.
- Rohlf FJ. 2017. Tps Utility program, Version 1.74. Ecology and Evolution and Anthropology, Stony Brook University.
- Santana SE. Cheung E. 2016. Go big or go fish: morphological specializations in carnivorous bats. *Proceedings of the Royal Society B*. 283: 20160615.
- Schlager S. 2017. Chapter 9 - Morpho and Rvcg – Shape Analysis in R: R-Packages for Geometric Morphometrics, Shape Analysis and Surface Manipulations. *Statistical Shape and Deformation Analysis*. Guoyan Zheng. Shuo Li. Gabor Székely (eds). Academic Press. 217 -256 pp.
- Sheets HD. 2014. Morphometric software IMP 8.0. Department of Geology, SUNY at Buffalo, New York. <http://www3.canisius.edu/~sheets/IMP%208.htm>.
- Soto-Vivas A. Liria J. De Luna E. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera. Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.). 27: 87- 102.
- Vallejo RM. Guerrero JA. González-Cózatl FX. 2017. Patterns of Differentiation and Disparity in Cranial Morphology in Rodent Species of the genus *Megadontomys* (Rodentia: Cricetidae). *Zoological Studies*. 56: 14.
- Williams DF. Genoways HH. Braun JK. 1993. Taxonomy and Systematics. Pp. 38-109 in *Biology of the Heteromyidae* (H. H. Genoways and J. H. Brown. eds.). Special Publication No. 10. American Society of Mammalogists.

Tables

Table 1. Procrustes Analysis of Variance (ANOVA) for the ventral and dorsal view of the skull of *Heteromys irroratus* group, based on the random permutation procedure of the residuals (RRPP), with 999 permutations.

Factor	df	R ²	Z	p
<i>Ventral view</i>				
Species	6	0.10346	12.4764	0.001**
CS	1	0.04766	8.4246	0.001**
Species:sex	7	0.03734	7.3528	0.001**
Species:sex:CS	13	0.03425	3.9098	0.001**
<i>Dorsal view</i>				
Species	6	0.13288	12.1469	0.001**
CS	1	0.05988	7.647	0.001**
Species:sex	7	0.01311	1.1365	0.133
Species:sex:CS	13	0.03319	3.5039	0.001**

**Significant probabilities.

Table 2. Pairwise distances between mean shapes of *Heteromys irroratus* group for the ventral and dorsal views of the skull. RRPP with 1000 permutations and significance level 0.05. In bold are marked no significant comparisons.

Species	Ventral view			Dorsal view		
	d	Z	p	d	Z	p
<i>H. acutus-H. alleni</i>	0.023	17.548	0.001**	0.025	17.290	0.001**
<i>H. acutus-H. bulleri</i>	0.021	2.860	0.007**	0.029	4.553	0.001**
<i>H. acutus-H. irroratus</i>	0.022	14.633	0.001**	0.022	13.512	0.001**
<i>H. acutus-H. jaliscensis</i>	0.027	13.945	0.001**	0.022	13.683	0.001**
<i>H. acutus-H. pretiosus</i>	0.030	11.914	0.001**	0.037	12.319	0.001**
<i>H. acutus-H. texensis</i>	0.033	10.423	0.001**	0.029	8.023	0.001**
<i>H. alleni-H. bulleri</i>	0.029	5.967	0.001**	0.038	7.713	0.001**
<i>H. alleni-H. irroratus</i>	0.011	8.240	0.001**	0.016	11.709	0.001**
<i>H. alleni-H. jaliscensis</i>	0.009	3.166	0.007**	0.007	1.443	0.087
<i>H. alleni-H. pretiosus</i>	0.014	3.746	0.003**	0.023	6.750	0.001**
<i>H. alleni-H. texensis</i>	0.018	4.361	0.002**	0.014	2.081	0.032*
<i>H. bulleri-H. irroratus</i>	0.026	4.408	0.002**	0.035	6.885	0.001**
<i>H. bulleri-H. jaliscensis</i>	0.034	6.848	0.001**	0.038	7.060	0.001**
<i>H. bulleri-H. pretiosus</i>	0.036	6.593	0.001**	0.042	7.126	0.001**
<i>H. bulleri-H. texensis</i>	0.036	5.870	0.001**	0.042	6.655	0.001**
<i>H. irroratus-H. jaliscensis</i>	0.013	6.046	0.001**	0.017	7.447	0.001**
<i>H. irroratus-H. pretiosus</i>	0.018	5.546	0.001**	0.021	5.654	0.001**
<i>H. irroratus-H. texensis</i>	0.024	6.586	0.001**	0.025	6.530	0.001**
<i>H. jaliscensis-H. pretiosus</i>	0.012	1.419	0.088	0.019	4.295	0.003**
<i>H. jaliscensis-H. texensis</i>	0.021	4.785	0.001**	0.017	2.723	0.017*
<i>H. pretiosus-H. texensis</i>	0.017	2.150	0.027*	0.029	5.597	0.001**

**Significant probabilities.

Figures

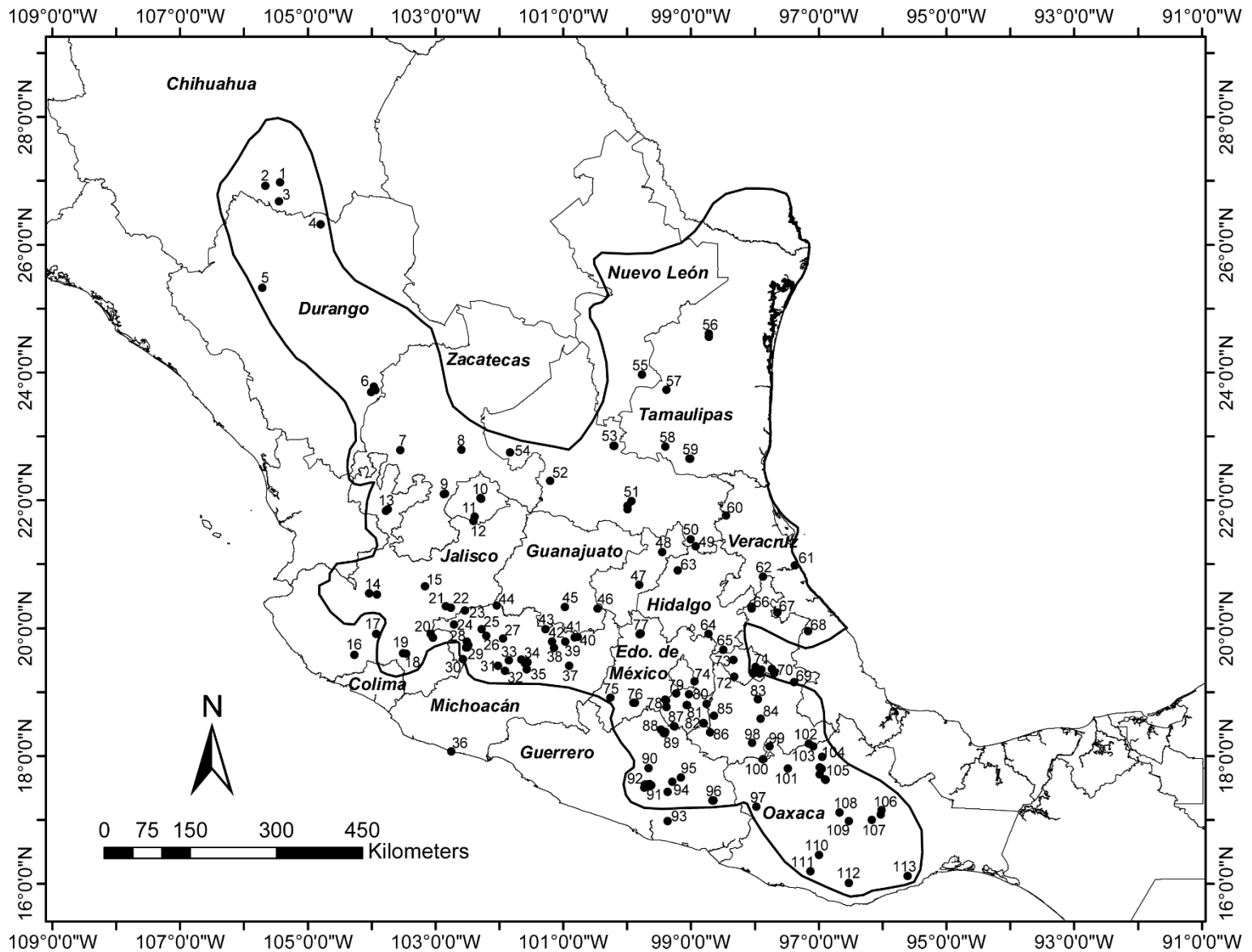


Figure 1. Sampling map of specimens photographed for geometric morphometrics analysis, numbers correspond with Supplementary data 1. Continuous line delimits distribution of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973) proposed by UICN (2016).

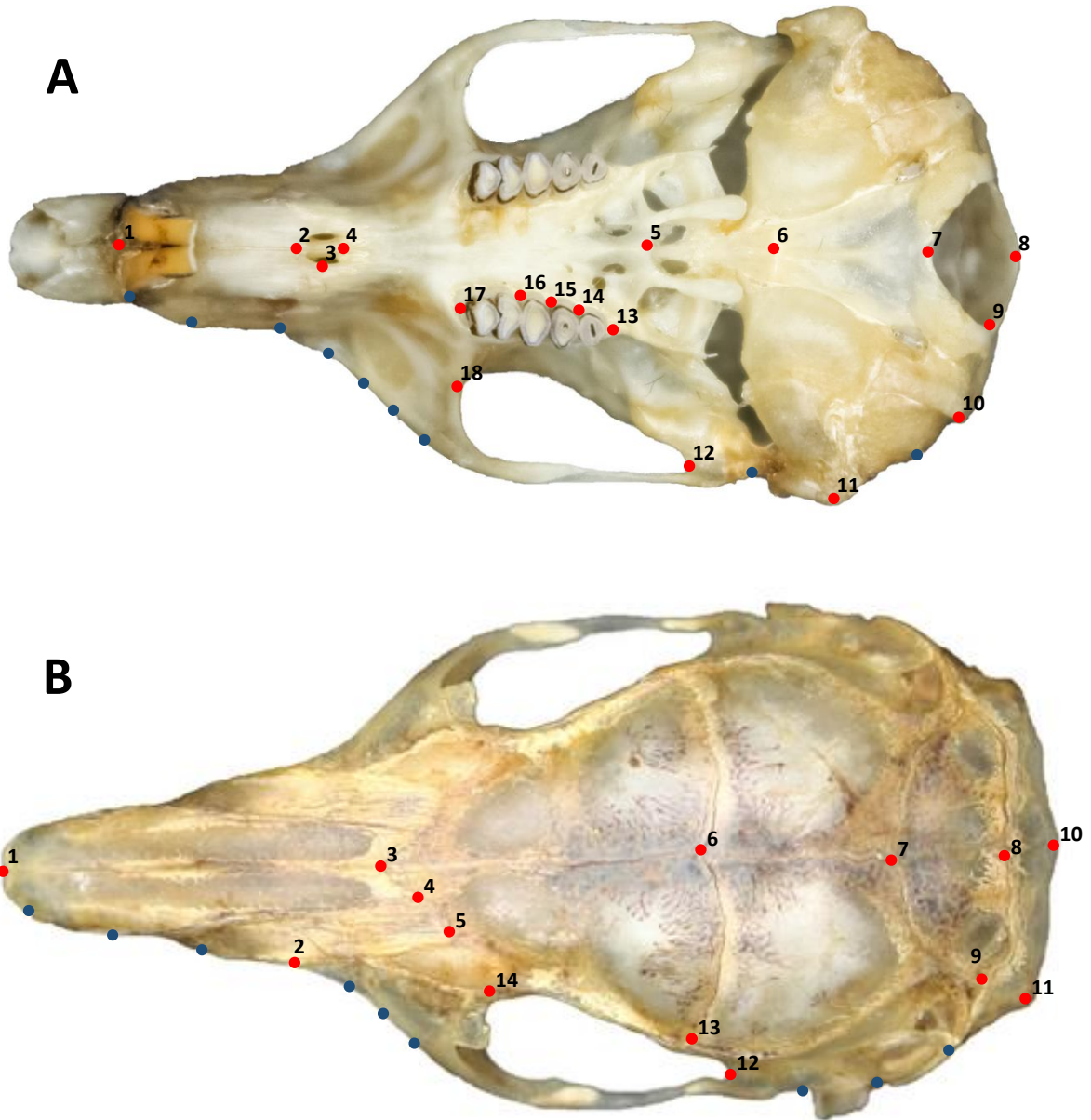


Figure 2. A, Landmarks (red) and semilandmarks (blue) configuration in the ventral view of the skull. Numbers correspond to: 1, Base of incisors; 2, Anterior end of the incisive foramen; 3, Incisive foramen width; 4, Posterior end of incisive foramen; 5, Posterior palatine margin; 6, Basisphenoids; 7, Anterior end of foramen magnum; 8, Posterior end of foramen magnum; 9, Upper border of foramen magnum; 10, Basioccipital overhang; 11, Tympanic bull; 12, Union of the zygomatic process and zygomatic arch; 13, Posterior

end of molar foramen; 14, Union between the 2nd molar and the 3rd molar; 15, Union between the 1st molar and the 2nd molar; 16, Union between the premolars and the 1st molar; 17, Anterior end of the molar foramen and 18, Inner border of the zygomatic arch.

