



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Master

Máster en Geología: Técnicas y Aplicaciones

Aproximaciones al estudio de Arvicolinae
(Rodentia, Mammalia) del Cuaternario de la
Península Ibérica

Autora:

M^a Pilar Alfaro Ibáñez

Directores:

Gloria Cuenca Bescós

Pere Bover Arbós

Facultad de Ciencias | Departamento de Ciencias de la Tierra

Curso 2020-2021

Índice

1.	Resumen	1
2.	Abstract.....	2
3.	Introducción.....	3
4.	Antecedentes.....	3
5.	Planteamiento y objetivos.....	6
6.	Descripción de los yacimientos estudiados	7
6.1	Sierra de Atapuerca	8
6.1.1	Galería de las Estatuas	9
6.1.2	Gran Dolina	11
6.2	Cueva del Mirón	13
7.	Metodología.....	15
7.1	Búsqueda bibliográfica	15
7.2	Trabajo de gabinete.....	16
7.2.1	Estudio en microscopio	16
7.2.2	Seguimiento fotográfico	18
7.2.3	Análisis estadísticos y cladísticos.....	18
7.2.4	Estudio morfométrico	20
7.3	Trabajo de laboratorio.....	21
7.3.1	Pretratamiento.....	22
7.3.2	Extracción ADN	24
7.3.3	PCR.....	25
7.3.4	Librerías.....	25
8.	Sistemática.....	27
9.	Resultados.....	37
9.1	ADN antiguo.....	37
9.2	Caracteres morfológicos	39
9.2.1	PAST	39
9.2.2	TNT	40
9.2	Estudio morfométrico	41
9.2.1	Morfometría geométrica	41
10.	Interpretación y discusión.....	44
11.	Conclusiones.....	46
13.	Agradecimientos.....	48

12. Bibliografía..... 48

ANEXO I

1. Resumen

Siguiendo la línea de trabajo del TFG este Trabajo Fin de Master aborda la utilidad de diferentes metodologías y técnicas para el estudio de *Microtus s.l.*. Entre las metodologías a utilizar se incluye una primera aproximación al estudio por morfometría geométrica y clásica, un estudio cladístico y fenotípico, y una primera prueba de extracción del material genético de las muestras fósiles.

Para la extracción del ADN fósil se ha recurrido a muestras de los yacimientos de Galería de Las Estatuas en la Sierra de Atapuerca (Burgos), y de La Cueva del Mirón (Cantabria). En este caso, aunque las secuenciaciones del material genético no se han podido terminar debido a la escasez mundial del material necesario por la situación de pandemia, si se ha observado la aplicabilidad de las técnicas de extracción de genoma fósil a restos de micromamíferos.

El estudio cladístico y fenotípico se ha realizado mediante un estudio más completo de los caracteres morfológicos del primer molar inferior (m1) con lo referente al anterior TFG, añadiendo especies más antiguas, pertenecientes al Pleistoceno inferior y medio, correspondientes del yacimiento de Gran Dolina de la Sierra de Atapuerca (Burgos). Se puede apreciar como los nodos internos de *Microtus s.l.* no se encuentran soportados, siendo únicamente las especies de *Iberomys* las que presentan un mayor soporte. Además, se puede observar como la mayoría de clados presentes en la filogenia se equiparan con los clusters obtenidos en el análisis fenotípico.

Por último, para los estudios de morfometría se ha utilizado el complejo anterocónido de las especies de *Terricola* actuales. Mediante la morfometría geométrica, aunque no se aprecian marcadas diferencias entre los individuos estudiados, si se observa una separación entre las especies identificadas como *T. pyrenaicus* y *T. duodecimcostatus*. En el análisis por morfometría clásica se puede apreciar que las muestras provenientes de los diferentes yacimientos se separan claramente, y realizando un análisis discriminante, la separación de estas dos especies se reafirma.

2. Abstract

Following the line of work of the TFG, this Master's Thesis addresses the use of different methodologies and techniques for the study of *Microtus* s.l., and a first test of genetic material extraction from fossil samples.

For the extraction of fossil DNA, I have used samples from the Galería de Las Estatuas deposits in the Sierra de Atapuerca (Burgos), and from La Cueva del Mirón (Cantabria). In this case, although the sequences of the genetic material could not be completed due to a worldwide shortage of the necessary material due to the pandemic situation, the applicability of fossil genome extraction techniques to small mammal fossils has been observed.

The cladistic and phenotypic studies have been carried out by a more complete study of the morphological characters of the first lower molar (m1) with regard to the previous TFG, adding older species, belonging to the lower and middle Pleistocene, corresponding to the Gran Dolina of the Sierra de Atapuerca (Burgos). It can be seen how the internal nodes of *Microtus* s.l. are not supported, and only the *Iberomys* species present a greater support although it is not supported. Furthermore, it is observed how the majority of clades present in the phylogeny will be matched with the clusters obtained in the phenotypic analysis.

Finally, morphometry studies have been carried out using the anteroconid complex of current *Terricola* species. Through geometric morphometry, although there are no marked differences between the individuals studied, is observed a separation between the species identified as *T. pyrenaicus* and *T. duodecimcostatus*. In the classical morphometric analysis it can be seen that the samples from the different deposits are clearly separated, and by performing a Discriminant Analysis, the separation of these two species is reaffirmed.

3. Introducción

Los denominados topillos modernos, los cuales incluyen los géneros, o subgéneros, europeos presentes en este trabajo *Microtus*, *Terricola* e *Iberomys*, de la subfamilia Arvicolinae (Rodentia, Mammalia), son uno de los grupos zoológicos mayormente utilizados en los medios continentales para las dataciones del Cuaternario, así como para estudios paleogeográficos, paleoambientales y paleoclimáticos debido a su alta distribución y presencia en el registro fósil (e.g., Chaline, et al., 1999; Cuenca-Bescós et al., 2010, 2016 y Fagoaga, 2020).

En los arvicolinos, al igual que en la gran mayoría de pequeños mamíferos, los estudios se realizan sobre todo mediante las partes dentales, ya que constituyen los elementos que presentan una mejor conservación (Rofes, 2014). En concreto, el primer molar inferior (m1) es el elemento que presenta una mayor abundancia en el registro, razón por la cual se han realizado una mayor cantidad de estudios sobre la morfología de este elemento anatómico, incluyendo el estudio mediante los parámetros e índices lineales definidos inicialmente por van der Meulen (1973). Además, los arvicolinos presentan una elevada variabilidad morfológica del m1, con caracteres identificativos, que permite realizar una mejor diferenciación entre las distintas especies de topillos (Maul y Markova, 2007).

4. Antecedentes

Los conocidos como topillos modernos, correspondientes a los *Microtus s.l.*, se corresponden con la segunda radiación Palaearctica, marcándose el inicio de esta por la presencia del subgénero *Allophaiomys*, hace unos 1.8 Ma (Chaline et al., 1999). Este subgénero de arvicolinos es el primero que presenta dentición arrizodonta (Chaline, 1972). Estos micromamíferos presentan una elevada tasa evolutiva desde el momento de su aparición, lo que lleva a las distintas formas y especies presentes en la actualidad, distribuidas a lo largo de todo el hemisferio norte, con gran adaptabilidad a diferentes tipos de hábitats (Chaline, et al., 1999 y van der Meulen, 1973).

Según lo indicado por Chaline (1972), a partir de un proceso de cladogénesis o especiación rápida que afectó a la especie *Allophaiomys pliocaenicus pliocaenicus*, al inicio del Pleistoceno medio, se originan los ancestros que dan lugar a las especies actuales y cuaternarias. En concreto, en su trabajo se observa que las especies correspondientes a las formas gregaloides (*Iberomys* y *Terricola*) y arvaloides, provienen de *A. pliocaenicus nutiensis*, con el cual *Iberomys huescarensis*, primer representante del género *Iberomys*, presenta una morfología similar (Cuenca-Bescós et al., 2001), y *A. pliocaenicus pitymoides* respectivamente. Por el contrario, el resto de *Microtus* cuaternarios, que en la clasificación de Chaline (1972) constituyen *M. ratticepoides*, *M. malei* y *Ch. nivalis*, provienen de *M. malei burgondiae* (Figura 1).

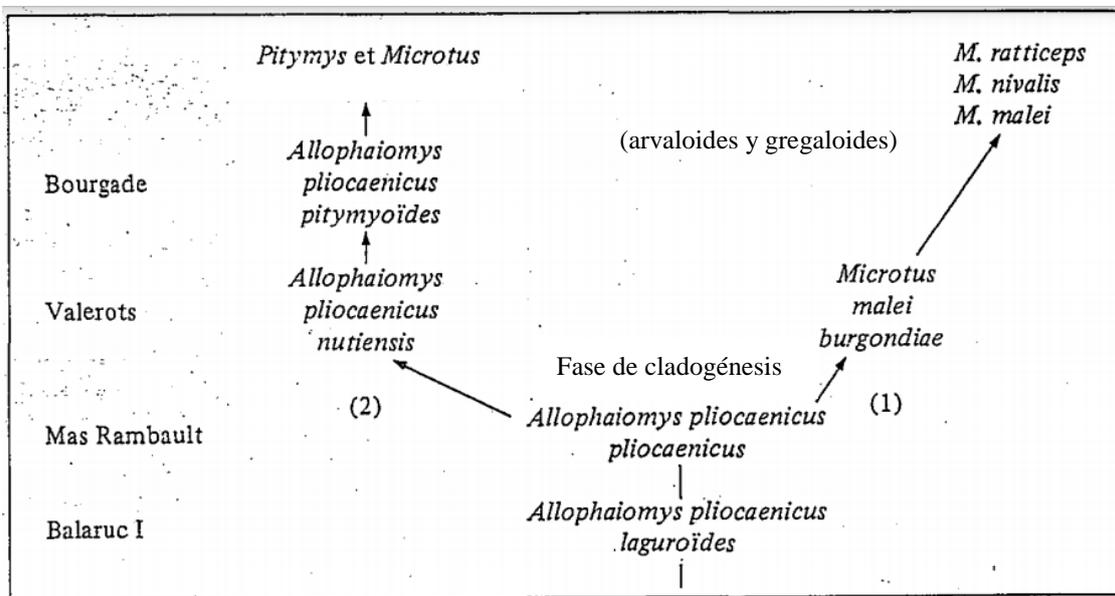


Figura 1. Imagen modificada de Chaline (1972), donde se muestra el esquema evolutivo de *Allophaiomys pliocaenicus*. 1) Formas raticepoides-nivaloides; 2) Otros linajes de *Microtus*.

Es importante mencionar la existencia de importantes discrepancias en la sistemática y cladística de estos micromamíferos. Autores como Cuenca-Bescós et al. (2014), Abramson y Lisovsky (2012) o Brunet-Lecomte (2010), entre otros, discrepan de la clasificación actual de los arvicolinos. Estas discrepancias derivan de la elevada tasa evolutiva que presentan estos roedores.

Una de las cuestiones que generan discrepancias es la posición de las especies de *Iberomys*. Ya en 1972, Chaline clasificó a estas especies en el subgénero *Iberomys*, el cual ha sido propuesto por Cuenca-Bescós et al (2014), para su elevación a la categoría taxonómica de género, pero diversos trabajos declaran que sería necesario un mayor soporte por parte de estudios genéticos para poder modificar la clasificación actual (e.g., Barbosa et al., 2018).

Las especies de *Terricola* también han pasado por diversos cambios en su sistemática. Anteriormente se incluían dentro del subgénero *Pitymys*, y presentan discusiones sobre las diferentes especies o subespecies existentes (e.g., Gerbe y de'Isle, 1880; Brunete-Lecomte, 2010). Además, estas especies se encuentran presentes en unas condiciones climáticas distintas que las correspondientes a otras especies de *Microtus*.

La clasificación de la especie *Microtus gregalis* también se ha visto discutida en los últimos años. Tradicionalmente esta especie se localiza en el subgénero *Stenocranius* pero estudios realizados en base a datos genéticos y moleculares de individuos actuales de esta especie proponen que en realidad *M. gregalis* debe situarse en el género *Lasiopodomys* (Abramson y Lissovsky, 2012 y literatura allí mencionada).

Cabe mencionar al género *Chionomys*, el cual inicialmente se definió como un subgénero dentro del género *Microtus* por Miller (1908). Fue elevado al nivel taxonómico de género debido a los estudios moleculares y bioquímicos realizados en representantes actuales (e.g., Graf y Scholl 1975; Graf, 1982). En estos estudios se comprobó que la distancia molecular que separaba al linaje de *Chionomys* del de *Microtus* es incluso mayor que la existente entre *Microtus* y *Arvicola*, localizando la diferenciación de las especies de *Chionomys* hace unos 2.4 Ma (Chaline y Graf, 1988).

Por lo tanto, aunque ampliamente se ha estudiado la filogenia de estos roedores en la literatura científica, tanto desde un punto de vista morfológico como genético, la filogenia sistemática de *Microtus s.l.* sigue siendo de gran complejidad. Además, hasta recientemente no se ha analizado el genoma fósil de este género de micromamíferos (Baca et al., 2020), pero estudios realizados por análisis combinados de morfología y genética en otros grupos biológicos han permitido evaluar relaciones filogenéticas complejas (e.g., Bibi et al., 2012; Bover et al., 2018), demostrando la utilidad de esta técnica para resolver problemáticas como la presente en el género *Microtus s.l.*

5. Planteamiento y objetivos

El objetivo de este trabajo es apreciar el funcionamiento y utilidad de diferentes técnicas a la hora de estudiar la filogenia de pequeños mamíferos, concretamente de los representantes cuaternarios presentes en la Península Ibérica de la subfamilia Arvicolinae.