B, Landmarks (red) and semilandmarks (blue) configuration in the ventral view of the skull. Numbers correspond to: 1, Anterior end of the rostrum between the nasals; 2, Anterior point of the zygomatic arch in the maxillary region; 3, Posterior margin of nasal bones; 4, Posterior margin junction between nasal and premaxillary bones; 5, Posterior margin of premaxillary bones; 6, Bregma (anterior end of sagittal suture); 7, Lambda (posterior end of sagittal suture); 8, Posterior margin of interparietal bone; 9, Left asterion (union of the squamous and lamboid sutures); 10, Most posterior point of the skull; 11, Outer point of the exoccipital region; 12, Posterior point of the zygomatic arch; 13, Coronary and squamous suture junction and 14, Anterior border of the zygomatic arch.

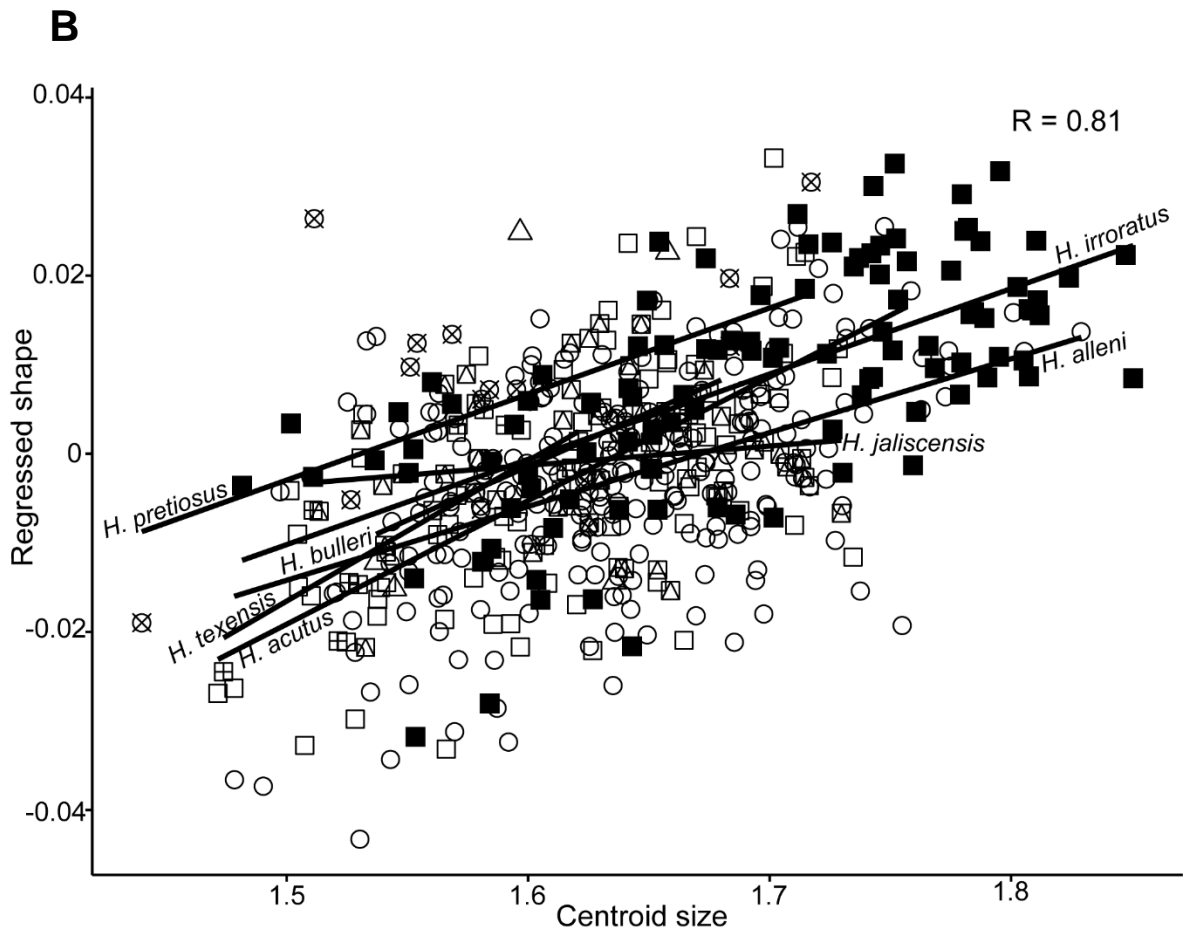
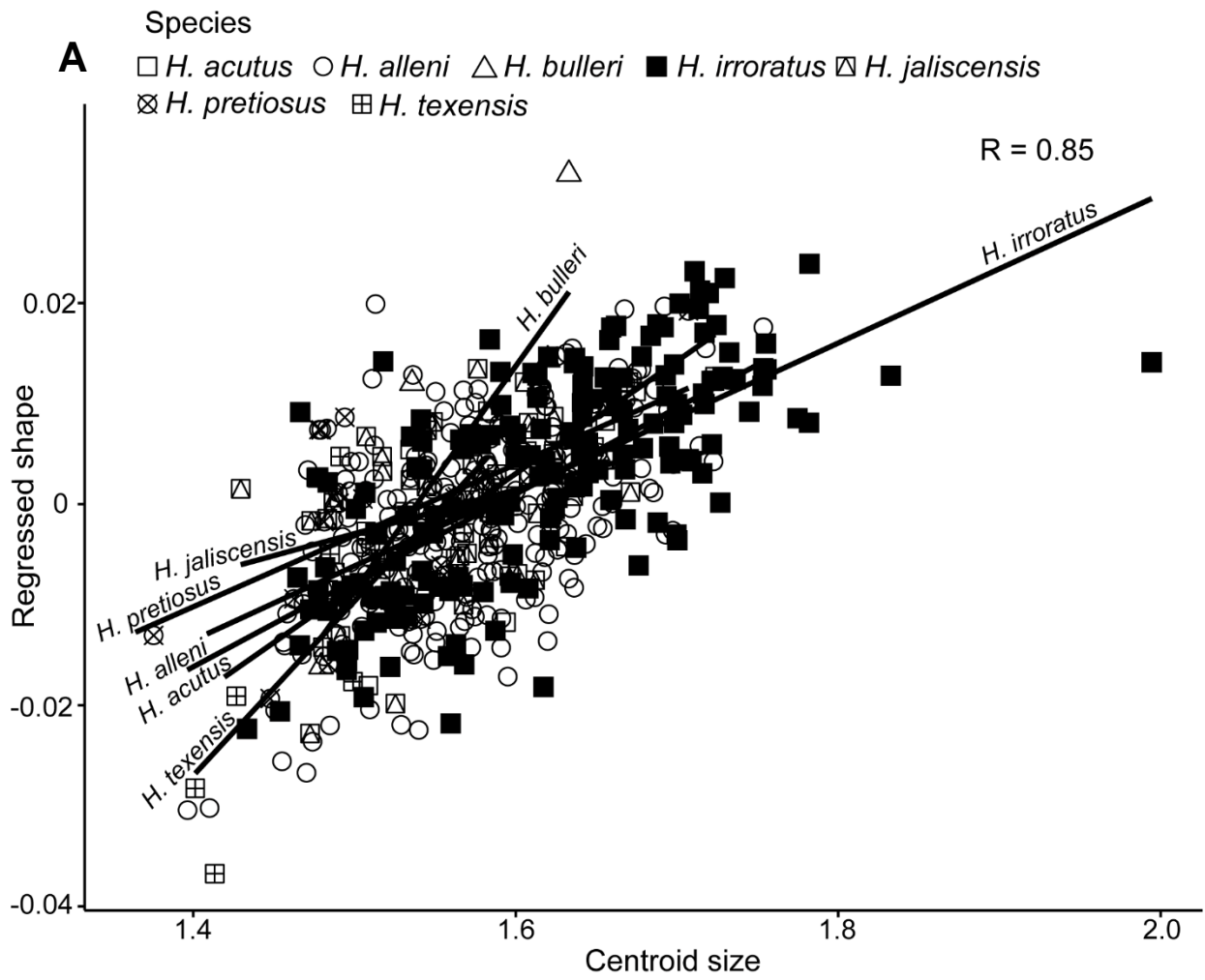


Figure 3. Multivariate regression of shape with respect to centroid size for the different forms of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973), for ventral (A) and dorsal (B) view of the skull.

Species
 ● *H. acutus* ● *H. alleni* ● *H. i. bulleri* ● *H. irroratus* ● *H. jaliscensis* ● *H. pretiosus* ● *H. texensis*

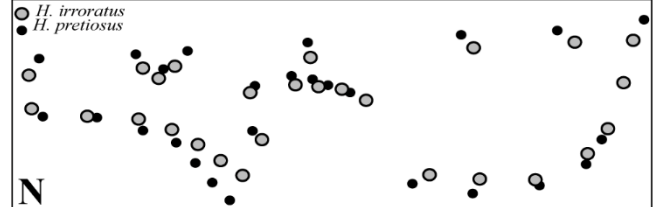
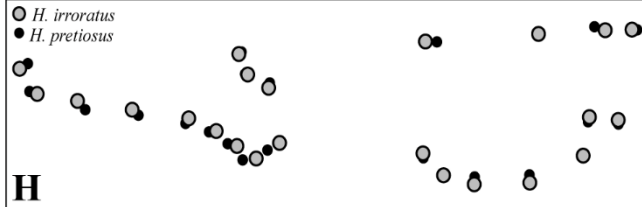
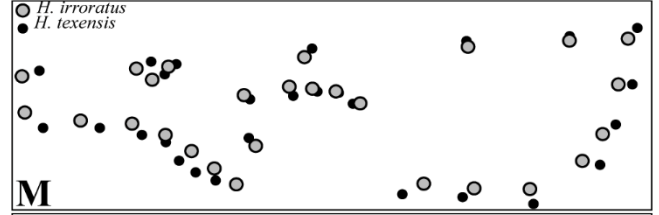
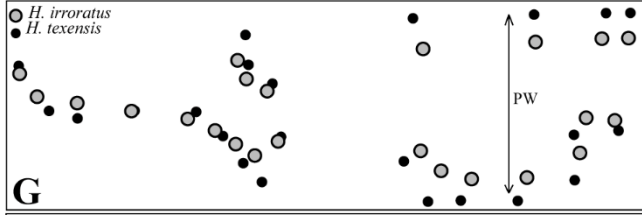
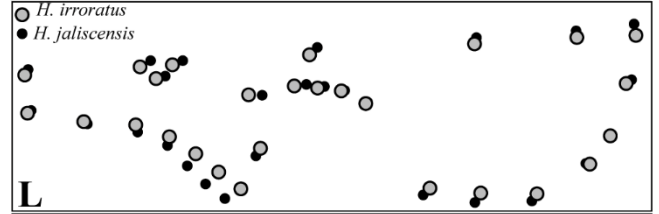
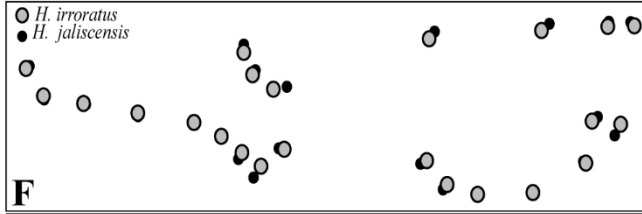
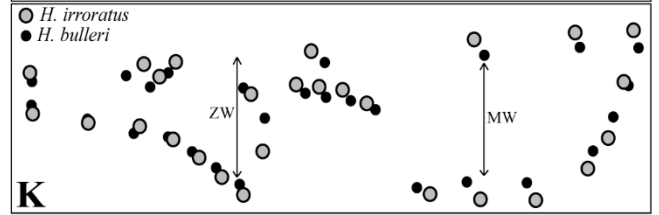
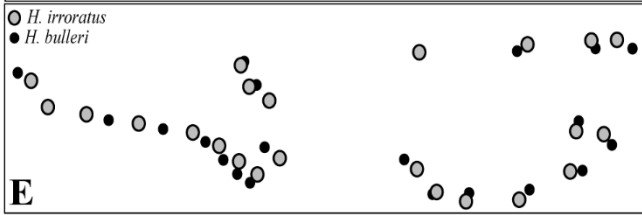
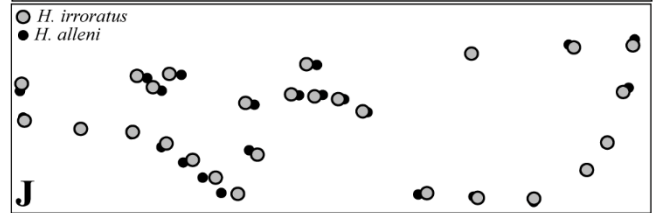
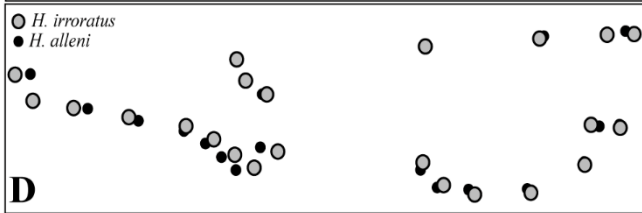
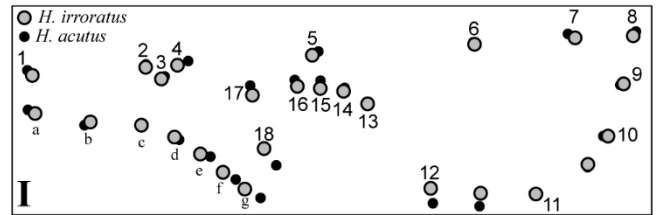
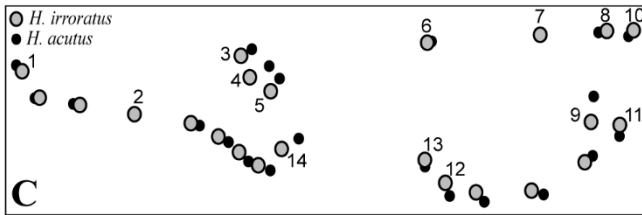
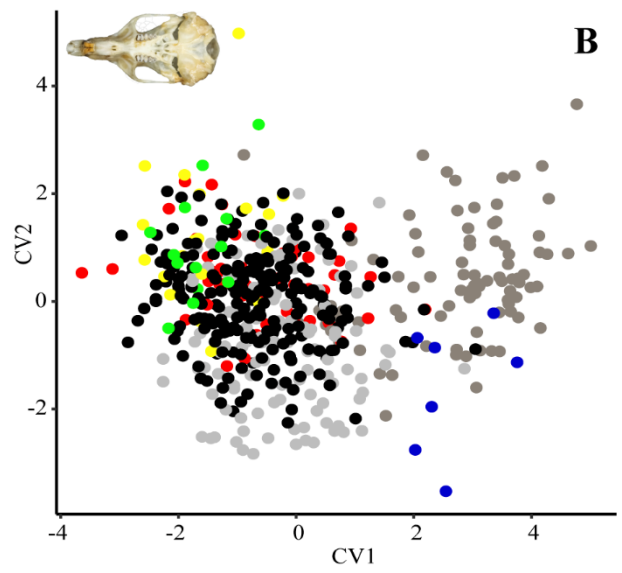
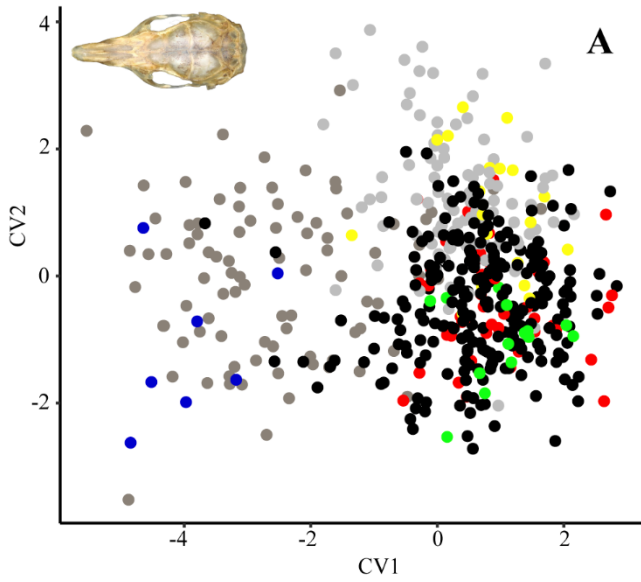