Con dicho objetivo se han estudiado un total de 14 especies (*Microtus arvalis*, *M. agrestis*, *M. jansonii*, *M. oeconomus*, *M. gregalis*, *M. sesseae*-*T. arvalidens*, *Iberomys cabreranae*, *I. mediterraneus*, *I. huercarensis*, *Terricola lusitanicus*, *T. duodecimcostatus*, *T. pyrenaicus-gerbei*, *T. atapuerquensis* y *Stenocranius gregaloides*) que se agruparán dentro de *Microtus sensu lato* (*Microtus s.l.*), que incluye a los subgéneros *Iberomys*, *Terricola* y *Stenocranius*. Además, se ha agregado *Chionomys nivalis*, y por último se ha incluido al análisis la especie *Clethrionomys glareolus*, que se usará como outgroup en los estudios cladísticos por presentar algunas de las características más primitivas dentro de los topillos modernos. Por razones descriptivas, se van a tratar a los diferentes subgéneros como géneros.

Se va a analizar la morfología del primer molar inferior (m1), así como se va a extraer el material genético conservado en las muestras fósiles estudiadas, correspondientes a los yacimientos de la Sierra de Atapuerca (Burgos), la Cueva del Mirón (Cantabria). Siendo así, se va a analizar el material genético de las mismas muestras fósiles en las cuales se han observado los caracteres morfológicos.

El objetivo de este trabajo es avanzar en la metodología utilizada para la realización del Trabajo Fin de Grado durante el año pasado (Alfaro-Ibáñez, 2020), añadiendo una mayor cantidad de datos, así como información más concreta, mediante el uso de diferentes metodologías.

En este caso se va a realizar la extracción del material genético conservado en las muestras fósiles/subfósiles de las especies estudiadas, en vez de usar ADN actual disponible en las bases de datos de genética. En este TFM por tanto se va a aplicar la metodología necesaria para la correcta extracción del material genético conservado en los restos de *Microtus s.l.*+*Ch.nivalis* estudiados. También se va a realizar un estudio

más detallado de la morfología del m1 de estos arvicolinos, para ello, van a estudiarse una mayor cantidad de especies, observando también los caracteres presentes en taxones cuya distribución temporal se remonta hasta el Pleistoceno inferior.

A parte de observar la presencia, ausencia, y estado de desarrollo de los caracteres presentes en el m1, se van a realizar también una primera aproximación mediante estudios de morfometría tanto geométrica, mediante el uso de landmarks, como clásica, utilizando en este último caso los parámetros e índices descritos por van der Meulen (1973). Para valorar la utilidad de esta técnica en la diferenciación de las distintas especies de arvicolinos, con el objetivo de utilizarla en futuros trabajos, se ha optado por estudiar a detalle las especies actuales de *Terricola*, las cuales presentan una elevada similitud entre ellas, centrándome en el complejo anterocónido.

Con esto el objetivo es abordar diferentes metodologías para el estudio de *Microtus s.l.*, y observar si pueden aportar nueva información sobre su clasificación y sistemática.

6. Descripción de los yacimientos estudiados

Se han estudiado muestras fósiles de los yacimientos de la Cueva del Mirón (Cantabria) y de los yacimientos de Galería de las Estatuas y Gran Dolina de la Sierra de Atapuerca (Burgos). Todos ellos se localizan al norte de la Península Ibérica, en el interior de sistemas kársticos formados en calizas del Cretácico, dentro de montes con origen Alpino (Figura 2).

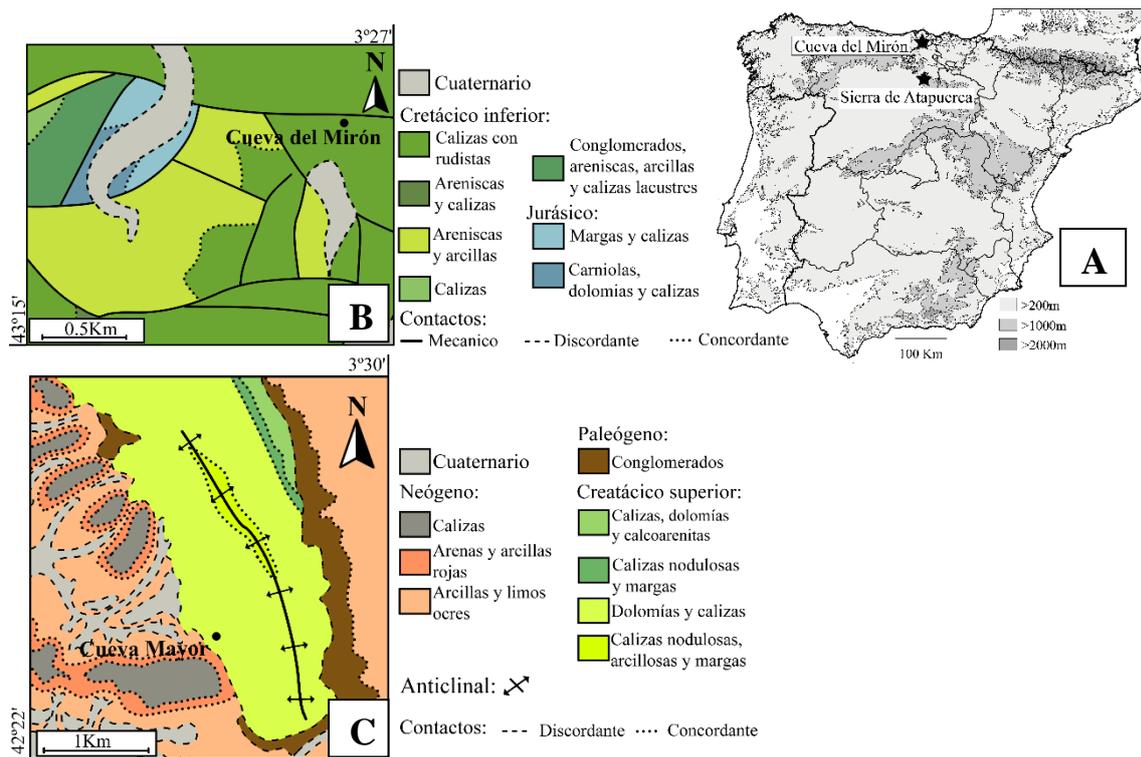


Figura 2. Mapa de situación geográfica (A) y geológica (B): Cueva del Mirón, a partir de la hoja del MAGNA 60 (Portero et al., 1978), C: Sierra de Atapuerca, a partir de las hojas del MAGNA 200 (Pineda y Arce, 1990) y 201 (Olivé, Ramírez y Ortega, 1987)) de los yacimientos estudiados en este trabajo.

6.1 Sierra de Atapuerca

La Sierra de Atapuerca se encuentra localizada a unos 15 km de la localidad de Burgos, en la comunidad de Castilla y León. Esta sierra forma parte del extremo más noroeste del Sistema Ibérico, encontrándose delimitada por el Río Arlanzón al sur y la Cordillera Cantábrica al norte. Además, se encuentra localizada en el denominado Corredor de Bureba, zona de paso entre las cuencas del Duero y del Ebro (Cuenca-Bescós, et al., 2010, Ortega et al, 2011).

Los yacimientos estudiados en este trabajo se localizan en el interior del sistema kárstico localizado en esta sierra, constituido por un total de tres niveles, siendo por tanto un sistema kárstico multinivel (Ortega et al., 2011).

La Sierra de Atapuerca se trata de una estructura anticlinal que se encuentra conformada por unos 40-70 metros de potencia de materiales calcáreos (calizas y

dolomías) pertenecientes a depósitos marinos transgresivos de la parte basal del Cretácico superior, concretamente del Turoniense medio-superior (Ortega et al., 2011, 2014). También se observan materiales sintectónicos de la Orogenia Alpina del Oligoceno-Mioceno inferior, pertenecientes a depósitos de la cuenca del Duero, plegados siguiendo el contorno de la estructura anticlinal (Ortega, 2009) (Figura 1).

Dentro de este sistema de calizas es donde se forma el endokarst, controlado por la incisión del río Arlazón, siendo actualmente un sistema colgado con formas heredadas inactivas (Ortega, 2009; Ortega et al., 2014), en el cual se encuentran los yacimientos estudiados en este trabajo (Galería de las Estatuas y Gran Dolina). Las subidas y bajadas del nivel del Arlazón ocasionaron la excavación de sucesivos sistemas vadosos, dando lugar a los diferentes karsts presentes en la actualidad. Esta actividad kárstica no solo se observa en la zona interna de este monte mesozoico, también se puede apreciar en las superficies de erosión conservadas en materiales carbonatados, diferenciadas tres en la Sierra de Atapuerca. En estas superficies se aprecia la presencia de geomorfologías kársticas como lapiaces o dolinas. Cabe también destacar la presencia de una superficie poligénica, afectada por procesos de karstificación, denominada Paramo inferior, sobre depósitos de calizas (Ortega, 2009).

El sistema kárstico se encuentra relleno de materiales detríticos, cuyo origen está relacionado con el material arrastrado desde el inicio del sistema por el mismo medio fluvial que dio lugar a su formación (Ortega et al., 2011, 2014), así como por depósitos autóctonos (bloques caídos, espeleotemas) y restos de origen orgánico. Es en estos depósitos orgánicos (ej: egagrópilas) donde se observa una gran cantidad de restos de microvertebrados (Cuenca- Bescós et al., 2010).

6.1.1 Galería de las Estatuas

Se encuentra localizada en el nivel superior del sistema kárstico, y se ha interpretado como una antigua entrada al sistema (Ortega, 2009). En este yacimiento se han realizado dos catas, GE-I y GE-II, de 9 y 6 m² de extensión respectivamente. La segunda cata se encuentra más cercana de la antigua entrada de la cueva, lo que ocasiona que los restos observados en ambas catas presenten diferentes estados de conservación, así como diferente abundancia fosilífera (Arsuaga et al., 2017).

En el relleno sedimentario de este yacimiento se han llegado a diferenciar cinco niveles distintos por Arsuaga et al. (2017). El registro sedimentario empieza con una capa de fragmentos de estalactitas que se localiza sobre un *flowstone*, cuya datación se corresponde con la edad del cron Matuyama, habiendo un hiato desde este depósito hasta el inicio de la secuencia sedimentaria del yacimiento, datada en 1.22 Ma, coincidiendo esta edad con la de formación del nivel intermedio del endokarst de la Sierra de Atapuerca.

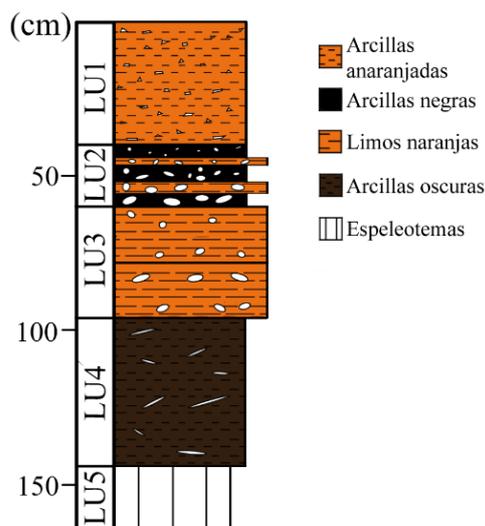


Figura 3. Columna sintética de la cata 1 (GE-1), de la cual provienen los restos utilizados en este trabajo, según las descripciones realizadas por Arsuaga et al. (2017).

En este trabajo se va a utilizar la secuencia estratigráfica definida por Arsuaga et al. (2017) (Figura 3). El nivel 5 (LU5) está conformado por fragmentos degradados de espeleotemas de coloración rosácea, que en la unidad 4 (LU4) desaparecen, observando la presencia de arcillas oscuras con clastos aislados heterométricos, de tamaño decimétrico y morfologías planares. En la unidad 3 (LU3) las arcillas pasan a tener un mayor tamaño de grano (limo), y presentan un color anaranjado, de tonos más oscuros hacia la base. En esta unidad también se observa la presencia de clastos aislados soportados por la matriz, pero en este caso, de base a techo, se ve una evolución de geometrías oblongas a más redondeadas. La unidad 2 (LU2) es muy abundante en clastos, que presentan tamaños decrecientes hacia el techo, en si se trata de arcillas negras con niveles limosos de color anaranjado. Por último, en la unidad 1 (LU1) vuelven a apreciarse arcillas de color naranja con fragmentos de clastos flotantes en la matriz, en este caso de tamaño milimétrico.

El depósito en GEII, al encontrarse más cerca de la entrada de la cueva, está constituido por dos unidades sedimentarias. Las unidades presentan diferencias sedimentarias con respecto lo observado en GE-I. La unidad 2 presenta en este caso una matriz de arcilla limosa de colores oscuros con gran cantidad de clastos de tamaño decimétrico y de morfologías angulosas. La unidad 1 presenta en la base arcillas

naranjas, al igual que en GE-I, pero en este caso con clastos decimétricos, y a techo los depósitos se corresponden con areniscas en disposición subhorizontal con clastos alterados.

Este yacimiento además cobra gran importancia al completar el registro fosilífero presente en la Sierra de Atapuerca. Siendo así, aporta información sobre el final del Pleistoceno-inicio del Holoceno, completando el espaciado de tiempo entre los yacimientos del Pleistoceno medio (Gran Dolina, Sima de los Huesos, Trinchera Elefante y Trinchera Galería), y los yacimientos del Holoceno (El Portalón, Galería del Sílex, El Mirador) (Arsuaga et al., 2017).

6.1.2 Gran Dolina

Este yacimiento, localizado en el nivel intermedio del sistema endokárstico, está constituido por 18-19m de relleno sedimentario, dividido en un total de 11 unidades diferentes (TD1-TD11) (Cuenca-Bescós et al., 2011). Esta cavidad parece relacionarse con el nivel más superior del sistema Cueva Mayor-Cueva del Silo, y se encuentra en la denominada Trinchera del Ferrocarril, más concretamente en el sector oriental de esta. Presenta una morfología en forma de cerradura, lo que se relaciona con un flujo de agua de tipo vadoso (Ortega, 2009).