Figure 4. Canonical Variables Analysis for dorsal view of skull (A) and ventral (B) of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973). Deformation grids using *H. irroratus* as target group (C-N), landmarks numbering for both skull views in first grids, also semilandmarks for rostrum and zygomatic process in maxilla are listed (a-g). PW : Parietal width, ZW : Zygomatic process width and MW : Mastoid width.

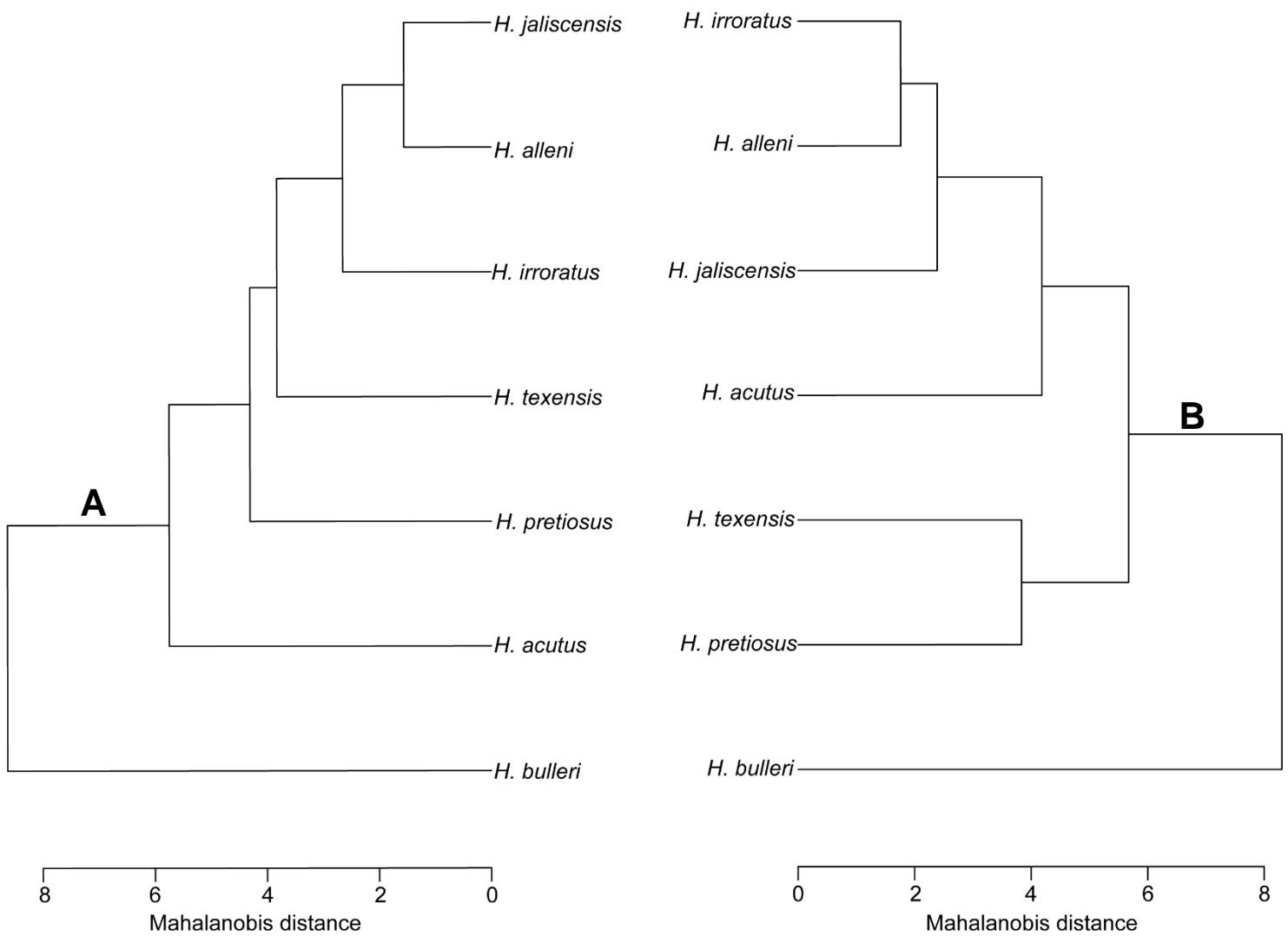


Figure 5. Dendrogram of phenetic relationships between groups of *Heteromys irroratus* (sensu Genoways, 1973) using Mahalanobis distances for both views of skull, A : Dorsal and B : Ventral.

Supplementary data 1. Specimens photographed for geometric morphometric analysis listed by latitude, longitude, museum voucher (acronym and number), state, municipality, sex, type of vegetation and biogeographic region (these last two extracted from CONABIO). Museum abbreviations are as follows: IBUNAM; Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, IPN; Colección Mastozoológica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, CMC; Colección de Mamíferos del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, UAMI; Colección de Mamíferos Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, UMSNH; Laboratorio de Mastozología, Facultad de Biología de la Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, BYU; Brigham Young University, NMNH; National Museum of Natural History, CVUDG; Colección Zoológica de Vertebrados, Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara.

Map No.	Latitude	Longitude	Museum Voucher No	State	Municipality	Sex
1	26.981361	-105.435042	IBUNAM33181	Chihuahua	Allende	Female
2	26.9299	-105.666847	NMNH96233	Chihuahua	Cerca del Parral	Female
	26.9299	-105.666847	NMNH96235	Chihuahua	Cerca del Parral	Male
	26.9299	-105.666847	NMNH96260	Chihuahua	Cerca del Parral	Female
	26.9299	-105.666847	NMNH96262	Chihuahua	Cerca del Parral	Female
3	26.681	-105.4563	NMNH56252	Chihuahua	Santa Rosalia	Male
4	26.3222222	-104.805556	IBUNAM37974	Durango	Hidalgo	Male
5	25.332067	-105.717516	IBUNAM26580	Durango	Tepihuanes	Female
	25.332067	-105.717516	IBUNAM26581	Durango	Tepihuanes	Male
6	23.783564	-103.968788	IBUNAM32908	Durango	Vicente Guerrero	Male
	23.783564	-103.968788	IBUNAM32909	Durango	Vicente Guerrero	Female
	23.783564	-103.968788	IBUNAM32910	Durango	Vicente Guerrero	Male
	23.6967436	-104.013103	IBUNAM36428	Durango	Vicente Guerrero	Female
	23.6967436	-104.013103	IBUNAM36429	Durango	Vicente Guerrero	Female
	23.6967436	-104.013103	IBUNAM36434	Durango	Vicente Guerrero	Male
	23.6967436	-104.013103	IBUNAM36435	Durango	Vicente Guerrero	Male
	23.7271859	-103.946372	BYU15766	Durango	Vicente Guerrero	Female
	23.7271859	-103.946372	BYU15765	Durango	Vicente Guerrero	Male

	23.7271859	-103.946372	BYU15767	Durango	Vicente Guerrero	Male
7	22.7880556	-103.554167	IPN31578	Zacatecas	Valparaiso	Male
	22.7880556	-103.554167	IPN31580	Zacatecas	Valparaiso	Male
	22.7880556	-103.554167	IPN31583	Zacatecas	Valparaiso	Female
	22.7880556	-103.554167	IPN31584	Zacatecas	Valparaiso	Male
	22.7880556	-103.554167	IPN31585	Zacatecas	Valparaiso	Female
	22.7880556	-103.554167	IPN31588	Zacatecas	Valparaiso	Male
8	22.7969444	-102.600556	IPN31597	Zacatecas	Morelos	Female
	22.7969444	-102.600556	IPN31598	Zacatecas	Morelos	Male
	22.7969444	-102.600556	IPN31599	Zacatecas	Morelos	Male
	22.7969444	-102.600556	IPN31601	Zacatecas	Morelos	Female
	22.7969444	-102.600556	IPN31602	Zacatecas	Morelos	Female
	22.7969444	-102.600556	IPN31603	Zacatecas	Morelos	Female
9	22.1	-102.870556	IPN31614	Zacatecas	Villanueva	Male
	22.1075	-102.854722	IPN31616	Zacatecas	Villanueva	Female
	22.1075	-102.854722	IPN31618	Zacatecas	Villanueva	Male
10	22.0413889	-102.299167	IPN28461	Aguascalientes	San Francisco de los Romo	Male
	22.0313889	-102.289167	IPN28464	Aguascalientes	San Francisco de los Romo	Female
	22.0313889	-102.289167	IPN28466	Aguascalientes	San Francisco de los Romo	Female
11	21.7513889	-102.389167	IPN35155	Aguascalientes	Aguascalientes	Female
	21.7513889	-102.389167	IPN35156	Aguascalientes	Aguascalientes	Female
12	21.6816667	-102.408056	IPN37080	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
	21.6816667	-102.408056	IPN37081	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
	21.6816667	-102.408056	IPN37083	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
	21.6816667	-102.408056	IPN37084	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
	21.6816667	-102.408056	IPN37085	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
	21.6816667	-102.408056	IPN37086	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Male
	21.6816667	-102.408056	IPN37087	Aguascalientes	Estanque Los Jiménez	Female
13	21.8663889	-103.749444	IPN33066	Jalisco	Bolaños	Female
	21.8663889	-103.749444	IPN33067	Jalisco	Bolaños	Male
	21.8663889	-103.749444	IPN33068	Jalisco	Bolaños	Male
	21.8663889	-103.749444	IPN33069	Jalisco	Bolaños	Female
	21.8663889	-103.749444	IPN33070	Jalisco	Bolaños	Male
	21.8413889	-103.779444	IPN33072	Jalisco	Bolaños	Male
	21.8413889	-103.779444	IPN33073	Jalisco	Bolaños	Female
14	20.5330556	-103.920833	IPN33077	Jalisco	Ameca	Female
	20.5330556	-103.920833	IPN33078	Jalisco	Ameca	Male
	20.54629	-104.04508	BYU16044	Jalisco	Ameca	Female
	20.54629	-104.04508	BYU16045	Jalisco	Ameca	Female
	20.54629	-104.04508	BYU16046	Jalisco	Ameca	Female
	20.54629	-104.04508	BYU16047	Jalisco	Ameca	Female