El relleno sedimentario de esta cavidad (Figura 4) se encuentra ampliamente explicado en la tesis doctoral de Ortega (2009). A continuación, menciono resumidamente las principales características sedimentarias indicadas en dicho trabajo:

Esta secuencia sedimentaria presenta en todo su relleno restos de espeleotemas, comenzando en la base con depósitos de lutitas laminadas (TD1) y fragmentos de espeleotemas, con presencia de bloques caídos de la propia cavidad (TD2). Estos depósitos son características de interior, lo que indica que en esos momentos la cavidad no tenía apertura hacia el exterior. A continuación, se aprecian depósitos de *debris flow*, indicando así la apertura de la cavidad, con sedimentos brechoides de clastos angulosos heterométricos con matriz arenosa, que pasan a una alternancia de sedimentos clasto-soportados (microconglomerados) con niveles de lutitas rojas (decantación) y bloques de caliza caídos (TD3-TD4). En TD5 se aprecian diferentes coladas de barros con

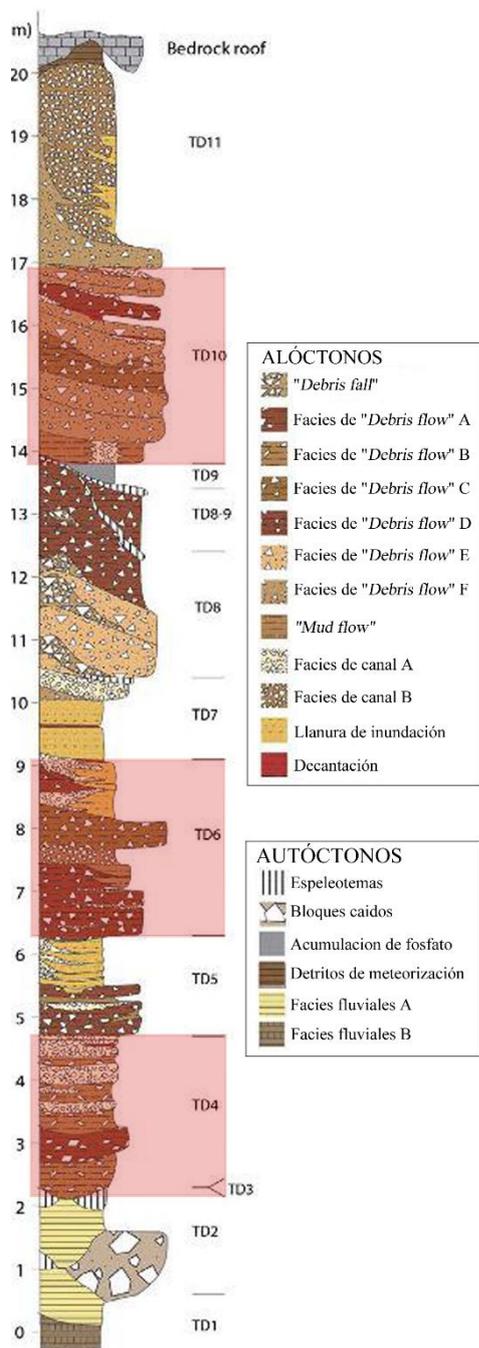


Figura 4. Columna modificada de Campaña et al., 2016, en la que se han indicado los niveles en los que pertenecen las muestras fósiles estudiadas mediante un recuadro rojo.

clastos centimétricos y capas microconglomeráticas. Al llegar a TD6 se aprecia un mayor predominio de clastos en los *debris flow*, con presencia de matriz tanto lutítica como de arena fina, así como se observan de nuevo depósitos de lutitas rojas. TD7 se deposita sobre una superficie erosiva que afecta a TD6, y está conformada por depósitos de origen fluvial, con calcarenitas laminadas de estratificación cruzada planar, así como conglomerados soportados por los clastos y brechas de gravas. En TD8 se observa la presencia de *debris flow* de gravas y bloques heterométricos clasto soportados. TD9 se caracteriza por un nivel de 35cm de potencia constituido por guano, que a la base presenta sedimentos limosos-arcillosos. De esta unidad también cabe destacar que se encuentra discordante sobre las anteriores, colmatando una estructura erosiva que afecta hasta TD5, rellena de depósitos limosos-lutíticos, así como arenosos. TD10 está constituida en la base por depósitos de interior, microconglomerados sin apenas matriz, que pasan a depósitos de colapso del techo y pared de la cavidad (bloques métricos en los *debris flow*), que indican un momento de apertura al exterior. Por último, la unidad TD11 está compuesta por sedimentos de origen fluvial, así como por coladas de barro, con una mayor cantidad de niveles clasto soportados hacia el techo de la unidad, y

presencia de intercalaciones de niveles de lutitas rojas. Esta secuencia sedimentaria se encuentra coronada por depósitos residuales de *terra-rosa*.

Este yacimiento es de gran importancia debido a la riqueza fosilífera que presenta, correspondiente al Pleistoceno. Esto permite distinguir el cambio desde las faunas del Pleistoceno inferior a las faunas del Pleistoceno medio (entre TD5-6 y TD8-10), ocasionadas por cambios paleoambientales (Cuenca-Béscos y García, 2007).

A parte de lo indicado, este yacimiento también es de gran importancia por el descubrimiento y descripción de los restos de *Homo antecessor* en TD6, así como por la datación mediante paleomagnetismo del límite entre los cronos Matuyama-Brunhes en la zona superior de TD7 por Parés y Pérez-González (1995).

6.2 Cueva del Mirón

La cueva del Mirón se encuentra localizada a unos 2 km al sur de la localidad de Ramales de la Victoria (Cantabria), en el valle del río Asón, así como en el interior de la Cordillera Cantábrica. Concretamente esta cueva se localiza en el sistema kárstico que se encuentra en el denominado Monte Pando. El Monte Pando está constituido por calizas cretácicas, en las cuales se ha formado un sistema endokárstico. Concretamente este sistema se ha desarrollado en calizas correspondientes a las facies Urgon.

Aunque aún no ha sido alcanzado el sustrato rocoso de esta cueva, mediante estudios de georradar realizados (García et al., 2012) se ha identificado a unos 9-10 metros de profundidad. El relleno detrítico tiene su origen sobre todo en los sedimentos, tanto aluviales como coluviales, localizados en la pendiente de entrada a la zona interna de la cueva (Straus y González, 2003) encontrándose los sedimentos aluviales rellenando todo el espacio disponible en la zona más interna de la cueva, impidiendo así saber la longitud total de este yacimiento (Straus y González, 2019). También hay presencia de restos orgánicos ricos en microvertebrados, así como depósitos originados por caídas de bloques, crioclásticos, y por precipitación de carbonato a partir de las calizas.

La Cueva del Mirón se encuentra dividida en 4 zonas diferentes: la Cabaña, la Trinchera, el Corral y la Rampa. Estas zonas presentan un registro sedimentario que

abarca desde el Musteriense (zona de la Rampa) hasta la edad del Bronce (zona de la Cabaña) (Cuenca-Bescós et al., 2008).

Los niveles estudiados en este trabajo (130 y 128), se corresponden con la zona de la Rampa (Figura 5). La secuencia estratigráfica de esta zona se corresponde en general con limos de tonalidades desde grisáceas hasta amarillos claros, con fragmentos de roca, tanto cantos redondeados como angulosos, así como fragmentos de sílex. En concreto, los dos niveles estudiados se corresponden con limos finos (Straus y González, 2003; Cuenca-Bescós et al., 2008).

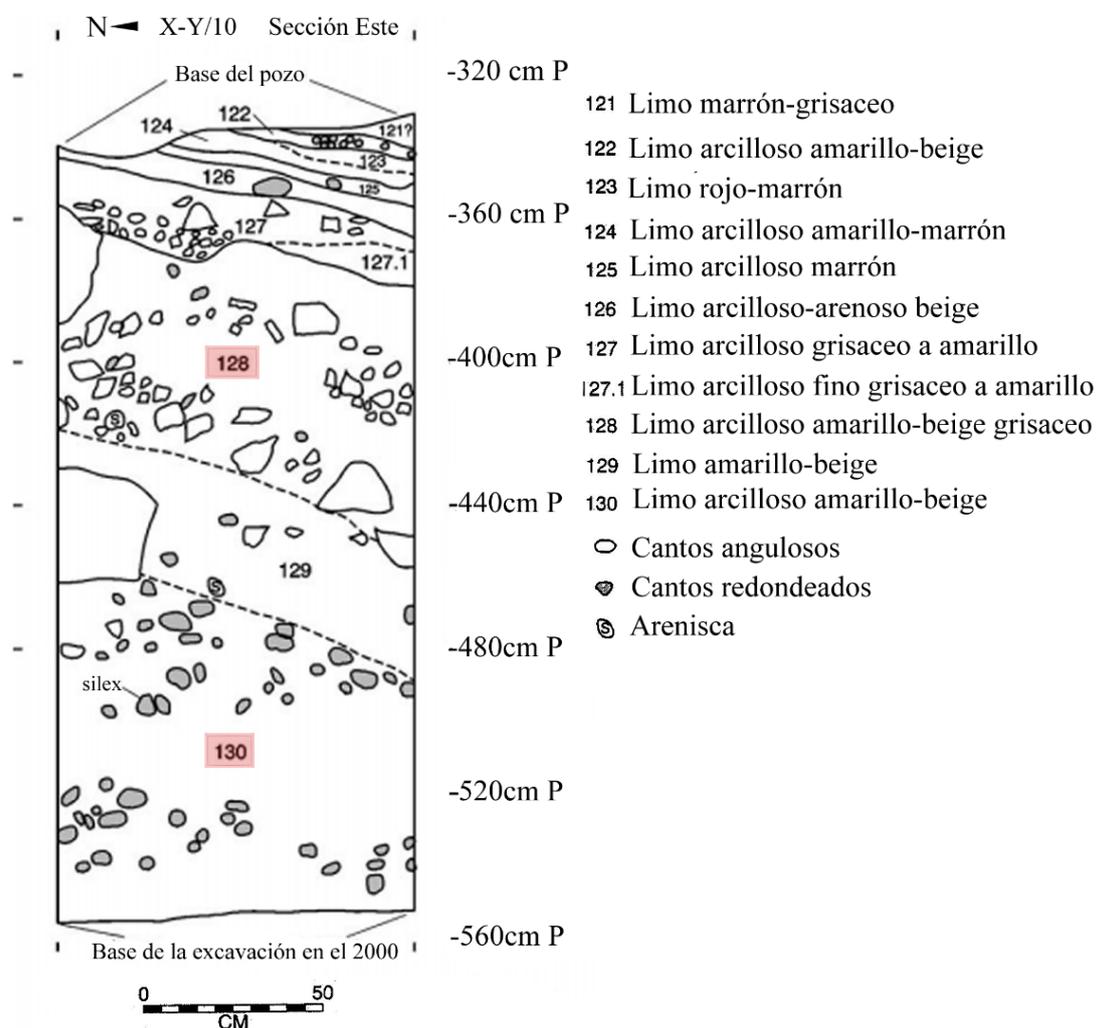


Figura 5. Columna modificada de Straus y González (2003), a partir de las descripciones realizadas en Cuenca-Bescós et al. (2008). Se ha indicado en un recuadro rojo los niveles a los que se corresponden las muestras estudiadas.

7. Metodología

7.1 Búsqueda bibliográfica

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica previa al inicio del trabajo, en la que aparte de revisar la información existente de las diferentes especies de *Microtus s.l.*, el objetivo era decidir cuál de los yacimientos, presentes en la Península Ibérica, eran los más favorables para el objetivo final del trabajo, delimitada esta decisión por el material fósil accesible en la Universidad de Zaragoza. A partir de esta búsqueda se ha decidido trabajar con los yacimientos de Galería de Estatuas y Gran Dolina correspondientes a la Sierra de Atapuerca (Burgos), y con el yacimiento de la Cueva del Mirón (Cantabria).

Una vez seleccionados los yacimientos se ha vuelto a recurrir a la literatura científica para decidir en qué zonas o niveles de dichas excavaciones era más adecuado realizar la búsqueda de los taxones que interesan para la realización de este trabajo. Para esta decisión se ha tenido en cuenta tanto la edad del yacimiento, como el estado de conservación de los restos, así como los taxones ya observados en dichos niveles.

Mediante el estudio del trabajo de Arsuaga et al (2017), se han decidido utilizar los siguientes marcos del yacimiento de galería de Estatuas (Atapuerca, Burgos), correspondientes a la primera cata realizada (GE-I): N-31, N-30, M-30 y L-31.

A partir de diferentes trabajos donde se recopilaban las especies presentes en los yacimientos de la Sierra de Atapuerca, y concretamente en Gran Dolina (Cuenca-Bescós, et al., 2016; Cuenca-Bescós, et al., 1995 y literatura allí mencionada), se ha seleccionado trabajar con los niveles TD3-4. TD6 y TD10.

En el yacimiento de El Mirón, se ha seleccionado los niveles 130 y 128. Se ha optado por estos niveles debido a que el nivel 130 se encuentra datado con edad Maastrichtiense y el nivel 128 se encuentra a pocos miles de años por encima de dicha edad. Además, estos niveles presentan una elevada biodiversidad, lo que conlleva que haya más

probabilidades de encontrar las especies necesarias para la realización de este trabajo. (Cuenca-Bescós, et al., 2008; López-García, 2008 y literatura allí mencionada)

7.2 Trabajo de gabinete

7.2.1 Estudio en microscopio

Se han estudiado a través de microscopio binocular los restos de los yacimientos seleccionados. En primer lugar, se ha realizado la búsqueda de los taxones en los yacimientos de Galería de Las Estatuas y de la Cueva del Mirón, con los cuales se han podido realizar los estudios paleogenéticos debido a la edad de los restos. Se ha dado prioridad a estos yacimientos ya que los análisis a realizar posteriormente necesitan que se les dedique una gran cantidad de tiempo, siendo además que en el último tramo de los análisis es necesario el procesamiento de los resultados por una entidad externa.

Los restos correspondientes a la Galería de Las Estatuas se encontraban clasificados según la cata, profundidad y nivel estratigráfico al que se corresponden (Arsuaga et al, 2017). En total se han estudiado 302 individuos (m1), de las especies *M. arvalis*, *M. agrestis*, *T. lusitanicus* y posibles representantes de *T. duodecimcostatus*, presentes en 140 muestras (cajas) distintas. Estas muestras se corresponden a los cuadros N-31, N-30 y al M-31 y L-31 (Figura 6). Se han elegido unos cuadros concretos para realizarse el estudio de toda la columna de la serie en una sección concreta, completándose algunas de las zonas con cuadros cercanos que presentaban centímetros de serie ausentes en el marco principal. En específico, se ha utilizado el cuadro M-31 para realizar una columna general de presencia/ausencia según el nivel estratigráfico, utilizándose los cuadros N-31, N-30 y L-31 para completar dicha columna. Se ha añadido una muestra del cuadro D33 de la segunda cata (GE-II), correspondiente a un representante de *Terricola*.