	20.54629	-104.04508	BYU16048	Jalisco	Ameca	Female
	20.54629	-104.04508	BYU16049	Jalisco	Ameca	Female
	20.54629	-104.04508	BYU16050	Jalisco	Ameca	Male
15	20.499	-103.145	NMNH88176	Jalisco	La Laguna, Juanacatlán	Female
16	19.586	-104.2743	CVUDG 1675	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Female
	19.586	-104.2743	CVUDG 1713	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Male
	19.586	-104.2743	CVUDG 1711	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Female
	19.586	-104.2743	CVUDG 1710	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Female
	19.586	-104.2743	CVUDG 1714	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Female
	19.586	-104.2743	CVUDG 1716	Jalisco	Estación Científica las Joyas	Male
17	19.9155555	-103.933333	IBUNAM28228	Jalisco	Tonaya	Male
18	19.6072222	-103.466111	IPN35032	Jalisco	Tuxpan	Female
	19.6072222	-103.466111	IPN35039	Jalisco	Tuxpan	Female
	19.6072222	-103.466111	IPN35040	Jalisco	Tuxpan	Female
19	19.6113889	-103.510278	IPN35031	Jalisco	Zapotlán el Grande	Female
	19.6113889	-103.510278	IPN35037	Jalisco	Zapotlán el Grande	Female
	19.6113889	-103.510278	IPN35038	Jalisco	Zapotlán el Grande	Female
	19.6113889	-103.510278	IPN35042	Jalisco	Zapotlán el Grande	Female
	19.6113889	-103.510278	IPN35043	Jalisco	Zapotlán el Grande	Female
20	19.9155555	-103.080833	IBUNAM26574	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28170	Jalisco	Mazamitla	Male
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28171	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28173	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28175	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28176	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28178	Jalisco	Mazamitla	Female
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28227	Jalisco	Mazamitla	Male
	19.8569444	-103.045	IBUNAM28179	Jalisco	Mazamitla	Female
21	20.3505556	-102.841667	IPN33080	Jalisco	Poncitlán	Male
	20.3505556	-102.841667	IPN33081	Jalisco	Poncitlán	Female
	20.3505556	-102.841667	IPN33082	Jalisco	Poncitlán	Male
	20.3505556	-102.841667	IPN33083	Jalisco	Poncitlán	Female
	20.3505556	-102.841667	IPN33084	Jalisco	Poncitlán	Female
	20.3505556	-102.841667	IPN33085	Jalisco	Poncitlán	Female
	20.3505556	-102.841667	IPN33086	Jalisco	Poncitlán	Male
22	20.3255556	-102.761667	IPN33091	Jalisco	Ocotlán	Female
	20.3255556	-102.761667	IPN33092	Jalisco	Ocotlán	Male
	20.3255556	-102.761667	IPN33093	Jalisco	Ocotlán	Female
	20.3255556	-102.761667	IPN33094	Jalisco	Ocotlán	Female
	20.3255556	-102.761667	IPN33095	Jalisco	Ocotlán	Male
23	20.2833333	-102.544444	UAMI962	Jalisco	La Barca	Male

24	20.0587917	-102.716236	UMSNH2547	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Female
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2551	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Female
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2552	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Female
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2556	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Male
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2557	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Female
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2558	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Female
	20.0587917	-102.716236	UMSNH2559	Michoacán de Ocampo	Sahuayo	Male
25	19.9901778	-102.283408	UMSNH2560	Michoacán de Ocampo	Zamora	Female
	19.9901778	-102.283408	UMSNH2561	Michoacán de Ocampo	Zamora	Male
	19.9901778	-102.283408	UMSNH2564	Michoacán de Ocampo	Zamora	Female
	19.9901778	-102.283408	UMSNH2565	Michoacán de Ocampo	Zamora	Female
	19.9901778	-102.283408	UMSNH2566	Michoacán de Ocampo	Zamora	Female
	19.9901778	-102.283408	UMSNH2567	Michoacán de Ocampo	Zamora	Female
26	19.8866222	-102.207077	UMSNH1073	Michoacán de Ocampo	Tangancícuaro	Male
	19.8866222	-102.207077	UMSNH1080	Michoacán de Ocampo	Tangancícuaro	Male
27	19.8447222	-101.945277	UMSNH1774	Michoacán de Ocampo	Municipio Cotija	Male
28	19.7944444	-102.5125	UAMI10587	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10588	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10589	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10590	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10591	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10592	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7944444	-102.5125	UAMI10593	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Female
	19.7389333	-102.486788	UMSNH1488	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Male
	19.7389333	-102.486788	UMSNH1489	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Male
	19.7389333	-102.486788	UMSNH1490	Michoacán de Ocampo	Tinguindín	Male
29	19.7020667	-102.522561	UMSNH1478	Michoacán de Ocampo	Tocumbo	Female
	19.7020667	-102.522561	UMSNH1723	Michoacán de Ocampo	Tocumbo	Male
	19.7020667	-102.522561	UMSNH1748	Michoacán de Ocampo	Tocumbo	Male

30	19.5174056	-102.5728222	UMSNH2058	Michoacán de Ocampo	Municipio Los Reyes	Male
	19.5174056	-102.5728222	UMSNH2059	Michoacán de Ocampo	Municipio Los Reyes	Female
31	19.4151306	-102.02543	UMSNH16	Michoacán de Ocampo	Carretera Uruapan-Playa Azul	Female
32	19.3345056	-101.918238	UMSNH527	Michoacán de Ocampo	Municipio Taretán	Female
33	19.5013278	-101.8521083	UMSNH479	Michoacán de Ocampo	Tingambato	Female
	19.5013278	-101.8521083	UMSNH1074	Michoacán de Ocampo	Tingambato	Male
34	19.5134167	-101.657444	IPN24355	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.5134167	-101.657444	IPN24356	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4686056	-101.56195	IPN24359	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4686056	-101.56195	IPN24361	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Male
	19.4686056	-101.56195	IPN24362	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Male
	19.4686056	-101.56195	IPN24363	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4772417	-101.590875	IPN25503	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Male
	19.4772417	-101.590875	IPN25504	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4772417	-101.590875	IPN25506	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Male
	19.4597222	-101.6075	BYU16051	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4597222	-101.6075	BYU16052	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4597222	-101.6075	BYU16053	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Female
	19.4597222	-101.6075	BYU16055	Michoacán de Ocampo	Pátzcuaro	Male
35	19.3611667	-101.573667	CMC7761	Michoacán de Ocampo	Salvador Escalante	Male
36	18.0766417	-102.75601	UMSNH172	Michoacán de Ocampo	Caleta de Campos	Male
37	19.4177139	-100.910469	UMSNH1619	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1620	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1623	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1624	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1630	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Female
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1631	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1636	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Female
	19.4177139	-100.910469	UMSNH1665	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Male

	19.4177139	-100.910469	UMSNH1668	Michoacán de Ocampo	Municipio Tzitzio	Female
38	19.695175	-101.145677	UMSNH1071	Michoacán de Ocampo	Municipio Morelia	Male
	19.695175	-101.145677	UMSNH1072	Michoacán de Ocampo	Municipio Morelia	Male
	19.695175	-101.145677	UMSNH3578	Michoacán de Ocampo	Municipio Morelia	Male
39	19.7921333	-100.972222	UMSNH1766	Michoacán de Ocampo	Municipio de Indaparapeo	Male
40	19.8600583	-100.827255	UMSNH5	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH108	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1850	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1904	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1905	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1916	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Female
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1917	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Female
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1918	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1925	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1931	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Female
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1932	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
	19.8600583	-100.827255	UMSNH1944	Michoacán de Ocampo	Municipio Zinapécuaro	Male
41	19.865	-100.779722	UMSNH1803	Michoacán de Ocampo	San José del Rincón	Female
42	19.791175	-101.175894	UMSNH964	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
	19.791175	-101.175894	UMSNH966	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH967	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
	19.791175	-101.175894	UMSNH971	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH972	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH973	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
	19.791175	-101.175894	UMSNH975	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH978	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
	19.791175	-101.175894	UMSNH979	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
	19.791175	-101.175894	UMSNH981	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH983	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female

	19.791175	-101.175894	UMSNH984	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Female
	19.791175	-101.175894	UMSNH985	Michoacán de Ocampo	Municipio Tarímbaro	Male
43	19.9870194	-101.280722	UMSNH8	Michoacán de Ocampo	Huandacareo	Female
	19.9870194	-101.280722	UMSNH10	Michoacán de Ocampo	Huandacareo	Female
	19.9870194	-101.280722	UMSNH22	Michoacán de Ocampo	Huandacareo	Female
	19.9870194	-101.280722	UMSNH580	Michoacán de Ocampo	Huandacareo	Male
	19.9870194	-101.280722	UMSNH581	Michoacán de Ocampo	Huandacareo	Male
44	20.3574111	-102.046836	UMSNH1076	Michoacán de Ocampo	Cerro Grande	Male
	20.3574111	-102.046836	UMSNH1079	Michoacán de Ocampo	Cerro Grande	Male
45	20.3344213	-100.97787	IBUNAM22627	Guanajuato	Cortazar	Male
	20.3344213	-100.97787	IBUNAM22628	Guanajuato	Cortazar	Female
	20.3344213	-100.97787	IBUNAM22629	Guanajuato	Cortazar	Male
	20.3344213	-100.97787	IBUNAM22630	Guanajuato	Cortazar	Male
	20.3344213	-100.97787	IBUNAM22631	Guanajuato	Cortazar	Male
46	20.3132414	-100.46917	IBUNAM21381	Guanajuato	Jerecuaro	Female
	20.3132414	-100.46917	IBUNAM21382	Guanajuato	Jerecuaro	Male
47	20.6841667	-99.8130556	IPN27419	Querétaro	Cadereyta de Montes	Male
	20.6841667	-99.8130556	IPN27420	Querétaro	Cadereyta de Montes	Male
	20.6841667	-99.8130556	IPN27421	Querétaro	Cadereyta de Montes	Female
	20.6841667	-99.8130556	IPN27422	Querétaro	Cadereyta de Montes	Female
	20.6841667	-99.8130556	IPN27423	Querétaro	Cadereyta de Montes	Female
	20.6841667	-99.8130556	IPN27424	Querétaro	Cadereyta de Montes	Female
	20.6841667	-99.8130556	IPN27426	Querétaro	Cadereyta de Montes	Female
48	21.1975	-99.4530556	IPN27408	Querétaro	Jalpan de Serra	Female
	21.1975	-99.4530556	IPN27409	Querétaro	Jalpan de Serra	Male
	21.1975	-99.4530556	IPN27410	Querétaro	Jalpan de Serra	Female
	21.1975	-99.4530556	IPN27411	Querétaro	Jalpan de Serra	Male
	21.1975	-99.4530556	IPN27413	Querétaro	Jalpan de Serra	Female
	21.1975	-99.4530556	IPN27414	Querétaro	Jalpan de Serra	Male
	21.1975	-99.4530556	IPN27415	Querétaro	Jalpan de Serra	Female
49	21.2886111	-98.9311111	UAMI12157	San Luis Potosí	Matlapa	Female
	21.2886111	-98.9311111	UAMI12158	San Luis Potosí	Matlapa	Female
50	21.3935269	-99.0130347	BYU15268	San Luis Potosí	Xilitla	Female
	21.3935269	-99.0130347	BYU15265	San Luis Potosí	Xilitla	Male
	21.3935269	-99.0130347	BYU15266	San Luis Potosí	Xilitla	Male
	21.3935269	-99.0130347	BYU15267	San Luis Potosí	Xilitla	Male
51	21.9938889	-99.9344444	IPN31124	San Luis Potosí	Río Verde	Male

	21.9938889	-99.9344444	IPN31129	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.9938889	-99.9344444	IPN31130	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.9216667	-99.9966667	IPN31143	San Luis Potosí	Río Verde	Female
	21.9216667	-99.9966667	IPN31150	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.9216667	-99.9966667	IPN31154	San Luis Potosí	Río Verde	Female
	21.9216667	-99.9966667	IPN31157	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.9216667	-99.9966667	IPN31158	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.9216667	-99.9966667	IPN31159	San Luis Potosí	Río Verde	Female
	21.8616667	-99.9966667	IPN33880	San Luis Potosí	Río Verde	Male
	21.8616667	-99.9966667	IPN33882	San Luis Potosí	Río Verde	Female
52	22.3091667	-101.210833	IPN31072	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Male
	22.3091667	-101.210833	IPN31073	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Male
	22.3091667	-101.210833	IPN31074	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Male
	22.3091667	-101.210833	IPN31075	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Female
	22.3091667	-101.210833	IPN31076	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Male
	22.3091667	-101.210833	IPN31078	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Female
	22.3091667	-101.210833	IPN31092	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Female
	22.3091667	-101.210833	IPN31093	San Luis Potosí	Mexquitic de Carmona	Female
53	22.8591667	-100.206389	IPN31047	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
	22.8591667	-100.216389	IPN31049	San Luis Potosí	Guadalcazar	Female
	22.8591667	-100.216389	IPN31050	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
	22.8591667	-100.216389	IPN31053	San Luis Potosí	Guadalcazar	Female
	22.8591667	-100.216389	IPN31055	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
	22.8591667	-100.216389	IPN31056	San Luis Potosí	Guadalcazar	Female
	22.8591667	-100.216389	IPN31057	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
	22.8591667	-100.216389	IPN31060	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
	22.8591667	-100.216389	IPN31061	San Luis Potosí	Guadalcazar	Male
54	22.7516667	-101.835	IPN32259	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32260	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32261	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32262	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32263	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32275	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32277	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Female
	22.7516667	-101.835	IPN32278	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Male
	22.7516667	-101.835	IPN32280	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Male
	22.7516667	-101.835	IPN32281	San Luis Potosí	Villa de Ramos	Male
55	23.9719444	-99.7697222	IBUNAM26575	Nuevo León	General Zaragoza	Male
56	24.5647222	-98.7219444	IBUNAM28043	Tamaulipas	San Nicolas	Male
	24.6091666	-98.7219444	IBUNAM4249	Tamaulipas	San Nicolas	Female
57	23.7361111	-99.3902778	IBUNAM4240	Tamaulipas	Jaumave	Female
58	22.8444444	-99.4063889	IBUNAM26588	Tamaulipas	Ocampo	Male