Figura 6. Muestras del yacimiento de Galería de Las Estatuas, cata GE-I, cuadros N-31, N-30, M-31 y L-31.

Los restos se encontraban en su mayoría sin estudiar, por dicha razón lo primero que se ha llevado a cabo es una selección de los m1 de *Microtus s.l.* presentes en cada una de las muestras.

En este yacimiento, aunque según lo indicado por Arsuaga et al. (2017), había presencia de las especies *T. gerbei/pyrenaicus*, *M. oeconomus* e incluso potencialmente de *I. cabreræ*, estas no se han observado en los cuadros estudiados en este trabajo. Su ausencia puede estar debida o bien a la ausencia de estas especies en los restos depositados en la Universidad de Zaragoza, o bien debido al efecto Signor-Lipps (Signor y Lipps, 1982), y por tanto hubiera sido necesaria una búsqueda más exhaustiva para encontrar estas especies, potencialmente más escasas que las observadas.

Se han estudiado las muestras de los niveles 130 y 128 de la Cueva del Mirón. El objetivo de trabajar con restos aun no estudiados es poder realizar los estudios de paleogenética con los taxones necesarios, sin tener que destruir individuos utilizados en publicaciones científicas. En total se han estudiado 70 muestras y 120 individuos (m1) distintos de estos niveles, centrándose el estudio en las especies no presentes en el yacimiento de Galería de Estatuas: *Ch. nivalis*, *M. oeconomus* y *T. pyrenaicus*, aunque también se han observado individuos de *M. arvalis*, *M. agrestis* y *T. lusitanicus*.

Una vez estudiados estos dos yacimientos, se ha procedido al estudio de los restos de Gran Dolina, correspondiente a los niveles TD3-4, TD6 y TD10. Se ha seleccionado estos niveles debido por un lado a la abundancia de arvicolinos, así por ser en los que se observa una mayor coincidencia de las especies estudiadas (Cuenca-Bescós et al., 2016). En Gran Dolina se han estudiado especies desde el Pleistoceno medio al Pleistoceno superior, las cuales no son óptimas para su estudio paleogenético. En este caso, las muestras se encontraban ya estudiadas y clasificadas, razón por la cual se ha seleccionado para su estudio 54 individuos de 20 muestras distintas.

Para finalizar, como en los yacimientos estudiados no se ha observado la presencia de la especie *I. cabreræ*, se ha recurrido a los restos de una población moderna de los

años 60, ya extinta, presente en la localidad de Uncastillo (Huesca), para poder estudiar la morfología de esta especie. Tampoco se han encontrado ejemplares de *M. gregalis* ni del outgroup *C. glareolus*, pero por su presencia en el yacimiento de la Cueva de El Mirón, se han tenido en cuenta estas especies para los análisis morfológicos a partir de las descripciones realizadas en la bibliografía correspondiente a este yacimiento.

7.2.2 Seguimiento fotográfico

Se han realizado fotografías de los individuos mejores preservados, así como de los que se analizarán en el laboratorio de paleo genética, en los que también se realizarán los estudios de la presencia o ausencia de los caracteres morfológicos.

También se han realizado fotografías a detalle del complejo anterocónido de 39 individuos de las especies correspondientes a *Terricola*, de los yacimientos de Galería de las Estatuas y de la Cueva del Mirón, con el objetivo de realizar los análisis de morfometría geométrica.

7.2.3 Análisis estadísticos y cladísticos

Se ha realizado una matriz de caracteres, codificada en 1, 0 y 2 según la presencia, ausencia, o estado intermedio del carácter en cuestión observado en los individuos fósiles y subfósiles de Arvicolinae estudiados en este trabajo (Tabla 1). A parte de las observaciones realizadas, se ha recurrido a la literatura científica ya mencionada para observar los caracteres estudiados.

Se ha observado una gran variabilidad morfológica entre las diferentes especies, por dicha razón se ha recurrido únicamente a los caracteres con un comportamiento más homogéneo observado entre los individuos.

Con dicha matriz se han realizado diferentes análisis estadísticos y cladísticos mediante los programas Past v. 4.03 (Hammer et al., 2001) y TNT v. 1.5 (Goloboff y Catalano, 2016) respectivamente. Mediante el uso de Past se ha realizado un análisis de tipo fenotípico, realizándose un cluster clásico. Se ha realizado mediante el algoritmo “*Paired group*” (UPGMA), y utilizando el índice de la distancia Euclídea. Se ha

obtenido un dendograma el cual servirá para poder apreciar las relaciones entre las distintas especies antes de llevar a cabo el análisis cladístico.

Tabla 1. Matriz que recoge los caracteres analizados y su estado de desarrollo en cada una de las especies estudiadas. **1.** Raíces; **2.** Esmalte diferenciado; **3.** Esmalte tipo *Microtus*; **4.** Zonas libres de esmalte; **5.** T3 (tercer triángulo) + CA (cúspide anterior); **6.** Segundo RP (rombo pitimiano); **7.** Primer RP; **8.** 4li (cuarto entrante lingual) fuertemente probergente; **9.** Ausencia T6; **10.** Asimetría labio-lingual (LaLi); **11.** Gancho lingual proximal; **12.** Cuello antes de CA; **13.** 4 o 5 entrantes linguales; **14.** Cuarto entrante lingual y tercer entrante labial escalonados; **15.** T5 cerrados.

Especies	Caracteres														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Microtus arvalis</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	2	1	0	1
<i>Microtus agrestis</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	2	1	1	1
<i>Microtus jansoni</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	2	1	0	1
<i>Iberomys cabreræ</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Iberomys mediterraneus</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
<i>Iberomys huescarensis</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
<i>Chionomys nivalis</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Terricola pyrenaicus-gerbei</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0
<i>Terricola lusitánicus</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0
<i>Microtus seseae</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>Terricola atapuerquensis</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0
<i>Terricola duodecimcostatus</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>Microtus oeconomus</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Microtus gregalis</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>Stenocranius gregaloides</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Con el programa TNT se ha realizado un cladograma por búsqueda tradicional, mediante el método TBR (*tree bisection reconnection*). Se han llevado a cabo un total de 1000 réplicas, refiriéndose este dato a la cantidad de secuencias añadidas de forma aleatoria, de las cuales se han guardado 100 árboles por réplica. En total se han obtenido 4 cladogramas en los cuales se ha realizado un árbol de consenso estricto. En este cladograma es donde se han realizado los análisis de soporte de ramas de tipo parsimonia Bootstrap estándar (Felsenstein, 1985) y Bremer support (*decay index*) (Bremer, 1994). Se considerará un buen soporte de las ramas cuando el valor de soporte se encuentre por encima o igual del 75% en Bootstrap y de 4/5 en Bremer.

7.2.4 Estudio morfométrico

Mediante las fotografías realizadas a las especies de *Terricola* se ha realizado un estudio de morfometría geométrica utilizando los programas TPSutil, para crear los archivos TPS, y TPSdig, para digitalizar y situar los landmarks (Rohlf, 2015). Se ha realizado una primera aproximación al estudio del complejo anterocónico de 37 muestras, correspondientes a las especies de *T. lusitanicus*, *T. duodecimcostatus*, y *T. pyrenaicus* de los yacimientos de La Cueva del Mirón y la Galería de las Estatuas. Se han colocado un total de 14 landmarks (Figura 7, B), correspondientes a las siguientes posiciones: 1. Ápice de BRA2, 2. Ápice T4, 3. Ápice BRA3, 4. Ápice T6, 5. Ápice BRA4, 6. Ápice CA, 7. Ápice LRA5, 8. Ápice T7, 9. Ápice LRA4, 10. Ápice T5, 11. Ápice LRA3, 12. Primera inflexión BRA3, 13. Inflexión LRA4, 14. Segunda inflexión BRA3, 15. Inflexión LRA3. Los landmarks 13 y 14 se han seleccionado al observarse un aparente cuello entre T4-T5 y T6-T7 de mayor longitud en las especies correspondientes a *T. lusitanicus*, para así poder tener una mejor medida de dicho carácter.

Posteriormente, estos landmarks se han estudiado mediante el programa PAST, realizándose en primer lugar un Análisis Cluster, para observar las posibles relaciones entre las muestras obtenidas. A continuación, se ha realizado una representación geométrica de los componentes principales (PC), considerando aquellos que agrupen entre el 75 y 85% de varianza, en la cual se han observado cómo se agrupan las distintas muestras, así como cuáles de ellas presentan valores más anómalos. Las muestras anómalas han sido eliminadas, pasando a un total de 33 muestras, repitiéndose entonces los análisis realizados para obtener el resultado final.

También se ha llevado a cabo un estudio por morfología clásica, mediante los parámetros e índices de van der Meulen (1973), con las mismas muestras con las que se han realizado los estudios de morfometría geométrica: a (longitud del CCA), W (anchura total del diente), b/W (b=cuello entre T4-T5 y T6-T7), c/W (c=anchura del primer RP), d (cuello entre T6-T7 y CA) y e (anchura de CA) (Figura 7, B). Después de realizar las medidas correspondientes, se han llevado estos datos de nuevo al programa PAST, donde se ha realizado un Análisis Cluster y un Análisis Discriminante, para observar la clasificación de los diferentes individuos según las medidas tomadas, y compararlo con la clasificación dada inicialmente.

En la Figura 7 se ha indicado la nomenclatura utilizada en este trabajo, la posición de los landmarks, así como la localización de los parámetros de medida utilizados.

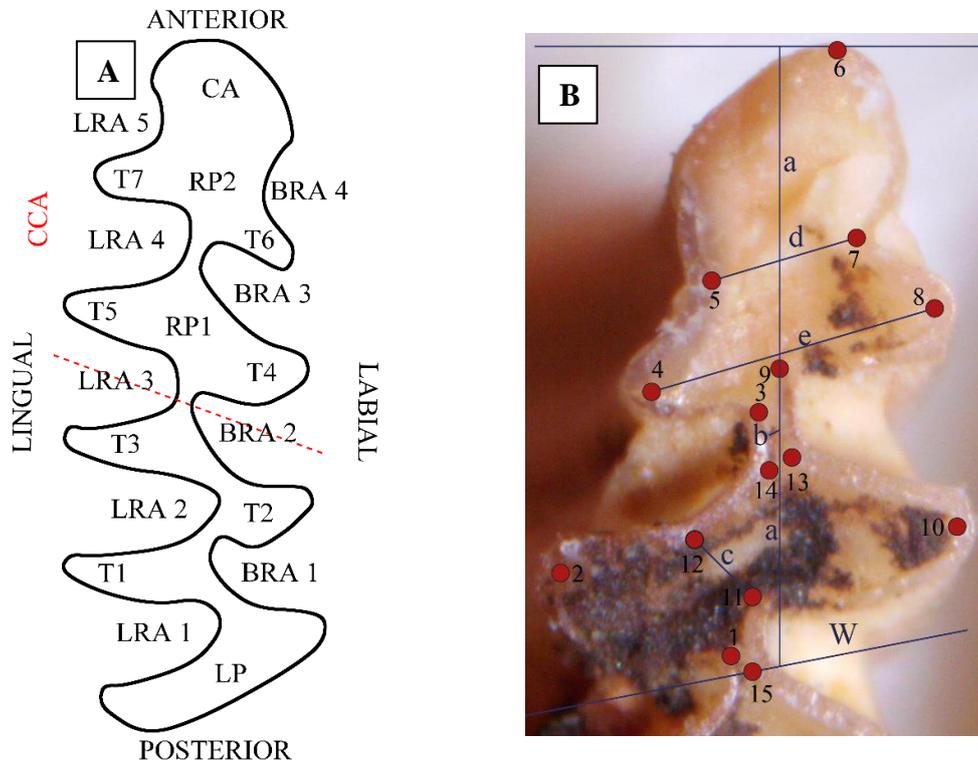


Figura 7. A) Nomenclatura correspondiente a los m1 de las especies estudiadas, según van der Meulen (1973). RP: Rombo pitimiano, CA: cúspide anterior, LRA: ángulo entrante lingual, BRA: ángulo entrante bucal; T: triangulo, LP: lóbulo posterior, CCA: complejo anterocónido.

B) Posición de los landmarks y medidas realizadas en el CCA de las especies de *Terricola* estudiadas en morfometría.

7.3 Trabajo de laboratorio

Todo el proceso y protocolo de pretratamiento, extracción de ADN y elaboración de las librerías genéticas se ha llevado a cabo en el laboratorio de paleogenómica del IUCA en la Universidad de Zaragoza. Los trabajos post-PCR se han realizado en el laboratorio de genómica funcional del CIBA, localizado en el campus San Francisco de la Universidad de Zaragoza.

Se han analizado un total de 11 muestras correspondientes a los taxones *M. agrestis*, *M. arvalis*, *T. duodecimcostatus-lusitanicus*, *T. lusitanicus*, *T. pyrenaicus-gerbei* y *Ch. nivalis* (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras en las que se han realizado los estudios de paleogenética, indicando la procedencia de las mismas, los detalles de las muestras y de los yacimientos, así como el número de laboratorio asignado.

Espece	Yacimiento	Mandíbula	Detalles	Número laboratorio
<i>Microtus agrestis</i>	Estatuas	Izquierda	M31, Niv3, 250/260	122
<i>Microtus agrestis</i>	Estatuas	Derecha	M30, Niv1-2, 240/260	123
<i>Microtus arvalis</i>	Estatuas	Derecha	M30, Niv3, 280/290	124
<i>Terricola duodecimcostatus-lusitanicus</i>	Estatuas	Derecha	N31, Niv3, 260/270	125
<i>Terricola lusitanicus</i>	Mirón	Derecha	X10A, Niv130, z=34	126
<i>Microtus agrestis</i>	Mirón	Izquierda	X10D, Niv130, z=34	127
<i>Microtus arvalis</i>	Mirón	Derecha	X10A, Niv130, z=25	128
<i>Chionomys nivalis</i>	Mirón	Izquierda	X10A, Niv130, z=25	129
<i>Terricola pyrenaicus</i>	Mirón	Derecha	X10A, Niv130, z=30	130
<i>Microtus agrestis</i>	Mirón	Izquierda	X10A, Niv128, z=21	131
<i>Microtus oeconomus</i>	Mirón	Izquierda	W10B, Niv128, z=12	132

Debido a diferentes problemas de escasez de material a nivel mundial por la actual situación de pandemia, así como por algunos fallos en los resultados de los análisis, no se ha podido terminar todo el proceso. Se va a explicar el procedimiento que se ha podido llevar a cabo.

7.3.1 Pretratamiento

Para la preparación de las muestras se ha seguido el protocolo indicado en Bover et al. (2018). Antes de tratar las muestras, se ha procedido a eliminar cualquier rastro de contaminación externa presente en las bolsas y/o tubos que las transportaban. Para ello se ha lavado con lejía el exterior de las bolsas y tubos y se las ha sometido a irradiación con rayos UV durante 5 minutos.

Al ser las muestras de fósiles de micromamíferos, su reducido tamaño ocasiona que no se pudiera eliminar la capa más superficial mediante el uso de herramientas mecánicas, por lo que se han utilizado bisturís con hojas estériles para eliminar los restos de sedimentos. Posteriormente los huesos se han irradiado mediante rayos UV durante 30 minutos cada lado, a continuación, se ha realizado una limpieza de la superficie con hipoclorito sódico (lejía) al 2%, seguido de una inmersión en etanol al 80% durante 2 minutos para eliminar los rastros de lejía. Finalmente, las muestras se dejaron secar al aire dentro de una campana extractora (Figura 8). Para finalizar la limpieza y descontaminación de las muestras se las ha vuelto a someter a irradiación con rayos UV durante 15 minutos cada lado.



Figura 8. Muestras llevadas al laboratorio de paleogenómica del IUCA en la Universidad de Zaragoza, dentro de la campana extractora durante el proceso de secado al aire libre.

Al tratarse de muestras de microvertebrados, se han pulverizado físicamente en el interior de tubos tipo Eppendorf de 2 mL con tapón de rosca. Para evitar la contaminación entre las muestras, a cada una de ellas le corresponde su propia pinza y su propio tubo. El peso final del polvo/fragmentos de hueso correspondiente a cada una de las muestras se ha representado en la Tabla 3.

Tabla 3. Peso final (mg) del polvo/fragmento de hueso correspondiente a las muestras, después de haberse realizado todo el proceso de pretratamiento de las muestras

Número laboratorio	Especie	Peso (mg)
122	<i>Microtus agrestis</i>	53
123	<i>Microtus agrestis</i>	73
124	<i>Microtus arvalis</i>	31
125	<i>Terricola duodecimcostatus-lusitanicus</i>	29
126	<i>Terricola lusitanicus</i>	48
127	<i>Microtus agrestis</i>	81
128	<i>Microtus arvalis</i>	62
129	<i>Chionomys nivalis</i>	130
130	<i>Terricola pyrenaicus</i>	65
131	<i>Microtus agrestis</i>	28
132	<i>Microtus oeconomus</i>	115

7.3.2 Extracción ADN

Para el proceso de extracción del ADN presente en cada una de las muestras fósiles se ha procedido con una modificación del protocolo de Dabney et al. (2013), utilizando un PB buffer (tampón PB) (Quiagen) modificado, así como partículas de sílica en suspensión (Brotherton et al., 2013), según lo indicado en Bover et al. (2019). Estas partículas de sílica se adhieren a los fragmentos de ADN que pueda haber presente en las muestras fósiles.

En todo este proceso se ha utilizado también un control negativo, para poder comprobar más adelante que el proceso se ha llevado a cabo correctamente, y que no han sucedido contaminaciones externas. Describiendo brevemente el proceso realizado, se ha llevado a cabo una predigestión/descalcificación preliminar del polvo de hueso mediante 1mL EDTA 0.5 M durante una hora en rotación constante. A continuación, y una vez retirado el EDTA, se introdujo 1mL de tampón de digestión (0.45M EDTA, 0.25 mg/ml Proteinassa K) en cada uno de los tubos de muestras y se incubaron durante 20 horas, también en rotación constante, a 55°C de temperatura. Finalmente, después de un proceso de centrifugado para que los restos de partículas sólidas se mantengan en el fondo de los tubos, se recolectó el sobrenadante y se añadió a un tampón de 13,6 mL de

PB buffer (Qiagen), 7 μ L de Tween-20, 420 μ L de acetato de sodio 3M, y 100 μ L de sílica en suspensión. Por último, se lavaron las partículas de sílica mediante etanol al 80%, y el ADN se eluyó con 100 μ L de tampón TLE.

7.3.3 PCR

Para poder verificar si hay presencia de ADN de mamífero en las muestras, se ha realizado una PCR mediante el uso de cebadores (*primers*) universales de mamíferos. Esta PCR amplifica un fragmento de 96-97 pares de bases (pb) del gen mitocondrial 12S. Estos cebadores, descritos en Macqueen et al. (2010), se tratan del *Mammal* 12S E (*Forward*) y *Mammal* 12S H (*Reverse*).

Para realizar esta PCR se usaron 2 μ L de cada uno de los extractos en cada reacción, con un volumen final de 25 μ L: 1 \times Amplitaq Gold Buffer (Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 0.4 μ M de cada cebador, 0.25 mM de cada dNTP, 1.25 U Amplitaq Gold (Applied Biosystems) (enzima de amplificación de ADN), 2 mg/mL de albúmina de serum de conejo (RSA, Sigma-Aldrich) y agua estéril. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 6 min, 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 s, unión del cebador a 55°C durante 15 s y extensión a 72°C durante 40 s; y una elongación final a 72°C durante 10 min. Estos productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, marcados mediante 0.5 μ L de Dye-non-tox (PanReac AppliChem), para así poder ser visualizados mediante un transiluminador

7.3.4 Librerías

El proceso de crear las librerías consiste en preparar el posible material genético para su posterior secuenciación. En este caso, se van a construir librerías de cadena doble (DSL), usando el método de Meyer y Kircher (2010), con las modificaciones de Llamas et al. (2016). Para obtener dichas cadenas dobles se han unido, mediante la proteína Ligasa, adaptadores cortos P5 y P7 (que presentan un “código de barras” o *barcodes* de 7 pb en cada adaptador) a cada uno de los extremos de las moléculas de ADN. Con el uso de alta temperatura se ha desactivado la encima Bst polimerasa después de la

reacción de relleno, la cual alarga los adaptadores hasta que ambas cadenas sean de igual longitud. La combinación específica de cada uno de los códigos de barras en los adaptadores P5 y P7 permiten identificar cada una de las muestras, y por tanto, a que individuo pertenece cada una de ellas después del proceso de secuenciación (Tabla 4).

Tabla 4. Combinación de los adaptadores cortos P5 y P7 para cada una de las muestras. También se indica el número identificativo correspondiente en el Bioanalizador.

Número laboratorio	Especie	Barcode P5	Adaptador P5	Barcode P7	Adaptador P7	Nº Bioanalyzer
122	<i>Microtus agrestis</i>	ATCGATT	P5_fwd_BC001	GCTAGCC	P7_fwd_BC003	JLG02
123	<i>Microtus agrestis</i>	CAGTCAA	P5_fwd_BC002	ATCGATT	P7_fwd_BC001	JLG03
124	<i>Microtus arvalis</i>	GCTAGCC	P5_fwd_BC003	CAGTCAA	P7_fwd_BC002	JLG04
125	<i>Terricola duodecimcostatus-lusitanicus</i>	TGACTGG	P5_fwd_BC004	TGACTGG	P7_fwd_BC004	PBA07
126	<i>Terricola lusitanicus</i>	CAATTGC	P5_fwd_BC005	TGACTGG	P7_fwd_BC004	PBA08
127	<i>Microtus agrestis</i>	GCCAATG	P5_fwd_BC006	GTCATAC	P7_fwd_BC010	JLG05
128	<i>Microtus arvalis</i>	TGGCCAT	P5_fwd_BC007	CAATTGC	P7_fwd_BC005	PBA09
129	<i>Chionomys nivalis</i>	ATTGGCA	P5_fwd_BC008	GCCAATG	P7_fwd_BC006	PBA10
130	<i>Terricola pyrenaicus</i>	CGATGTA	P5_fwd_BC009	GCCAATG	P7_fwd_BC006	JLG06
131	<i>Microtus agrestis</i>	GTCATAC	P5_fwd_BC010	ATCGATT	P7_fwd_BC001	JLG07
132	<i>Microtus oeconomus</i>	ATTGGCA	P5_fwd_BC008	CAGTCAA	P7_fwd_BC002	JLG08

El kit de PCR Amplitaq Gold (Applied Biosystems) ha sido utilizado tanto para la amplificación de las librerías (primera amplificación) como para la realización de la PCR de amplificación de los adaptadores Truseq de Illumina (P5_ipCR_LPx y GAI Indexingx), los cuales se unen a los adaptadores P5 y P7. Los productos de la amplificación se purificaron mediante partículas SPRI AxyPrep (AxyGen), partículas magnéticas a las que, bajo determinadas condiciones, se adhiere el ADN. Los productos de la primera amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% marcados con 0,5 µL de Dye-non-tox y se cuantificaron con Qubit (kit High Sensitivity). En este caso, la visualización de los fragmentos de ADN en la primera amplificación suele mostrar un patrón en forma de “smear” (las moléculas más largas se mueven más lentamente por el gel agarosa) y se puede evaluar si las moléculas presentes se encuentran por un rango entre 100 y 400 pb de longitud. En el caso de que presenten longitudes mayores podría indicar la presencia de contaminación de ADN moderno, o si por el contrario

existen picos marcados en longitudes inferiores, podría indicar la presencia de dímeros (unión entre sí de los adaptadores P5 y P7).

Una vez realizada la cuantificación mediante Qubit, los productos resultantes de la amplificación con los adaptadores Truseq se han visualizado en el Bioanalizador “*Bioanalyzer*” (kit High Sensitivity) del centro de genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

8. Sistemática

Como ya se he mencionado, se va a tratar a los subgéneros como géneros por razones descriptivas. A continuación, se realiza una breve descripción de la morfología observada en los diferentes ml estudiados. También se va a hacer mención del hábitat de las especies actuales, presentes en la Península Ibérica, obtenido a partir del Atlas y Libro rojo de los Mamíferos Terrestres de España (Palomo et al., 2007), puesto que se observan marcadas diferencias en el hábitat correspondientes a cada uno de los géneros.

Familia: Cricetidae, Fisher, 1817

Subfamilia: Arvicolinae, Gray, 1821

Género: *Clethrionomys*, Tilesius, 1850

Especie: *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780)

Breve descripción: El topillo rojo se caracteriza por ser el único arvicolino presente en la actualizad con raíces en la Península Ibérica. También se caracteriza por presentar abundante cemento tanto en los entrantes linguales como bucales, así como por no presentar esmalte diferenciado ni zonas libres de esmalte. Todos sus triángulos se encuentran comunicados entre sí, y se observa la presencia de hasta T7 antes de la cúspide anterior, con ausencia de cuello.

Hábitat actual: Aunque puede llegar a estar presente en zonas de pradera con presencia de matorrales, setos, o incluso en muros de piedra con vegetación, son las

zonas boscosas, con abundante sotobosque y pedrizas húmedas, el hábitat primordial de esta especie.

Género: *Stenocranius* (Kastschenko, 1901)

Especie: *Stenocranius gregaloides* (Hinton, 1923)

Breve descripción: Esta especie extinta de topillo se caracteriza por presentar un reducido o inexistente T6, con presencia del primer rombo pitimiano (T4 y T5 confluyentes), así como LRA4 y BRA3 paralelos entre sí (Cuenca-Bescós et al., 1998). A parte de estas características presenta el resto de caracteres básicos de *Microtus s.l.* (esmalte tipo *Microtus*, zonas libres de esmalte y ausencia de raíces) (Figura 10).

Género: *Chionomys*, Miller, 1908

Especie: *Chionomys nivalis* (Martins, 1842)

Breve descripción: la especie *Chionomys nivalis*, también conocido como el topillo nival o el neverón, se caracteriza por la morfología que presenta T6 y T7, dando una apariencia de “punta de flecha” o “seta” a la cúspide anterior, y por tanto con ausencia de cuello, presentando 4 entrantes linguales. La cúspide anterior tiene una leve inclinación hacia el lado labial, inclinándose T6 hacia la parte posterior. Presenta esmalte diferenciado tipo *Microtus* con zonas libres de esmalte (Figura 10).

Hábitat: En zonas de alta montaña y de gran altitud, donde hay presencia de acumulaciones rocosas estables, como pedrizas y canchales.

Género: *Microtus*, Schrank, 1798

Todas las especies de *Microtus* se caracterizan por su ausencia de raíces, por presentar esmalte tipo *Microtus*, con la zona más gruesa del esmalte en la parte anterior de los triángulos, así como zonas libres de esmalte. La especie tipo del género *Microtus* es el topillo campesino, *Microtus arvalis*. En general se corresponden con hábitats en

zonas abiertas de pradera y climas húmedos, con cobertura herbácea constante en el tiempo.

Especie: *Microtus arvalis* (Pallas, 1779)

Breve descripción: El topillo campesino, *M. arvalis*, denominado antiguamente como *M. terrestris*, se corresponde con la especie tipo del género *Microtus*. Se observa la presencia hasta T7, con presencia de cuello entre T7 y T6 y la cúspide anterior. Esta cúspide presenta una morfología más redondeada que la observable en *M. agrestis*.

Estas dos especies muy similares, fueron estudiadas ampliamente por Luzi (2018). Entre sí se diferencian, aparte de por la morfología de la cúspide anterior, por la simetría y disposición de los triángulos T4/T5 y T6/T7. En el caso de *M. arvalis* T4 y T5 presentan una mayor simetría, siendo ambos de tamaño similar. Además, en los triángulos T6/T7 se puede apreciar como en esta especie son confluentes y paralelos entre sí (Figura 9).