59	22.6536111	-99.0255556	IPN42059	Tamaulipas	El Mante	Male
	22.6536111	-99.0163889	IPN42862	Tamaulipas	El Mante	Male
	22.6536111	-99.0163889	IPN42864	Tamaulipas	El Mante	Male
	22.6536111	-99.0163889	IPN42867	Tamaulipas	El Mante	Male
	22.6536111	-99.0163889	IPN42874	Tamaulipas	El Mante	Male
	22.6536111	-99.0163889	IPN42876	Tamaulipas	El Mante	Female
	22.6536111	-99.0163889	IPN42879	Tamaulipas	El Mante	Female
	22.6536111	-99.0255556	IPN42858	Tamaulipas	El Mante	Female
	22.6536111	-99.0255556	IPN42863	Tamaulipas	El Mante	Female
	22.6536111	-99.0255556	IPN42870	Tamaulipas	El Mante	Female
	22.6536111	-99.0255556	IPN42871	Tamaulipas	El Mante	Female
22.6536111	-99.0255556	IPN42872	Tamaulipas	El Mante	Female	
60	21.7675	-98.4533333	IBUNAM10845	Veracruz	El Higo	Female
61	20.9844444	-97.3744444	IBUNAM4239	Veracruz	Tuxpan	Female
62	20.8094444	-97.8791667	UAMI5938	Puebla	Francisco Z, Mena	Female
63	20.9055556	-99.2083333	UAMI12145	Hidalgo	Zimapan	Female
64	19.915	-98.7294444	IPN6810	Hidalgo	Zempoala	Female
	19.915	-98.7294444	IPN6811	Hidalgo	Zempoala	Male
65	19.6633333	-98.4958333	IPN20643	Hidalgo	Apan	Female
66	20.3088889	-98.0561111	UAMI5944	Puebla	Tlacuilopec	Female
	20.3088889	-98.0561111	UAMI5945	Puebla	Tlacuilopec	Female
	20.3444444	-98.0541667	UAMI4894	Puebla	Tlacuilopec	Female
	20.3444444	-98.0541667	UAMI4895	Puebla	Tlacuilopec	Female
	20.3444444	-98.0541667	UAMI4890	Puebla	Tlacuilopec	Female
67	20.2494444	-97.6491666	IBUNAM359	Veracruz	Coyutla	Female
68	19.9575	-97.1683333	IBUNAM11181	Veracruz	Atzalan	Male
69	19.1580556	-97.3875	UAMI1641	Puebla	Tlachichuca	Female
	19.1580556	-97.3875	UAMI1642	Puebla	Tlachichuca	Female
	19.1580556	-97.3875	UAMI1644	Puebla	Tlachichuca	Male
	19.1580556	-97.3875	UAMI1645	Puebla	Tlachichuca	Female
	19.1580556	-97.3875	UAMI1646	Puebla	Tlachichuca	Male
	19.1580556	-97.3875	UAMI1647	Puebla	Tlachichuca	Female
	19.1580556	-97.3875	UAMI1648	Puebla	Tlachichuca	Female
70	19.3013889	-97.6994444	UAMI6845	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Male
	19.3013889	-97.6994444	UAMI6846	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Male
	19.3013889	-97.6994444	UAMI6847	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Female
	19.3672222	-97.7377778	UAMI3214	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Female
	19.3672222	-97.7377778	UAMI3215	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Female
19.3672222	-97.7377778	UAMI3216	Tlaxcala	Cuapiaxtla	Female	
71	19.3527778	-97.9	UAMI29	Tlaxcala	Huamantla	Male
	19.3527778	-97.9	UAMI30	Tlaxcala	Huamantla	Male
70	19.3088889	-98.0355556	UAMI6838	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3088889	-98.0355556	UAMI6839	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3088889	-98.0355556	UAMI6840	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3088889	-98.0355556	UAMI6842	Tlaxcala	Huamantla	Male
	19.3088889	-98.0355556	UAMI6844	Tlaxcala	Huamantla	Male

	19.2927778	-98.0288889	UAMI6833	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.2927778	-98.0288889	UAMI6834	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.2927778	-98.0288889	UAMI6835	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.2927778	-98.0288889	UAMI6836	Tlaxcala	Huamantla	Male
	19.2927778	-97.9238889	UAMI3213	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3963889	-97.995	UAMI9050	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3963889	-97.995	UAMI9051	Tlaxcala	Huamantla	Female
	19.3963889	-97.995	UAMI9052	Tlaxcala	Huamantla	Female
72	19.2480556	-98.3266667	UAMI2317	Tlaxcala	Nativitas	Female
	19.2480556	-98.3266667	UAMI2318	Tlaxcala	Nativitas	Female
73	19.5086111	-98.3375	UAMI4260	Tlaxcala	Hueyotlipan	Female
	19.5086111	-98.3375	UAMI4261	Tlaxcala	Hueyotlipan	Female
	19.5086111	-98.3375	UAMI4262	Tlaxcala	Hueyotlipan	Female
	19.5086111	-98.3375	UAMI4263	Tlaxcala	Hueyotlipan	Female
74	19.1702778	-98.95	UAMI5936	Estado de México	Juchitepec	Female
75	18.9177778	-100.266667	IPN23414	Estado de México	Tejupilco	Female
	18.9177778	-100.266667	IPN23416	Estado de México	Tejupilco	Male
	18.9177778	-100.266667	IPN23418	Estado de México	Tejupilco	Male
	18.9177778	-100.266667	IPN23420	Estado de México	Tejupilco	Female
	18.9177778	-100.266667	IPN23426	Estado de México	Tejupilco	Female
	18.9177778	-100.266667	IPN23438	Estado de México	Tejupilco	Male
	18.9177778	-100.266667	IPN23439	Estado de México	Tejupilco	Male
	18.9177778	-100.266667	IPN23440	Estado de México	Tejupilco	Female
	18.9177778	-100.266667	IPN23443	Estado de México	Tejupilco	Female
	18.9177778	-100.266667	IPN23446	Estado de México	Tejupilco	Female
76	18.8369444	-99.9052778	IPN21710	Estado de México	Almoloya de Alquisiras	Male
	18.8380556	-99.8830556	IPN21712	Estado de México	Almoloya de Alquisiras	Female
	18.8380556	-99.8830556	IPN21713	Estado de México	Almoloya de Alquisiras	Female
77	19.9194	-99.80042	RMV325	Estado de México	Municipio Acambay	Male
	19.9194	-99.80042	RMV326	Estado de México	Municipio Acambay	Female
	19.9191	-99.78737	RMV330	Estado de México	Municipio Acambay	Male
	19.9191	-99.78737	RMV332	Estado de México	Municipio Acambay	Male
	19.91108	-99.80656	RMV333	Estado de México	Municipio Acambay	Female
	19.91108	-99.80656	RMV334	Estado de México	Municipio Acambay	Female
78	18.7695083	-99.38795	CMC1528	Morelos	Miacatlán	Female
	18.7695083	-99.38795	CMC2044	Morelos	Miacatlán	Female
	18.7695083	-99.38795	CMC2045	Morelos	Miacatlán	Female
	18.8871944	-99.4076667	CMC4201	Morelos	Miacatlán	Male
	18.8871944	-99.4076667	CMC4208	Morelos	Miacatlán	Female
	18.87375	-99.3922222	CMC4194	Morelos	Miacatlán	Male
79	18.9857	-99.2355	CMC7256	Morelos	Cuernavaca	Female
80	18.97275	-99.0326944	CMC1901	Morelos	Tepoztlán	Male
81	18.7998722	-99.0685611	CMC1689	Morelos	Yautepec	Male
	18.799375	-99.0642139	CMC1691	Morelos	Yautepec	Male
	18.7998722	-99.0685611	CMC1986	Morelos	Yautepec	Male

	18.7998722	-99.0685611	CMC1987	Morelos	Yautepec	Male
82	18.5163056	-98.8066667	CMC1742	Morelos	Axochiapan	Male
	18.51635	-98.8013111	CMC1556	Morelos	Axochiapan	Female
	18.5177139	-98.8075278	CMC1572	Morelos	Axochiapan	Female
	18.5182778	-98.8077778	CMC1942	Morelos	Axochiapan	Female
	18.5182778	-98.8077778	CMC1943	Morelos	Axochiapan	Male
	18.5162778	-98.8060833	CMC1954	Morelos	Axochiapan	Female
	18.5163056	-98.8066667	CMC1955	Morelos	Axochiapan	Female
	18.8183194	-98.7606028	CMC1459	Morelos	Axochiapan	Male
	18.8183194	-98.7606028	CMC1460	Morelos	Axochiapan	Male
83	18.8913889	-97.9541667	UAMI4295	Puebla	Tecali de Herrera	Female
84	18.586389	-97.9125	UAMI4298	Puebla	Tepexti de Rodriguez	Male
85	18.6369444	-98.6458333	UAMI9487	Puebla	Tepexco	Female
	18.6369444	-98.6458333	UAMI9488	Puebla	Tepexco	Female
86	18.3716667	-98.7041667	UAMI4280	Puebla	Huehuetlán El Chico	Female
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4281	Puebla	Huehuetlán El Chico	Male
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4282	Puebla	Huehuetlán El Chico	Female
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4283	Puebla	Huehuetlán El Chico	Male
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4284	Puebla	Huehuetlán El Chico	Male
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4285	Puebla	Huehuetlán El Chico	Female
	18.3716667	-98.7041667	UAMI4286	Puebla	Huehuetlán El Chico	Male
	18.3716667	-98.7041667	UAMI14898	Puebla	Huehuetlán El Chico	Female
87	18.4643083	-99.2570444	CMC1755	Morelos	Puente de Ixtla	Female
	18.4643083	-99.2570444	CMC1495	Morelos	Puente de Ixtla	Female
	18.4643083	-99.2570444	CMC1503	Morelos	Puente de Ixtla	Male
	18.4643083	-99.2570444	CMC1504	Morelos	Puente de Ixtla	Female
	18.4643083	-99.2570444	CMC1516	Morelos	Puente de Ixtla	Male
	18.4698333	-99.2715833	CMC1992	Morelos	Puente de Ixtla	Male
	18.4698333	-99.2715833	CMC1993	Morelos	Puente de Ixtla	Female
	18.4643083	-99.2570444	CMC2008	Morelos	Puente de Ixtla	Female
	18.4643083	-99.2570444	CMC2016	Morelos	Puente de Ixtla	Male
88	18.4166666	-99.4738888	IBUNAM8247	Guerrero	Buenavista de Cuellar	Female
89	18.378828	-99.404761	IBUNAM48499	Guerrero	Huitzucó	Male
	18.362222	-99.428333	IBUNAM48500	Guerrero	Huitzucó	Female
	18.362222	-99.428333	IBUNAM48501	Guerrero	Huitzucó	Female
	18.359458	-99.414283	IBUNAM48502	Oaxaca	Huitzucó	Male
90	17.8125	-99.6691666	IBUNAM4245	Guerrero	Eduardo Neri	Female
91	17.5491	-99.721	BYU20646	Guerrero	Omiltemi	Male
92	17.5491667	-99.721	CMC427	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5491667	-99.721	CMC428	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female

	17.5491667	-99.721	CMC430	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5566667	-99.7255556	IPN36676	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5566667	-99.7055556	IPN36677	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5466667	-99.6255556	IPN36679	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5566667	-99.7055556	IPN36680	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5466667	-99.6255556	IPN36681	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5566667	-99.7255556	IPN36815	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5069444	-99.735	IPN36816	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5069444	-99.735	IPN36817	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5069444	-99.735	IPN36818	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47123	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47124	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47125	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47126	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47127	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.556056	-99.654194	IBUNAM47128	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5583333	-99.69	IBUNAM40207	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5583333	-99.69	IBUNAM40208	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5597222	-99.6888888	IBUNAM40212	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5566667	-99.6855556	IBUNAM22353	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5422222	-99.7011111	IBUNAM40057	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5422222	-99.7011111	IBUNAM40059	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.55	-99.6925	IBUNAM40129	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.55	-99.6925	IBUNAM40130	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.55	-99.6925	IBUNAM40131	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.55	-99.6925	IBUNAM40134	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.5566666	-99.6955555	IBUNAM40215	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
	17.55	-99.6925	IBUNAM40231	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40254	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male

	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40255	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40256	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40257	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40258	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40259	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Female
	17.5661111	-99.6525	IBUNAM40260	Guerrero	Chilpancingo de los Bravo	Male
93	16.987444	-99.372528	IBUNAM47337	Guerrero	Mochitlán	Male
	16.987444	-99.372528	IBUNAM47340	Guerrero	Mochitlán	Female
	17.442389	-99.367056	IBUNAM47345	Guerrero	Mochitlán	Female
94	17.6016666	-99.2944444	IBUNAM2214	Guerrero	Tixtla de Guerrero	Male
95	17.6686111	-99.1611111	IBUNAM13821	Guerrero	Chilapa de Alvarez	Female
	17.6686111	-99.1611111	IBUNAM13822	Guerrero	Chilapa de Alvarez	Male
	17.6686111	-99.1611111	IBUNAM13823	Guerrero	Chilapa de Alvarez	Female
96	17.3053833	-98.6672667	CMC1046	Guerrero	Malinaltepec	Male
	17.3053833	-98.6672667	CMC1047	Guerrero	Malinaltepec	Female
	17.3053833	-98.6672667	CMC1048	Guerrero	Malinaltepec	Male
	17.3053833	-98.6672667	CMC1049	Guerrero	Malinaltepec	Female
	17.3048667	-98.6511167	CMC1088	Guerrero	Malinaltepec	Male
	17.3053833	-98.6672667	CMC1115	Guerrero	Malinaltepec	Female
97	17.2095	-97.9786667	CMC1004	Oaxaca	Santiago JuxTlahuaca	Male
	17.2095	-97.9786667	CMC955	Oaxaca	Santiago JuxTlahuaca	Male
	17.2095	-97.9786667	CMC956	Oaxaca	Santiago JuxTlahuaca	Male
98	18.2086111	-98.05	UAMI435	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI436	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI437	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI438	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI439	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI440	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI441	Puebla	Acatlán	Female
	18.2086111	-98.05	UAMI442	Puebla	Acatlán	Male
	18.2086111	-98.05	UAMI443	Puebla	Acatlán	Female
99	18.152167	-97.77275	IBUNAM45204	Oaxaca	Cosoltepec	Male
	18.152167	-97.77275	IBUNAM45205	Oaxaca	Cosoltepec	Male
	18.152167	-97.77275	IBUNAM45206	Oaxaca	Cosoltepec	Male
	18.152167	-97.77275	IBUNAM45207	Oaxaca	Cosoltepec	Male
	18.152167	-97.77275	IBUNAM45208	Oaxaca	Cosoltepec	Female
	18.152167	-97.77275	IBUNAM45209	Oaxaca	Cosoltepec	Female
	18.152194	-97.770806	IBUNAM45210	Oaxaca	Cosoltepec	Female
	18.152194	-97.770806	IBUNAM45213	Oaxaca	Cosoltepec	Female
100	17.956389	-97.875556	UAMI452	Puebla	Las Sidras	Male
	17.956389	-97.875556	UAMI453	Puebla	Las Sidras	Female