Hábitat actual: Este topillo habita en medios abiertos, con abundante cobertura herbácea o arbustiva, que se mantiene a lo largo del tiempo.

Especie: *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761)

Breve descripción: La especie *M. agrestis*, conocida como el topillo agreste, es muy similar a *M. arvalis*, presentando los mismos caracteres que los mencionados en el anterior. *M. agrestis* presenta una marcada asimetría entre los triángulos T4/T5 y por presentar T6/T7 una disposición menos paralela que en *M. arvalis*, encontrándose T6 claramente por debajo de T7, lo que lleva a que la cúspide del topillo agreste no sea tan redondeada y más alargada (Luzi, 2018). Su similitud tiene como resultado que en algunos casos sea complicada su diferenciación, incluso algunos autores llegan a agruparlos (Pokines, 1998; Baena et al., 2005) (Figura 9).

Hábitat actual: Al igual que *M. arvalis*, esta especie habita en medios abiertos, como praderas y herbazales espesos. También se encuentra presente en bosques jóvenes y en

zonas de montaña o boscosas, así como en márgenes de arroyos o riachuelos y juncales. Aun así, su medio ideal son pastos abiertos con cobertera de gramíneas.

Especie: *Microtus jansoni* (Chaline, 1972)

Breve descripción: Se trata de una especie de arvicolino extinta, presente durante el Pleistoceno medio. Presenta una morfología similar a la observada en *Microtus agrestis*. Su m1, al igual que el del resto de *Microtus*, está constituido por hasta 7 triángulos, estando los dos últimos comunicados entre sí. En algunos ejemplares estudiados en la literatura científica se ha identificado la presencia de un T9 desarrollado en la cúspide anterior, con un ángulo rentrante con gran incisión (B.A 5) (Chaline, 1972) (Figura 9).

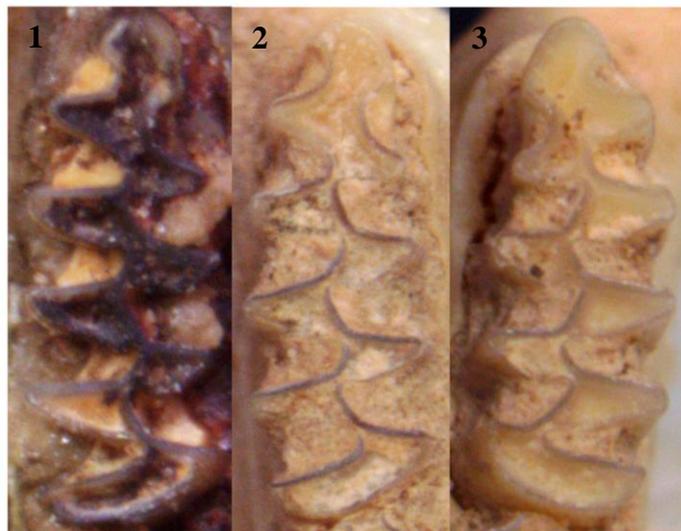


Figura 9. Fotografías de individuos seleccionados de 1) *Microtus jansoni* (Gran Dolina, TD10), 2) *Microtus arvalis* y 3) *Microtus agrestis* (Galería de las Estatuas, nivel 3). Escala 1mm.

Especie: *Microtus gregalis* (Pallas, 1779)

Breve descripción: *M. gregalis*, conocido como topillo de cabeza estrecha, presenta el mismo tipo de esmalte que el resto de *Microtus s.l.*. Se observa hasta T7, pero con un reducido o inexistente T6, característica que lo diferencia del resto de *Microtus*. T5 y T4 se encuentran incomunicados y se observa un cuello, poco desarrollado, entre T7 y T6 y la cúspide anterior, lo que conlleva a que presente un total de 5 entrantes linguales.

Hábitat actual: La especie *M. gregalis* prefiere zonas con temperaturas medias frías, en zonas abiertas, que varían desde estepas desérticas hasta tundras en zonas montañosas (Pal'chekh et al., 2002).

Especie: *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776)

Breve descripción: El topillo nórdico o topillo de las turberas, *M. oeconomus*, presenta al igual que *M. gregalis* un reducido o inexistente T6, además el T7 suele estar orientado hacia abajo, dándole al complejo anterior una morfología similar a un gancho. En las muestras estudiadas no se observa presencia de cuello entre T7 y la cúspide anterior, presentando por lo tanto hasta LRA3 (Figura 10).

Hábitat actual: La presencia de este roedor se observa en zonas de tundra o taiga, con abundante cobertera vegetal. Es común que se asiente en márgenes de lagos. Se ha observado que los restos fósiles de esta especie también se localizan en zonas mixtas de bosque y taiga.

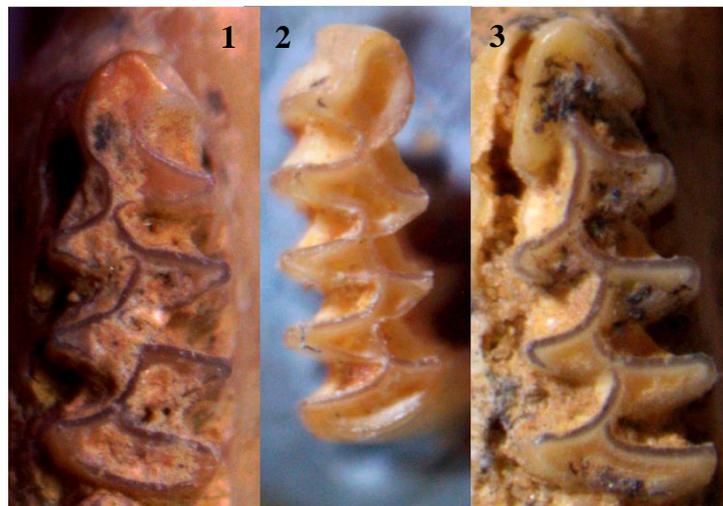


Figura 10. Fotografías de los individuos seleccionados de las especies de 1) *Microtus oeconomus* (Cueva de El Mirón, nivel 128), 3) *Chionomys nivalis* (Cueva de El Mirón, nv 130) y 2) *Stenocranius gregaloides* (Gran Dolina, TD4). Escala 1mm.

Especie: *Microtus sesae* (Gil, 1997)-*Terricola arvalidens* (Kretzoi, 1957)

Breve descripción: Se ha decidido agrupar las especies de *Microtus seseae* y *Terricola arvalidens* debido a la similitud que presentan estas dos especies en las muestras estudiadas, aunque en otros trabajos correspondientes al yacimiento donde pertenecen estas muestras (e.g., Cuenca-Bescós et al., 2016) si las han dividido. A parte de las características propias de las especies de *Microtus*, presenta tanto el primer como el segundo rombo pitimiano, pero con T6 y T7 muy alternantes, y el ángulo entrante LRA4 muy profundo (Gil, 1997). La presencia de ambos rombos pitimianos es una característica de las especies de *Terricola*, razón por la cual, a los especímenes que presenta un mayor desarrollo del primer rombo pitimiano, así como un BRA4 más profundo se les atribuye la clasificación de *Terricola arvalidens*, mientras que en los que los triángulos T4/T5 presentan un mayor salto entre estos dos, se le clasifica como *Microtus seseae*. (Cuenca-Bescós et al., 1998) (Figura 12).

Aunque se ha observado esta diferencia, se ha optado por clasificarlos conjuntamente ya que no se ha apreciado con claridad que se trate de especies distintas, al menos con los caracteres tenidos en cuenta en este trabajo.

Género: *Iberomys* (Chaline, 1972)

Las especies correspondientes al subgénero *Iberomys* se diferencian de las especies de *Microtus* por presentar una cúspide anterior con morfología triangular, así como presentar el denominado gancho lingual proximal, características observadas por Chaline (1972). Estas especies también presentan una marcada asimetría entre los triángulos labiales y linguales, presentando los salientes linguales una mayor longitud lateromedial en comparación con los labiales, característica denominada por Cuenca-Bescós et al., 2014 como “asimetría labio-lingual”, característica que se acrecienta en los taxones más modernos.

Por estas características distintivas, las cuales lo diferencian de otros representantes del género *Microtus*, es considerado por algunos investigadores (Cuenca-Bescós et al., 2014), que debería de ser elevado al siguiente nivel taxonómico de jerarquización, considerando a *Iberomys* como un género en vez de subgénero de *Microtus*.

El hábitat de las especies de *Iberomys* se corresponden con prados abiertos y húmedos, con presencia de pastos altos y suelos blandos.

Especie: *Iberomys huescarensis* (Ruiz Bustos, 1988)

Breve descripción: A esta especie antiguamente se le llegó a incluir dentro del subgénero *Pitymys* (actualmente se corresponde con los *Terricola*), refiriéndose a ella como *Pitymis huescarensis* (Ruiz Bustos, 1988). Este topillo aparece durante el Pleistoceno inferior, siendo el primer representante del *Iberomys*.

Entre sus caracteres se puede apreciar la gran confluencia entre los triángulos anteriores (T7/T6), así como presentar un complejo anterior triangular, pero no tan marcado como las especies más modernas de *Iberomys*, presentando una morfología más arvaloides que gregaloides (Chaline, 1972).

En esta especie no se observa BRA4, por lo tanto, no hay presencia de cuello que separe los triángulos T6/T7 de la cúspide anterior. Además, esta es la especie de *Iberomys* que presenta una menor asimetría labio-lingual (Cuenca-Bescós et al., 2014) (Figura 11).

Especie: *Iberomys mediterraneus* (Chaline, 1967)

Breve descripción: Esta especie de topillo fue nombrada por Giebel (1847) como *Iberomys brecciensis*, en 2014 Cuenca et al. propusieron el cambio de nombre a *I. mediterraneus* debido a los problemas taxonómicos existentes con el holotipo definido para esa especie por Chaline (1972). Los primeros registros de este topillo se corresponden con el Pleistoceno medio. También se observa una asimetría labio/lingual, bastante más marcada que en su antecesor *I. huescarensis*. En algunas especies se puede llegar a apreciar como BRA4 presenta una gran probergencia (Cuenca-Bescós et al., 2014) (Figura 11). En imágenes de la literatura científica se ha observado la presencia de un LRA4 muy poco marcado, dando lugar a un cuello muy amplio (Chaline, 1972; Cuenca-Bescós et al., 2014), pero no en las muestras estudiadas en este trabajo.

Especie: *Iberomys cabrerae* (Thomas, 1906)

Breve descripción: El iberón o topillo de cabrera, *I. cabrerae*, es una especie endémica de la Península Ibérica, y el único representante actual de *Iberomys*. Se diferencia de otras especies de *Iberomys* por la presencia de un cuarto entrante lingual muy profundo, alcanzando prácticamente el lado labial (Chaline, 1972). Esta especie también es la que presenta una cúspide anterior más triangular, así como la mayor asimetría latero-labial observado en estas especies (Cuenca-Bescós et al., 2014) (Figura 11).

Es en la única especie de *Iberomys* donde el cuello, aun siendo de gran amplitud, se puede diferenciar por la presencia de un LRA4 poco marcado, y de mucha menor amplitud que BRA5.

Hábitat actual: Se encuentra en zonas con influencia mediterránea, con cobertera herbácea que se mantenga durante todo el año.

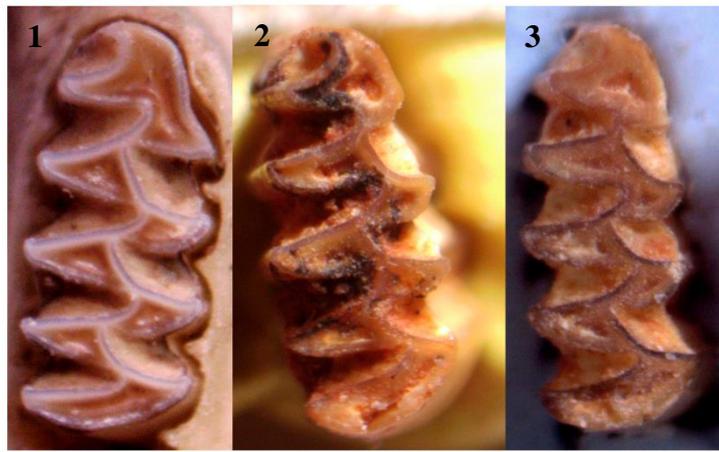


Figura 11. Fotografías de los individuos seleccionados de las especies de *Iberomys*. 1) *Iberomys cabrerae* (Un Castillo, Huesca), 2) *Iberomys mediterraneus* (Gran Dolina, TD10), 3) *Iberomys huescarensis* (Gran Dolina, TD6). Escala 1mm.

Género: *Terricola*, Fatio, 1867

La diferenciación de las distintas especies de *Terricola* es compleja, pero según lo indicado por Brunet-Lecomte, 1990, se pueden diferenciar sobre todo por tres características, dos de ellas correspondientes a la morfología del m1: la inclinación del

segundo rombo pitimiano, presente en todas las especies de *Terricola*, y la abertura de la cúspide anterior. En general las especies de terrícola se corresponden con un clima seco en zonas de prados abiertos, y están relacionadas con temperaturas más cálidas.

Especie: *Terricola atapuerquensis* (Gil, 1996)

Breve descripción: Esta especie extinta del Pleistoceno medio fue definida en 1996 por Gil, siendo su holotipo un primer molar inferior (m1) derecho encontrado en el nivel 11 (TD11/50) del yacimiento Galería. *T. atapuerquensis* se caracteriza por presentar un aspecto asimétrico, con un mayor desarrollo del lado labial, con alternancia de los triángulos T6 y T7, los cuales se encuentran confluyentes, separados de la cúspide anterior por un cuello amplio, y presentan menor tamaño que T4 y T5, que conforman un primer rombo pitimiano imperfecto (Gil, 1996) (Figura 12).

Especie: *Terricola lusitanicus* (Gerbe, 1879)

Breve descripción: El topillo lusitánico, *T. lusitanicus*, presenta tanto el primer como el segundo rombo pitimiano, por tanto, presenta hasta T7 con 5 entrantes linguales. El segundo rombo pitimiano se encuentra parcialmente aislado de la cúspide anterior, dando lugar a un cuello marcado. Al igual que los anteriores *Microtus*, presenta zonas libres de esmalte (Figura 12).

Hábitat actual: Se observa en hábitat de diversas características, pero se relaciona con suelos blandos y húmedos y densa cobertera vegetal.

Especie: *Terricola duodecimcostatus* (Sélys-Longchamps, 1839)

Breve descripción: *T. duodecimcostatus*, conocido como el topillo mediterráneo, es muy similar a *T. lusitanicus*. Estas dos especies se pueden diferenciar por la relación del segundo rombo pitimiano con la cúspide anterior, encontrándose ampliamente comunicados en *T. duodecimcostatus* (Cuenca-Bescós et al., 2008), aun así, se sigue apreciando una morfología de cuello, siendo en este caso mucho menos marcado. *T.*

duodecimcostatus se caracteriza también por presentar un tamaño similar de los triángulos T6-T7 y T4-T5, siendo además T6 y T7 paralelos entre sí (Figura 12).

Hábitat actual: Esta especie se localiza en espacios abiertos con marcada influencia mediterránea, estando condicionada su presencia por suelos estables y húmedos con abundante cobertura vegetal.

Especie: *Terricola pyrenaicus-gerbei* (Gerbe, 1847)

Breve descripción: Se han agrupado las especies *Terricola pyrenaicus* y *Terricola gerbei* debido a las similitudes presentes entre ambas especies. Tanto el topillo de Gerbe como el topillo pirenaico topillo de Gerbe. Esta especie presenta al igual que el resto de las especies de *Terricola* los salientes T4-T5 confluyentes, formando el primer rombo pitimiano, así como la presencia de T6-T7 conformando el segundo, separados de la cúspide anterior por un cuello, con presencia de 5 entrantes linguales. También presenta zonas libres de esmalte y esmalte de tipo *Microtus*.

Por las similitudes entre estas dos especies de topillos hay investigadores que no las diferencian o que tratan a *T. pyrenaicus* como una subespecie de *T. gerbei*, aunque ya en 1880 Gerbe y de'Isle ya los identificaron como dos especies distintas por las diferencias craneales. En lo referente al m1 de estas especies Brunete-Lecomte (2010) indicó que se pueden observar variaciones en la morfología de este molar entre ambas especies, correspondientes a una mayor relación longitud/anchura, una menor inclinación del rombo pitimiano y un complejo anterocónido más abierto en *T. gerbei*. Estas características no se han tenido en cuenta para la realización de este trabajo, razón por la cual se ha decidido no diferenciarlas (Figura 12).

Hábitat actual: Esta especie se corresponde en la actualidad con áreas de montañas/subalpinas, limitadas por factores climáticos (no más de 15°C-16°C de media, y no menos de 1000 mm anuales de precipitación).

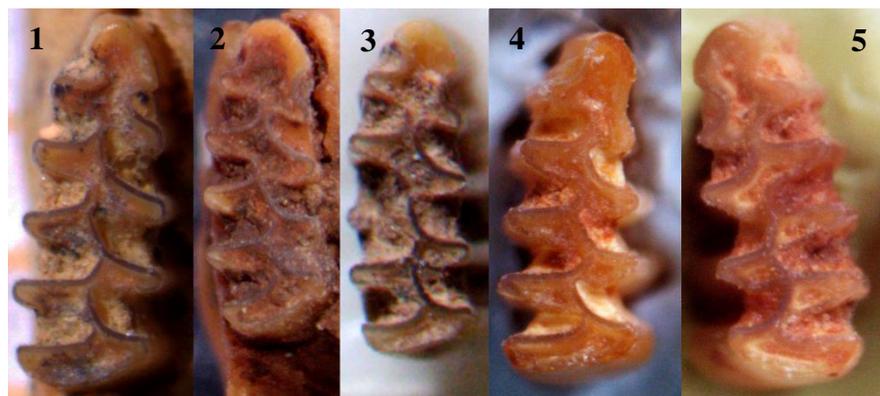


Figura 12. Individuos seleccionados de las especies de *Terricola*. 1) *Terricola pyrenaicus* (Cueva de El Mirón, nivel 130), 2) *Terricola duodecimcostatus* (Galería de las Estatuas, nivel 3), 3) *Terricola lusitanicus* (Galería de las Estatuas, nivel 3-4), 3) *Microtus seseae-Terricola arvalidens* (Gran Dolina, TD6) y 4) *Terricola atapuerquensis* (Gran Dolina, TD10). Escala 1mm.

9. Resultados

9.1 ADN antiguo

Al realizar la PCR con cebadores para el gen mitocondrial 12S (Figura 13), se aprecia que se ha amplificado el fragmento en la mayoría de las muestras analizadas. En los únicos donde no se aprecia esta amplificación es en las muestras 126 y 130, correspondientes a *T. lusitanicus* y *T. pyrenaicus*.

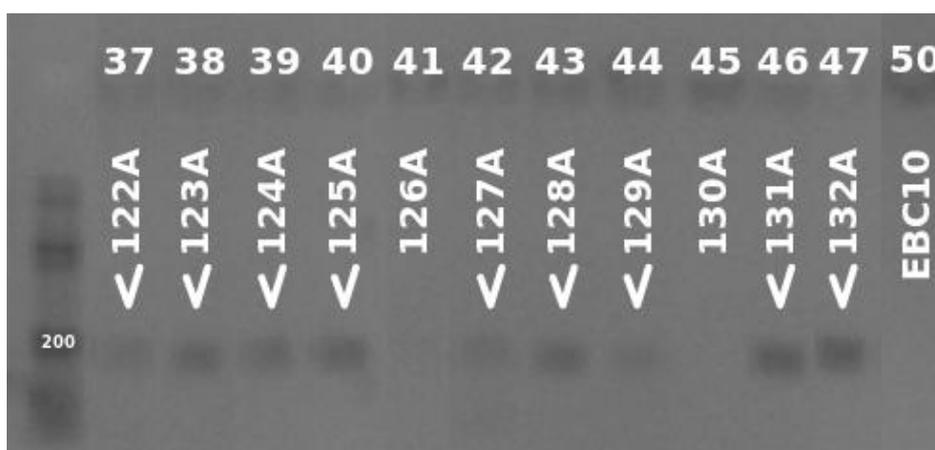


Figura 13. Resultados de la PCR con cebadores para el gen mitocondrial 12S. Se aprecia que la PCR ha dado positiva en todas las muestras menos en la 126 y la 130.

Al visualizar los productos de la primera amplificación de la librería (Figura 14) se observa como la mayoría de las muestras si presentan material alrededor de los 200-100pb. Se aprecia que las muestras 5 y 8, correspondientes a *T. lusitanicus* (N° Laboratorio: 126) y a *Ch. nivalis* (N° Laboratorio: 129), presentan una banda por debajo de los 100 pb, correspondiente muy posiblemente a la presencia de dímeros. También se puede observar como la señal de la muestra 4, correspondiente a *T. duodecimcostatus-lusitanicus* (N° Laboratorio: 125), es muy tenue.

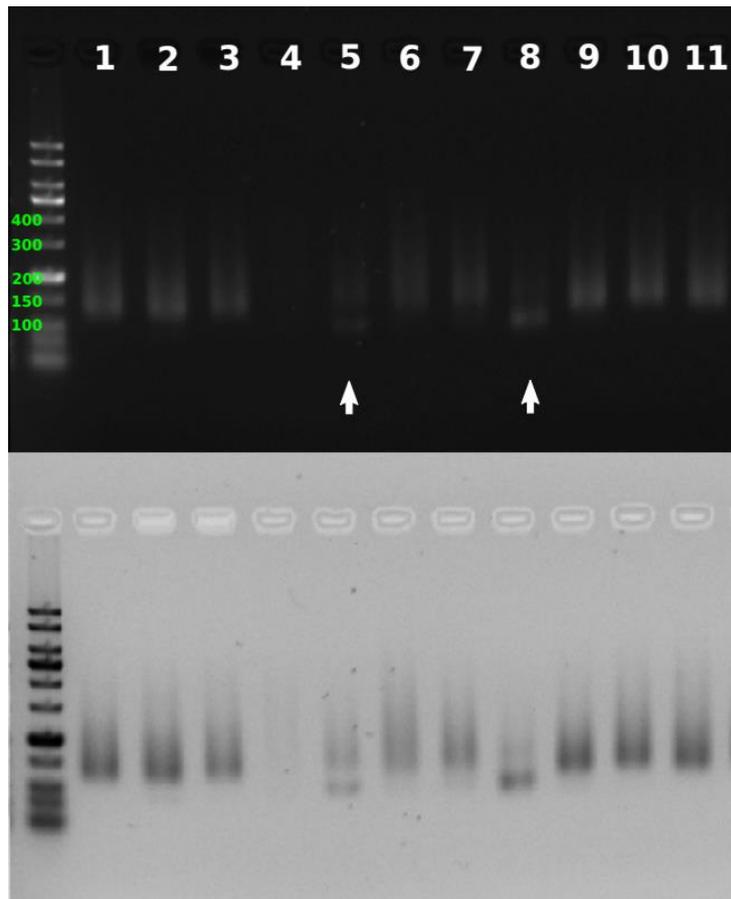


Figura 14. Imagen correspondiente a la visualización de los productos de la primera amplificación de la librería. Se observa la presencia de dímeros en las muestras 5 y 8, así como escaso material genético en la muestra 4.

En los resultados del Bioanalizador (Anexo I) se puede observar que hay presencia de dímeros en algunas de las muestras, apreciables por la presencia de un pico en valores alrededor de los 150pb. En el caso de la muestra de *Ch. nivalis* se observa un pico en los 100pb, y por lo tanto ese valor no se correspondería al dímero formado por los adaptadores Truseq por lo que podría ser algún artefacto de unión de adaptadores.

También se observa la presencia de cadenas unidas entre sí por los adaptadores, distinguible por la presencia de ondulaciones en los electroferogramas (*Daisy chain*) (Anexo I) hacia valores elevados, ocasionadas por un posible exceso del ADN inicial en la reacción de amplificación (Se aprecia en las muestras 122, 124, 127, 130, 131 y 132). Un último problema que se observa en las gráficas es en la muestra 123, en la cual el pico principal se encuentra desdoblado (*bubble*), debido posiblemente también al exceso de ADN en la reacción de amplificación.

Las únicas muestras que presentan resultados adecuados para continuar el proceso según los resultados del Bioanalizador (Anexo I) son las siguientes: *T. duodecimcostatus-lusitanicus* (Nº Laboratorio:125, Nº *Bioanalyzer*: PBA07), *T. lusitanicus* (Nº Laboratorio: 126, Nº *Bioanalyzer*: PBA08) y *M. arvalis* (Nº Laboratorio: 128, Nº *Bioanalyzer*: PBA09). Cabe destacar que la muestra 126, que había dado negativo en la PCR con los cebadores para el gen mitocondrial 12S, parece tener ADN al realizar la cuantificación, aunque cabe la posibilidad de que no se trate de ADN endógeno, y pueda corresponder a ADN bacteriano.

9.2 Caracteres morfológicos

9.2.1 PAST

En el dendograma obtenido (Figura 15) se puede apreciar un cluster, del que la especie *C. glareolus* funciona como *outgroup*, que contiene dos subcluster principales. El subcluster 2 contiene las especies *Iberomys*, y en el subcluster 1 se observan las especies de *Microtus*, *Chionomys*, *Terricola* y *Stenocranius*. En este último subcluster también se han diferenciado otros dos distintos, el 1.1, que contiene las especies de *Terricola*, *M. seseae*, *M. jansoni*, *M. arvalis* y *M. agrestis* y el subcluster 1.2, que contiene el resto de especies estudiadas.

Entrando más al detalle, se puede identificar hasta dos subclusters distintos dentro de cada uno de los ya mencionados. En el subcluster 1.1 se han observado los subclusters 1.1.1 (especies de *Terricola* y *M. seseae*) y 1.1.2 (especies de *M. jansoni*, *M. arvalis* y *M. agrestis*). En el subcluster 1.2 se han diferenciado los subclusters 1.2.1 (*Ch. nivalis* y *M. oeconomus*) y 1.2.2 (*S. gregaloides* y *M. gregalis*).

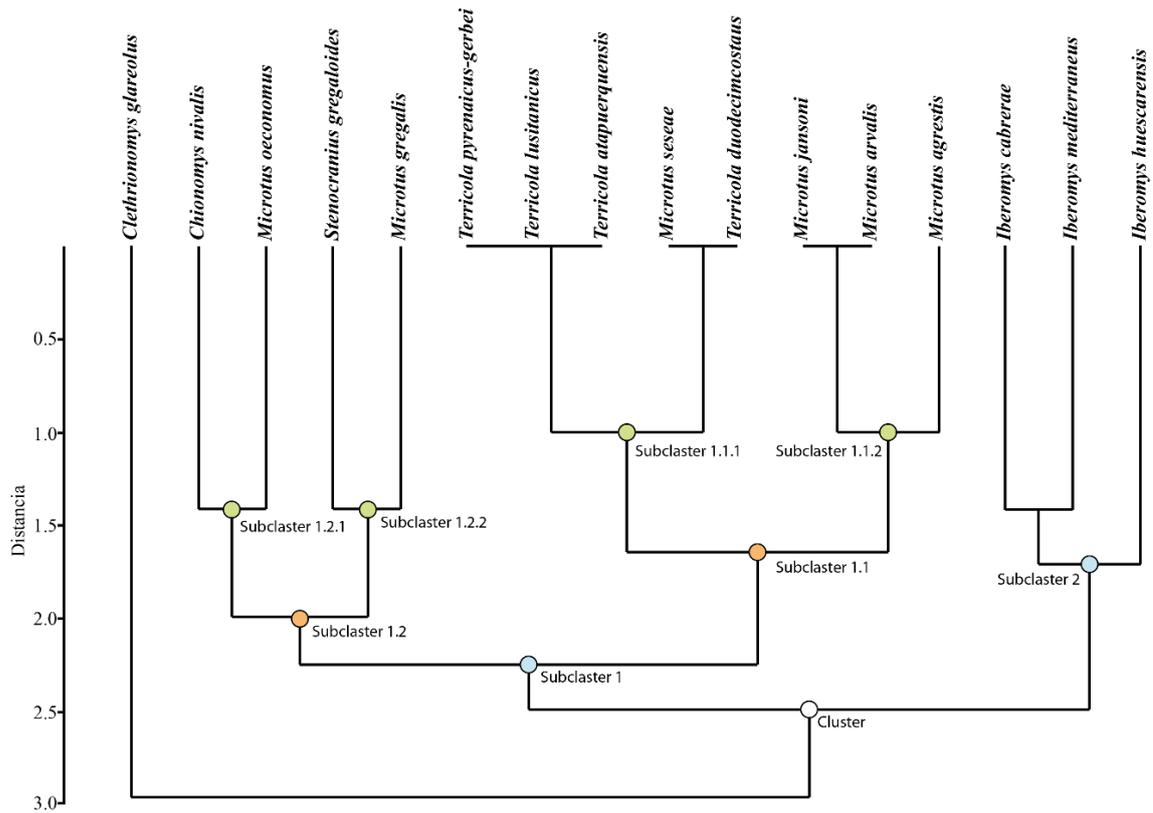


Figura 15. Dendrograma realizado mediante el programa PAST. Se ha indicado mediante círculos los diferentes clusters y subclusters. Se ha identificado un cluster principal, dos subcluster de primer orden, dos de segundo orden y 4 de tercer orden.