	17.956389	-97.875556	UAMI454	Puebla	Las Sidras	Female
	17.956389	-97.875556	UAMI455	Puebla	Las Sidras	Female
	17.956389	-97.875556	UAMI456	Puebla	Las Sidras	Female
	17.956389	-97.875556	UAMI457	Puebla	Las Sidras	Male
	17.956389	-97.875556	UAMI458	Puebla	Las Sidras	Male
	17.956389	-97.875556	UAMI459	Puebla	Las Sidras	Male
	17.956389	-97.875556	UAMI460	Puebla	Las Sidras	Male
101	17.8066667	-97.4841667	IPN4092	Oaxaca	Santa Magdalena Jicotlan	Female
102	18.1944444	-97.1583333	UAMI450	Puebla	Coxcatlán	Female
103	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40896	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Male
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40897	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Female
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40898	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Male
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40899	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Female
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40905	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Male
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40906	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Female
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40909	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Female
	18.1516667	-97.0936111	IBUNAM40911	Oaxaca	San Antonio Nanahuatipam	Female
104	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38086	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Female
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38087	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38088	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38089	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38090	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38091	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38092	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Female
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38093	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
	17.9872222	-96.9536111	IBUNAM38094	Oaxaca	Santa Maria Tecomavaca	Male
105	17.7986111	-96.9597222	IBUNAM3054	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Male
	17.8069444	-96.9633333	IBUNAM3055	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.8069444	-96.9633333	IBUNAM3056	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.8069444	-96.9633333	IBUNAM8012	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Male
	17.7986111	-96.9597222	IBUNAM21644	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.7986111	-96.9597222	IBUNAM21645	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Male

	17.715	-96.9880555	IBUNAM38065	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Male
	17.6377777	-96.9022222	IBUNAM38068	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.6377777	-96.9022222	IBUNAM38071	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.6377777	-96.9022222	IBUNAM38074	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
	17.6313888	-96.895	IBUNAM38076	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Male
	17.8241666	-96.9880555	IBUNAM39514	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlán	Female
106	17.0855556	-96.0291667	IBUNAM29879	Oaxaca	Santa Maria Tlahuitoltepec	Female
	17.0855556	-96.0291667	IBUNAM29880	Oaxaca	Santa Maria Tlahuitoltepec	Male
	17.0855556	-96.0291667	IBUNAM29881	Oaxaca	Santa Maria Tlahuitoltepec	Female
	17.1536111	-96.0219444	IBUNAM29902	Oaxaca	Santa Maria Tlahuitoltepec	Male
107	17.0016666	-96.1727777	IBUNAM28852	Oaxaca	San Pedro y San Pablo Ayutla	Female
	17.0016666	-96.1727777	IBUNAM28851	Oaxaca	San Pedro y San Pablo Ayutla	Male
	16.972222	-96.0458333	IBUNAM29882	Oaxaca	San Pedro y San Pablo Ayutla	Male
108	17.1180556	-96.6766667	IPN19105	Oaxaca	San Andres Huayapam	Female
109	16.9833333	-96.5283333	IPN41851	Oaxaca	San Jeronimo Tlacoahuaya	Male
	16.9833333	-96.5283333	IPN41852	Oaxaca	San Jeronimo Tlacoahuaya	Male
110	16.4529	-97.00235	CMC7246	Oaxaca	Guevea de Humboldt	Male
111	16.1999	-97.1339	BYU20652	Oaxaca	La Cumbre	Female
	16.1999333	-97.1339667	CMC303	Oaxaca	San Juan Lachao	Male
	16.1999333	-97.1339667	CMC305	Oaxaca	San Juan Lachao	Male
	16.1999333	-97.1339667	CMC307	Oaxaca	San Juan Lachao	Male
	16.1999333	-97.1339667	CMC344	Oaxaca	San Juan Lachao	Female
	16.1999333	-97.1339667	CMC345	Oaxaca	San Juan Lachao	Male
	16.1999333	-97.1339667	CMC348	Oaxaca	San Juan Lachao	Female
112	16.0180555	-96.5311111	IBUNAM26592	Oaxaca	San Mateo Río Hondo	Female
113	16.125	-95.6083333	IBUNAM21642	Oaxaca	San Pedro Huamelula	Male

Supplementary data 2. Probability values of the paired comparison between females and males of each species, ventral view of the skull (under the diagonal) and dorsal view of the skull (above the diagonal), based on the random permutation procedure of the residuals, with 999 permutations.

The probability values for comparisons between males and females of the same species are marked in bold.

species	<i>H. acutus</i> (♀)	<i>H. acutus</i> (♂)	<i>H. alleni</i> (♀)	<i>H. alleni</i> (♂)	<i>H. bulleri</i> (♀)	<i>H. bulleri</i> (♂)	<i>H. irroratus</i> (♀)	<i>H. irroratus</i> (♂)	<i>H. jaliscensis</i> (♀)	<i>H. jaliscensis</i> (♂)	<i>H. pretiosus</i> (♀)	<i>H. pretiosus</i> (♂)	<i>H. texensis</i> (♀)	<i>H. texensis</i> (♂)
<i>H. acutus</i> (♀)		0.220	0.001	0.001	0.008	0.054	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002
<i>H. acutus</i> (♂)	0.688		0.001	0.001	0.002	0.037	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.008
<i>H. alleni</i> (♀)	0.001	0.001		0.910	0.001	0.004	0.001	0.001	0.1	0.481	0.001	0.001	0.098	0.535
<i>H. alleni</i> (♂)	0.001	0.001	0.041		0.001	0.007	0.001	0.001	0.176	0.942	0.001	0.011	0.045	0.458
<i>H. bulleri</i> (♀)	0.044	0.075	0.001	0.004		0.112	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<i>H. bulleri</i> (♂)	0.01	0.058	0.001	0.005	0.495		0.027	0.018	0.007	0.008	0.008	0.011	0.005	0.002
<i>H. irroratus</i> (♀)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002		0.148	0.001	0.011	0.003	0.007	0.001	0.033
<i>H. irroratus</i> (♂)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.019	0.017	0.041		0.001	0.029	0.001	0.013	0.001	0.062
<i>H. jaliscensis</i> (♀)	0.001	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.328	0.009	0.023	0.046	0.231
<i>H. jaliscensis</i> (♂)	0.001	0.001	0.032	0.856	0.003	0.003	0.013	0.166	0.500		0.034	0.03	0.089	0.42
<i>H. pretiosus</i> (♀)	0.001	0.001	0.125	0.001	0.001	0.001	0.019	0.001	0.174	0.048		0.820	0.003	0.024
<i>H. pretiosus</i> (♂)	0.001	0.001	0.003	0.009	0.002	0.001	0.002	0.007	0.102	0.065	0.818		0.004	0.028
<i>H. texensis</i> (♀)	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.111	0.029		0.477
<i>H. texensis</i> (♂)	0.003	0.001	0.04	0.058	0.021	0.004	0.034	0.035	0.005	0.075	0.106	0.009	0.824	

Capítulo 4: Propuesta de descripción de especies reconocidas dentro de *Heteromys irroratus* group Gray 1868 sensu lato.

La taxonomía integradora es una propuesta que plantea la conveniencia de evaluar diversas fuentes de información para identificar y delimitar adecuadamente a las especies (Puillandre et al., 2012). En este sentido, en el presente trabajo de tesis se planteó la necesidad de analizar datos de marcadores moleculares tanto mitocondriales (Citocromo b) como nucleares [Exón 1 de la proteína fijadora de retinol interfotorreceptora (IRBP) e Intrón 7 del fibrinógeno beta (Fgb-I7)], datos morfológicos (morfometría geométrica) y datos ecológicos (modelado del nicho ecológico). Desafortunadamente, como consecuencia de la contingencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-Cov2 y las restricciones de movilidad que se establecieron, no fue posible generar toda información que originalmente se planteó. No obstante, los datos que si fueron obtenidos muestran resultados que sugieren que *H. irroratus* sensu lato es un complejo de al menos siete especies. En el presente capítulo se realiza la integración de los datos moleculares y morfométricos con la finalidad de hacer una propuesta de descripción de las especies reconocidas dentro de este complejo. Para ello, se tomaron en cuenta los resultados de los análisis filogenéticos obtenidos a partir del gen Citocromo b, identificación de especies candidatas de acuerdo a los métodos de delimitación de especies empleados (mPTP, bPTP, GMYC, bGMYC), valores de distancia genética Kimura-2-Parámetros entre especies propuestas, identificación de aminoácidos (caracteres diagnósticos) en las secuencias del gen Citocromo b, reconocimiento de caracteres morfológicos craneales obtenidos a partir de los análisis de morfometría geométrica y determinación de los rangos de distribución geográfica.

Los grupos propuestos como especies válidas dentro del grupo *H. irroratus* sensu lato son las siguientes: *H. alleni* (Coues, 1881), *H. jaliscensis* (Allen, 1906), *H. texensis* (Merriam, 1902), *H. pretiosus* (Goldman, 1911), *H. irroratus* (Gray, 1868), *H. acutus* (Hall and Villa-R, 1948) y *H. bulleri* (Thomas, 1893).

***Heteromys alleni* (Coues, 1881)**

1881 – *Heteromys alleni* Coues, en Allen, Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College: 187.

1911 – *Liomys irroratus alleni*, Goldman, North America Fauna: 56.

1902 – *Liomys canus* Merriam, Proceedings of the Biological Society of Washington: 44.

1947 – *Liomys irroratus pullus* Hooper, Journal of Mammalogy: 47.

1973 – *Liomys irroratus alleni*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 99.

1902 – *Liomys torridus* Merriam, Proceedings of the Biological Society of Washington: 45.

1911 – *Liomys irroratus torridus*, Goldman, North America Fauna: 55.

1902 – *Liomys torridus minor* Merriam, Proceedings of the Biological Society of Washington: 45.

1903 – *Heteromys exiguus* Elliot, Field Columbian Museum Zoological Series: 146.

1973 – *Liomys irroratus torridus*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 119.

2007 – *Heteromys irroratus alleni* y *Heteromys irroratus torridus*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys alleni*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo es un individuo adulto de sexo y medidas desconocidas, colectado en Hacienda Angostura, Río Verde, San Luis Potosí. Este ejemplar se encuentra resguardado en el “Museum of Comparative Zoology, Harvard University” (MCZ 5889).

Delimitación molecular – *H. alleni* incluiría las poblaciones de las subespecies *H. i. alleni* (haplogrupo 1a; ver capítulo 2b) y *H. i. torridus* (haplogrupos 2a y 2b; ver capítulo 2b). Esta especie claramente representa un grupo monofilético en las filogenias del gen Citocromo b empleando los métodos de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) con elevados valores de Bootstrap (VB) y probabilidad posterior (PP), 94 y 0.99 respectivamente. Además, *H. alleni* es reconocida como especie a partir del método de delimitación de especies mPTP, que es un método flexible y que proporciona delimitaciones realistas debido a que está basado en la longitud de las ramas (Kaplí et al., 2017). Los valores de distancia genética Kimura-2-parámetros (K2P) de *H. alleni* en relación con el resto de las especies candidatas propuestas oscilan entre 4.5% (*H. alleni* – *H. pretiosus*) y 10.2% (*H. alleni* – *H. bulleri*). Aunque no existe un valor umbral definitivo para diferenciar entre especies de mamíferos para el gen mitocondrial Citocromo b, Baker y Bradley (2006) propusieron que valores de distancia por encima del 5% podrían ser indicativos de especies diferentes. Asimismo, *H. alleni* se diferencia de otras especies del grupo *H. irroratus* sensu lato por presentar Leucina (L) en la posición 333/380 de la secuencia de aminoácidos del gen Citocromo b; en el resto de las especies del grupo invariablemente se observa Fenilalanina (F).

Delimitación morfológica – Esta especie presenta un gran tamaño en la vista dorsal del cráneo en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato. Sin embargo, no existen diferencias significativas en la forma promedio del cráneo para la vista dorsal entre *H. alleni* y *H. jaliscensis*. *H. alleni* puede ser distinguida porque presenta el margen posterior de los huesos nasales redondeado, y la longitud de los huesos premaxilares es mayor que la de los huesos nasales.

Distribución geográfica – *H. alleni* presenta una amplia distribución geográfica en el Altiplano Mexicano al norte del Eje Neovolcánico Transversal desde el sur de Chihuahua y hacia el sur llega a Puebla, Morelos, norte de Oaxaca, y norte de Guerrero. Al oeste la distribución llega hasta el noreste de Jalisco, norte de Michoacán, abarca los estados de Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, y al este de su distribución llega hasta San Luis Potosí, la Sierra Madre Oriental en Tamaulipas y Nuevo León, Figura 1.

***Heteromys jaliscensis* (Allen, 1906)**

1906 – *Heteromys jaliscensis*, J. A. Allen, Bulletin of the American Museum of Natural History: 251.

1911 – *Liomys irroratus jaliscensis*, Goldman, North America Fauna: 60.

2007 – *Heteromys irroratus jaliscensis*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys jaliscensis*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo de esta especie es un individuo macho adulto de Las Canoas, Jalisco que se encuentra preservado en el “American Museum of Natural History, Nueva York” (AMNH 26325).

Delimitación molecular – *H. jaliscensis* representa un grupo monofilético (haplogrupo 3; ver capítulo 2b) empleando ambos métodos filogenéticos MV e IB, con altos valores de VB y PP, 100 y 1, respectivamente. Adicionalmente, *H. jaliscensis* es reconocida como una especie válida por todos los métodos de delimitación de especies empleados en el presente trabajo; mPTP, bPTP, GMYC y bGMYC. Los valores de distancia genética K2P de *H. jaliscensis* con respecto al resto de las especies candidatas oscilaron entre 5.6% (*H. jaliscensis* – *H. texensis*) y 9.5% (*H. jaliscensis* – *H. bulleri*).

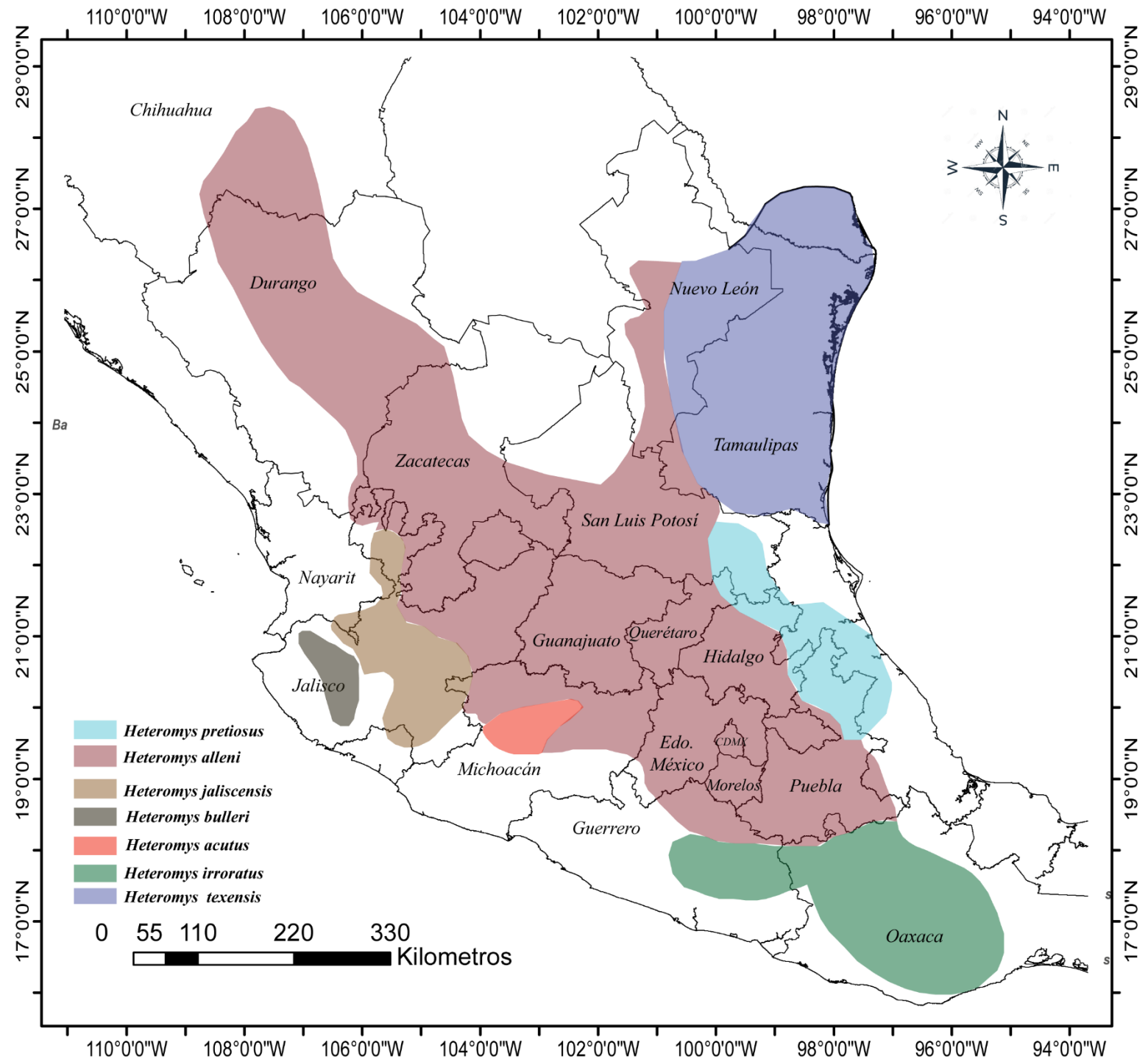


Figura 1. Distribución geográfica de las distintas especies reconocidas dentro del grupo *Heteromys irroratus* sensu lato.

Por otro lado, en *H. jaliscensis*, la posición 257/380 de la secuencia de aminoácidos del Citocromo b está representada por Metionina (M) mientras que en el resto de las especies candidatas del grupo *H. irroratus* sensu lato invariablemente se presenta Treonina (T).

Delimitación morfológica – *H. jaliscensis* no presenta diferencias significativas en la forma promedio del cráneo en la vista ventral en relación con *H. pretiosus*. Esta especie presenta un amplio ancho zigomático, lo cual permite distinguirla de *H. alleni*. *H. jaliscensis* presenta el margen posterior de los huesos nasales redondeado, y la longitud de los huesos premaxilares es mayor que la de los huesos nasales.

Distribución geográfica – Esta especie se encuentra en la parte sur, central y norte de Jalisco, hasta el extremo sur de Zacatecas y Nayarit, Figura 1.

***Heteromys texensis* (Merriam, 1902)**

1902 – *Liomys texensis* Merriam, Proceedings of the Biological Society of Washington: 44.

1911 – *Liomys irroratus texensis*, Goldman, North America Fauna: 59.

2007 – *Heteromys irroratus texensis*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys texensis*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El ejemplar tipo de esta especie es una hembra adulta de Brownsville Cameron Co., Texas. Este holotipo se encuentra en “United States National Museum”, USNM 58670.

Delimitación molecular – *H. texensis* se muestra como un grupo monofilético (haplogrupo 4a; ver capítulo 2b) en las filogenias generadas con MV e IB con altos valores de VB y PP; 100 y 1, respectivamente. Además, *H. texensis* es reconocida como especie putativa por todos los métodos de delimitación de especies empleados en este estudio; mPTP, bPTP, GMYC y bGMYC. Por otro lado, los valores de distancia genética K2P de *H. texensis* con respecto a las otras especies candidatas oscilaron entre 4.3% (*H. texensis* – *H. pretiosus*) y 10.5% (*H. texensis* – *H. bulleri*). Asimismo, en la posición 46/380 de la secuencia de aminoácidos del gen Citocromo b, *H. texensis* tiene Treonina (T), mientras que, en el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato, en esa misma posición se presenta Alanina (A).

Delimitación morfológica – Esta especie presenta el cráneo de menor tamaño para ambas vistas (dorsal y ventral) en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato. Además, *H. texensis* presenta la región del rostrum más corta en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato, exceptuando a *H. pretiosus*. Esta especie presenta un amplio ancho zigomático y mastoideo, amplios huesos interparietales, lo que da lugar a la forma oval de la región posterior del cráneo

característica de esta especie. El margen posterior de los huesos nasales es truncado, y longitud de los huesos premaxilares es mayor que la longitud de los huesos nasales.

Distribución Geográfica – *H. texensis* se encuentra en las planicies bajas desde el sur de Texas, en Estados Unidos, hasta la región sur de Tamaulipas y en la porción este de Nuevo León en México, Figura 1.

***Heteromys pretiosus* (Goldman, 1911)**

1911 – *Liomys irroratus pretiosus*, Goldman, North America Fauna: 58.

1973 – *Liomys irroratus texensis*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 116.

2007 – *Heteromys irroratus texensis*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys pretiosus*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo de esta especie es de Metlaltoyuca, Puebla, México y se encuentra resguardado en “United States National Museum”, USNM 93097.

Delimitación molecular – *H. pretiosus* representa grupo monofilético (haplogrupo 4b; ver capítulo 2b) en los árboles filogenéticos generados por MV e IB y con altos valores de soporte; VB y PP, 100 y 1, respectivamente. Además, *H. pretiosus* es reconocida como una especie válida por todos los métodos de delimitación de especies empleados en el presente trabajo, mPTP, bPTP, GMYC y bGMYC. Similarmente, los valores de distancia genética K2P de *H. pretiosus* con respecto al resto de las especies propuestas oscilaron entre 4.3% (*H. pretiosus* – *H. texensis*) y 10.4% (*H. pretiosus* – *H. bulleri*). Esta especie se diferencia de otras especies dentro de *H. irroratus* sensu lato por poseer tres aminoácidos distintos en las posiciones 188/380, 257/380 y 357/380 de la secuencia de aminoácidos del Citocromo b. *H. pretiosus* contiene Valina (V), Serina (S) e Isoleucina (I) en lugar de Isoleucina (I), Treonina (T) y Leucina (L), respectivamente, que se encuentran presentes en el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato.

Delimitación morfológica – Esta especie presenta la región del rostrum más corta en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato, al igual que *H. texensis*. *H. pretiosus* puede distinguirse por el margen posterior de los huesos nasales redondeado, y por presentar una longitud mayor de los huesos premaxilares que la longitud de los huesos nasales. Similarmente *H. pretiosus* presenta un amplio ancho zigomático.

Distribución Geográfica – *H. pretiosus* se encuentra en las montañas en el extremo este de San Luis Potosí, norte de Querétaro, norte de Hidalgo, noreste de Puebla y norte de Veracruz, en México, Figura 1.

***Heteromys irroratus* (Gray, 1868)**

1868 – *Heteromys irroratus* Gray, Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London: 205.

1911 – *Liomys irroratus*, Goldman, North America Fauna: 53.

1868 – *Heteromys albolimbatus*, Gray, Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London: 205.

1956 – *Liomys irroratus yautepecus*, Goodwin, American Museum Novitates: 7.

1973 – *Liomys irroratus irroratus*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 110.

1911 – *Liomys guerrerensis*, Goldman, North America Fauna: 62.

1973 – *Liomys irroratus guerrerensis*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 108.

2007 – *Heteromys irroratus irroratus* y *Heteromys irroratus guerrerensis*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys irroratus*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo de esta especie es un subadulto de sexo desconocido de Oaxaca, por lo que la localidad tipo es restringida a Oaxaca, Oaxaca. Este ejemplar se encuentra en “British Museum (Natural History)”, BMNH 59.7.10.2. Según Genoways (1973) la piel de este ejemplar se encuentra en malas condiciones con la cola rota y pegada a la piel mediante un alfiler. El arco zigomático derecho roto y el cráneo no presenta la porción posterior incluyendo los interparietales, la bula derecha, y elementos occipitales y basocraneales.

Delimitación molecular – *H. irroratus* se integra por las poblaciones que representan las subespecies *H. i. irroratus* (haplogrupo 5; ver capítulo 2b) y *H. i. guerrerensis* (haplogrupos 6; ver capítulo 2b). En las filogenias obtenidas con los métodos de MV e IB, *H. irroratus* invariablemente se muestra como grupo monofilético con elevados valores de VB y PP; 100 y 1, respectivamente. *H. irroratus* es sugerida como especie válida por el método de delimitación de especies mPTP. Adicionalmente, los valores de distancia genética K2P de *H. irroratus* con respecto al resto de las especies candidatas oscilaron entre 6.69% (*H. irroratus* – *H. pretiosus*) y 10.6% (*H. irroratus* – *H. bulleri*). Asimismo, en la posición 25/380 de la secuencia de aminoácidos del gen Citocromo b, *H. irroratus* presenta Valina (V) en lugar de Isoleucina que es el aminoácido que se encuentra presente en el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato.

Delimitación morfológica – Esta especie presenta un gran tamaño en la vista dorsal del cráneo en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato. Además, *H. irroratus* presenta

la forma del margen posterior de los huesos nasales redondeada, y la longitud de los huesos premaxilares mayor que la longitud de los huesos nasales.

Distribución Geográfica – *H. irroratus* habita en regiones montañosas en la zona este y centro de Oaxaca, y extiende su distribución hacia el sur y oeste en la Sierra Madre del Sur hasta el estado de Guerrero, Figura 1.

***Heteromys acutus* (Hall and Villa-R, 1948)**

1948 – *Liomys irroratus acutus*, Hall and Villa-R., University of Kansas Publications, Museum of Natural History: 253.

1973 – *Liomys irroratus alleni*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 99.

2007 – *Heteromys irroratus alleni*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys acutus*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo de esta especie es de Pátzcuaro, Michoacán, México y se encuentra en la Universidad de California, “Museum of Vertebrate Zoology”, MVZ 100171.

Delimitación molecular – *H. acutus* representa un grupo monofilético (haplogrupo 1b; ver capítulo 2b) en los árboles filogenéticos generados por MV e IB, el cual invariablemente estuvo bien soportado con valores altos de VB y PP; 100 y 1, respectivamente. Similarmente, todos los métodos de delimitación de especies empleados, mPTP, bPTP, GMYC y bGMYC reconocen a *H. acutus* como especie válida. Asimismo, los valores de distancia genética K2P de *H. acutus* con respecto al resto de especies candidatas oscilaron entre 7.9% (*H. acutus* – *H. pretiosus*) y 11.2% (*H. acutus* – *H. bulleri*). Sin embargo, en la secuencia de aminoácidos del gen Citocromo no se encontró ninguna posición que fuera distinta con respecto al resto de las especies candidatas del grupo *H. irroratus* sensu lato.

Delimitación morfológica – Esta especie presenta un gran tamaño del cráneo comparable con *H. alleni*. *H. acutus* presenta huesos interparietales estrechos. Además, el margen posterior de los huesos nasales emarginado, y los huesos premaxilares y los huesos nasales son de la misma longitud.

Distribución Geográfica – *H. acutus* es una especie cuya distribución se restringe a la región central de Michoacán, en los alrededores de Pátzcuaro, Figura 1.

***Heteromys bulleri* (Thomas, 1893)**

1893 – *Heteromys bulleri*, Thomas, The Annals and Magazine of Natural History: 330.

1911 – *Liomys bulleri*, Goldman, North America Fauna: 61.

1973 – *Liomys irroratus bulleri*, Genoways, Special Publications The Museum Texas Tech University: 106.

2007 – *Heteromys irroratus bulleri*, Hafner et al., Journal of Mammalogy.

Presente estudio – *Heteromys bulleri*, Gutiérrez-Costa et al.

Ejemplar y localidad tipo – El holotipo de esta especie es una hembra adulta de La Laguna, Sierra de Juanacatlán, Jalisco y resguardado en el “British Museum (Natural History)”, BMNH 93.3.6.39.

Delimitación molecular – *H. bulleri* representa un grupo monofilético (haplogrupo 7; ver capítulo 2b) de acuerdo con las filogenias generados por métodos de MV e IB, con elevados valores de VB y PP; 100 y 1, respectivamente. Además, *H. bulleri* es sugerida como especie válida por todos los métodos de delimitación de especies empleados en el presente trabajo; mPTP, bPTP, GMYC y bGMYC. Similarmente, esta especie parece representar el linaje más divergente entre las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato ya que, invariablemente, presenta valores de distancia genética elevados con respecto a todas ellas. Estos valores oscilan entre 9.5% (*H. bulleri* – *H. jaliscensis*) y 11.2% (*H. bulleri* – *H. acutus*). Por otro lado, *H. bulleri* se distingue de las otras especies del grupo *H. irroratus* sensu lato por presentar dos aminoácidos distintos en las posiciones 92/380 y 242/380. Estos corresponden a Isoleucina (I) y Leucina (L), respectivamente, mientras que en las demás especies del grupo *H. irroratus* sensu lato, invariablemente se observa Valina (V) y Fenilalanina (F), respectivamente.

Delimitación morfológica – Esta especie se distingue porque el ancho mastoideo es relativamente estrecho, con huesos interparietales más reducidos, en relación con el resto de las especies del grupo *H. irroratus* sensu lato. Además, la forma del margen posterior de los huesos nasales es emarginada y presentan la misma longitud los huesos nasales y los huesos premaxilares.

Distribución Geográfica – *H. bulleri* presenta una distribución geográfica restringida a tres localidades en el estado de Jalisco: La Laguna, Sierra de Juanacatlán (localidad tipo), Soyatlán del Oro y Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Figura 1.

Literatura citada

- Allen JA. 1881. List of mammals collected by Dr. Edward Palmer in north-eastern México, with field-notes by the collector. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*. 8: 183-189.
- Allen JA. 1906. Mammals from the states of Sinaloa and Jalisco, México, collected by J. H. Batty during 1904 and 1905. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 14: 587-612.
- Baker RJ. Bradley RD. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*. 87: 643-662.
- Elliot DG. 1903. Descriptions of apparently new species of mammals of the genera *Heteromys* and *Ursus* from Washington and México. *Field Columbian Museum Zoological Series*. 3: 233-237.
- Genoways HH. 1973. Systematics and Evolutionary Relationships of Spiny Pocket Mice. Genus *Liomys*. Special Publications The Museum Texas Tech University. 368 pp.
- Goldman EA. 1911. Revision of the spiny pocket mice (genera *Heteromys* and *Liomys*). *North America Fauna*. 34: 1-70.
- Goodwin GG. 1956. A preliminary report on the mammals collected by Thomas MacDougall in southeastern Oaxaca, Mexico. *American Museum Novitates*. 1757: 1-15.
- Gray JE. 1868. Synopsis of the species of Saccomyinae, or pouched mice, in the collection of the British Museum. *Proceedings of the Scientific Meetings of the Zoological Society of London*. 1868: 199-206.
- Hafner JC. Light JE. Hafner DJ. Hafner MS. Reddington E. Rogers DS. Riddle BR. 2007. Basal clades and molecular systematics of Heteromyd rodents. *Journal of Mammalogy*. 88:1129-1145.
- Hall ER. Villa R B. 1948. A new pocket gopher (*Thomomys*) and a new spiny pocket mouse (*Liomys*) from Michoacán, México. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*. 1: 249–256.
- Hooper ET. 1947. Notes on Mexican mammals. *Journal of Mammalogy*. 28: 40-57.
- Kapli P. Lutteropp S. Zhang J. Kobert K. Pavlidis P. Stamatakis A. Flouri T. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 33: 1630–1638.
- Merriam CH. 1902. Twenty new pocket mice (*Heteromys* and *Liomys*) from México. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 15: 41–50.
- Puillandre N. Modica M. Zhang Y. Sirovich L. Boisselier MC. 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*. 21: 2671-2691.
- Thomas O. 1893. Description of two new “pocket-mice” of the genus *Heteromys*. *The Annals and Magazine of Natural History*. 11: 329-332.

Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)

Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)

Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)

Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)

Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)

Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. FRANCISCO XAVIER GONZÁLEZ CÓZATL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FRANCISCO XAVIER GONZALEZ COZATL | Fecha:2021-12-07 21:01:26 | Firmante

nkAvd+IO/ky84f8RLhWPG5oWn5p1Xb9nf6b9oIFwnHTGVbUk9algwyjC3SI7K9D7FZQolhO8ht5mGP83rgH7EkF4DtHqUdupP1HF96CWpLoLjCTUtyvGd48740kKJ3nOLdrnk5u2FQ1sV+99zsOXEO/W1zAmKwLM2x3uqT8jf047y9oRQ1wAVbZhd+yX1JPrQxsnRBemBvCCY88n5q0QBzpnNgQw3Z0o1wMwMGHqB1cJs/x42QN+c4Z9ZATbesFPWfRRw9zbGAR77EpAg3bkuGajFiwXt3XtxY66tD8ksTnJaCwpQA8BVD2R8ueWWWhpurNy6abzDZvmlJNRH9IGfRQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[0SNAadmzg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vPZuoNLKNMZOA7GzoqxAW9HWmE7715VB>



Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)
Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)
Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)
Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)
Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)
Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)
Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. ELIZABETH ARELLANO ARENAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ELIZABETH ARELLANO ARENAS | Fecha:2021-12-03 18:28:04 | Firmante

Xq8nzqFNjkrzpAQBlcniZMTNsYPMFiC9mTfwjdgHMkBlIiHer3rBnkp2sO+9VWVBlDBoeiEtuXmU+icirDEPTmyF07x+ih8MLDarpZGiQ1WTQkgObzjOVcCq0E1jvRookq43A70Avvs
G+ugCZLXddd5icY7Gqs8m5q1eXihXf6a2/kUvw1Ej3hPn7OczT0zJQE71UGmHc97PejMLW9ivpWvR9O/NwJYToUJv1ntDfi2CiPpDAYfQOKMts69GjQBtkr3wv3SRn/NvfmLm97UZiN
xHbF+B3PIHgiVWxdHAP7gd45xYsRREsaK6457CC96PigG3VN37zTMMhL+GsTMA1GifQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Rxp5UICYQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DOfi0ggqYSbAWIm2JfohLxWy6rtxL5GQ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)

Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)

Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)

Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)

Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)

Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. SANDRA MILENA OSPINA GARCÉS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SANDRA MILENA OSPINA GARCÉS | Fecha:2021-12-09 09:18:15 | Firmante

KtjoDRaYoCBnmXZEPV5UW9UlyDA5G4s82JBv6GRqSZs+ZaisdQ2bU2nmPpYiTnN/Kv7H+hiajWS0uXnIFECrTU/s8l3B2iAhLBI2Yk3RX7VHrF2lg6fUzJq5qhYmgLK8eTZgZAYjxcWhnFkXPbcQ/l4ZtK1t9Ev9qCpYmnhuLN3XBimiof1GJwEhchMwMJhWXNj/A0k9yJdOcbJyakowLdfrRCYdlhe7X2b+VBjBsnIKgHCmcEAB1q4wJGie1oROL21qFK2RAfc7NRzGPvqxsTMyuUzg3pPfoKVB7idE4LNqzWnOzfvI/hROD0jKzswanLHmfQ+p9be2ThnyGGg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[hZ8zeF9MB](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wbDPiZ3nlkJrKm7lJwVq5X72ccqAZuk2>





Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)
Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)
Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)
Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)
Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)
Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)
Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRÍQUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ | Fecha:2021-12-09 10:11:48 | Firmante

iwIU0B6LINff1s3LspYHijAvATypQHGjoHQpVR12wN6Gj0a/P7TsdEMrLaZE4KzSh5+3xASg456ke791KchB3JTcKDR7fggKtczhGMlajRpPnjulUtQCQldlpxZtQxeXn4cWd1E+1Lo+ONpFWQunG+h92hoe9S2ScZC8YTVRSnOa5QgjP7C48JQd93HVrq1tMI4ZFP1u90z+SD1DaUvIVf6f3bWRro2wp1MNzaEmBrEtqO5OorL+t1jhxCx259K5zdGCa9NzIf7oGDgFY/Ja bXivinCS1b3Rkc1iYP88DSZI12YKJQC EWJ77I1b2kSICO5Y1QKzXh9nOvnnki+3MA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QK1g5ErBC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GJZCqnk14wfBGqOGduhzOBzi9CSm8X4h>



Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)
Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)
Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)
Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)
Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)
Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)
Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. ELIZABETH NAVA GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ELIZABETH NAVA GARCIA | Fecha:2021-11-29 11:58:23 | Firmante

k0tBEy3TrmlV9jYd9W047klQrVollhpOnQekXrl3nQGdxlwsYZMlv7uvVynKOSl4nUtlYh84mrjzHIR2vSqs6mhDWR/8Oc1v+p7ILA2hIvsSrlCG7KC3TYUmhoJCUMyaraqQI9qVdX7EqaXv/RxnXGRlikO6JF5PDbPT9ea8TepbPXl8q/JXCYQKDzcC+eC56No5ylvpCpKAXAaaz/HAW5gw0F3LBm7WRoc05eXkU7r8sXwl4xQXFmzl+gwiLViutTxbvUVTKlOQfSmLmaqJZBM1M6lJ4N2QLfAoCf+jGxL5FcXkoC/BTUJL+YpUv9c5OQejzxbDtmd3bShWx9N8w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gV8U0DMZH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/oBzaiZSFN5zoTSMbgP3ymziav9naUqvo>



Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)
Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)
Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)
Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)
Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)
Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)
Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DR. LÁZARO GUEVARA LÓPEZ



Cuernavaca, Morelos, a 07 de octubre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Francisco Xavier González Cózatl (director de tesis, CIByC UAEM)

Dra. Elizabeth Arellano Arenas (CIByC UAEM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC UNAM)

Dr. Duke Sanford Rogers (Brigham Young U. USA)

Dr. José Antonio Guerrero Enríquez (FCB UAEM)

Dra. Elizabeth Nava García (FCB UAEM)

Dr. Lázaro Guevara López (IB UNAM)

Tesis: Delimitación de especies del complejo *Heteromys irroratus* Gray 1868 (Rodentia: Heteromyidae): un enfoque taxonómico integrativo empleando múltiples líneas de evidencia.

Alumno que lo presenta a revisión: MARÍA AGUSTINA GUTIÉRREZ COSTA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. DUKE SANFORD ROGERS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DUKE SANFORD ROGERS - | Fecha:2021-12-09 15:40:01 | Firmante

aqNFt+yYiZ2DW5SdcoEGDfGBIhEFWSh3Z3DB6jTDpK7K8zsWmD4LqNTDMQ1tCKyH2nC69GHBmlkPHFq/+xZU9DhCBjTfNq/phSSWSKQOn0quDfm0DNC9J3nMwAmGB9+cVSN3VrlhDJ5CaX6/i52Dq5STAbj8e6187gQ3XRhS3gNioi+ktuKHX3ilwhUjak822448s0jQSTFdV6EZZGstETWdUub1a5bwQuYtO16YrIxo5c4dwtwZpDBZPrqFqxJHF90Ro8kofiJfjOIV47pwc/nn5Vsnf0SS2xK0/JN9OxXAW2pFvlb5yhqf4liRIQp9AYmRC1LUQrS6HvSkd+ImqA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[o98KW27tR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SPQHpdffuHvLPLtKkc4w9XypQkzAHoW>