9.2.2 TNT

Se puede apreciar como el clado interno de *Microtus* no se encuentra soportado ni por Bootstrap (valores a la izquierda) ni por Bremer (valores a la derecha) (Figura 16).

Las especies de *Terricola* se agrupan en un clado, funcionando como la rama basal del clado de los *Microtus* + *Chionomys*. En este clado también se observa la presencia de *M. seseae*, que como se ha mencionado anteriormente, se ha identificado como *M. seseae* tanto a los individuos de esta especie como de *T. arvalidensis*.

M. oeconomus y *Ch. nivalis* se encuentran formando un clado hermano del formado por el resto de especies de *Microtus s.l.* En este último clado se pueden identificar hasta tres distintos, conformados por *M. gregalis* y *S. gregaloides*, las especies de *Iberomys*, y *M. jansoni*, *M. agrestis* y *M. arvalis*. Este último clado se corresponde con especies agrupadas dentro de las denominadas formas arvaloides (Chaline, 1972).

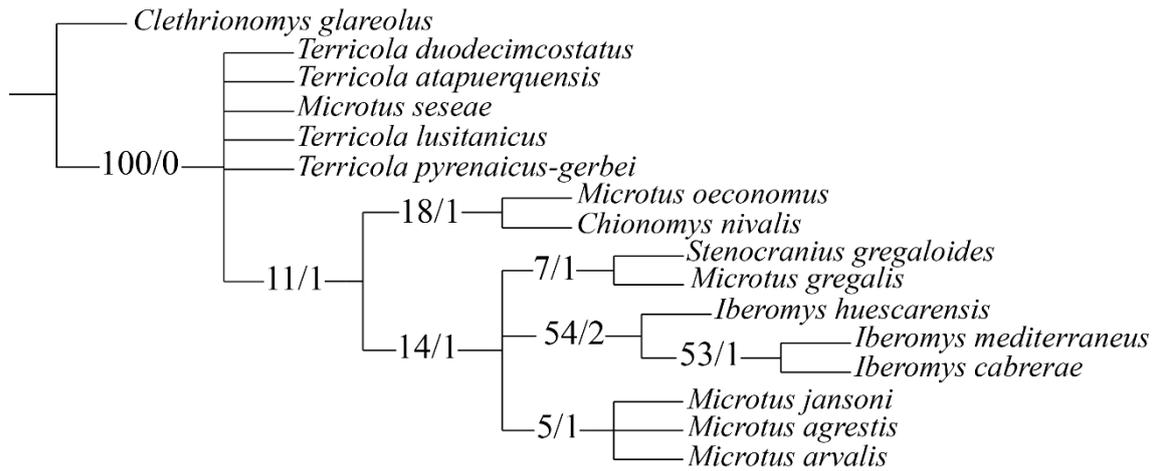


Figura 16. Cladograma realizado por TNT. Se han indicado los valores de soporte de las ramas por Bremer (derecha) y Bootstrap (izquierda).

9.2 Estudio morfométrico

9.2.1 Morfometría geométrica

La mayoría de individuos anómalos (3 de ellos) se relacionaban con las muestras identificadas inicialmente como *T. duodecimcostatus*, pero al no encontrarse agrupadas, sino dispersas y sin presentar ninguna relación, se ha optado por tratarlas como individuos anómalos.

En el resultado final de los análisis se puede observar que en el dendograma realizado (Figura 17) hay presencia de dos clusters principales. En el primero de ellos se encuentran agrupadas las especies de *T. pyrenaicus*, aunque en este mismo hay también presencia de individuos de *T. lusitanicus*. Se observa que la mayoría de especies de *T. pyrenaicus* identificadas se encuentran conformando un subcluster.

En la representación por componentes principales (PC), se distinguen un total de 7/8 PC según el porcentaje de varianza (76/80% respectivamente) (Tabla 5), siendo los dos primeros los que agrupan una mayor cantidad de la misma. Se puede apreciar como los individuos clasificados por *T. pyrenaicus* presentan valores altos del PC1, por el contrario, las especies de *T. lusitanicus* presentan valores de centrales a bajos del PC1, con una gran variabilidad, aun así, este primer componente principal es el que mejor

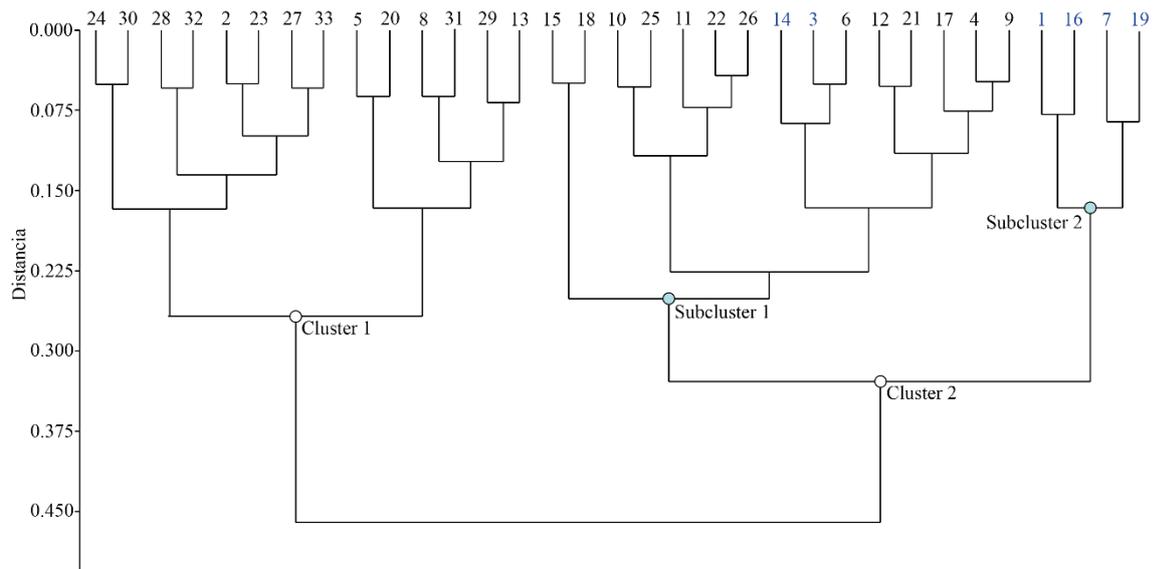


Figura 17. Dendrograma realizado mediante las medidas de morfometría geométrica. Individuos 1-19 pertenecen a La Cueva del Mirón, del 20-33 a La Galería de las Estatuas. Los individuos marcados en azul se corresponden a *T. pyrenaicus*, en negro a *T. lusitanicus*.

representa las diferencias entre las especies. Respecto al PC2 no termina de ser resolutivo para *T. pyrenaicus*, presentándose este mejor agrupado mediante el PC1 y PC7. Las especies de *T. lusitanicus* presentan una elevada diversidad de valores del resto de PC, aunque en la representación PC1-PC2 se puede observar una cierta tendencia a presentar mayores valores de PC1 a mayor sea el de PC2 (Figura 18). Esta tendencia desaparece si se eliminan los landmarks 13 y 14, correspondientes al inicio del cuello entre T4-T5 y T6-T7.

Tabla 5. Valores de Eigenvalue y porcentaje de varianza de los 10 primeros componentes principales (PC).

PC	Eigenvalue	% varianza
1	0.00163613	24,628
2	0.000821927	12,372
3	0.000755148	11,367
4	0.000575963	8,6698
5	0.000447655	6,7384
6	0.000423433	6,3738
7	0.000360293	5,4234
8	0.000295676	4,4507
9	0.000270326	4,0691
10	0.000206015	3,1011

Una de las muestras diferenciadas inicialmente como *T. pyrenaicus* (3) se encuentra más cercana a las muestras identificadas como *T. lusitanicus* (Figura 18), así como no se encuentra en el subcluster que engloba el resto de muestras de *T. pyrenaicus*. A la muestra 14 le sucede similar, pero esta sí que presenta una mayor relación con los demás individuos de *T. pyrenaicus* en las representaciones geométricas de los PC.

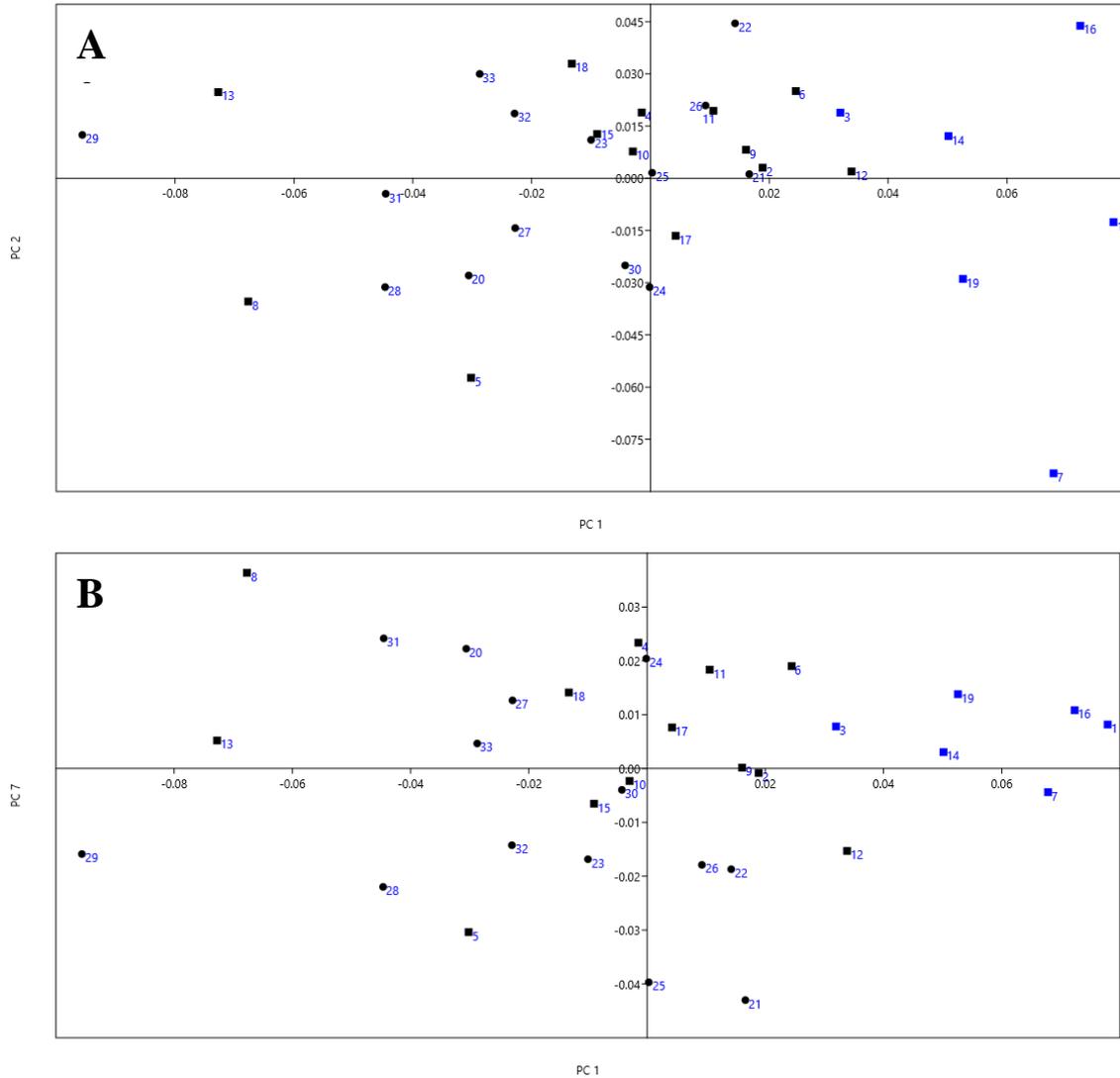


Figura 18. Representación gráfica de las muestras según los componentes principales (PC) 1-2 (A) y 1-7 (B). En azul se encuentran representadas las muestras de *T. pyrenaicus*, en negro las correspondientes a la especie *T. lusitanicus*. Se ha representado mediante un cuadrado las muestras pertenecientes al yacimiento de La Cueva del Mirón, y con un círculo las correspondientes a Galería de las Estatuas.

9.2.2 Morfometría clásica

El Análisis Cluster no aporta información de utilidad, observándose que los individuos de las distintas especies se encuentran entremezclados. Lo que sí se puede observar es una separación según el yacimiento de procedencia (Figura 19).

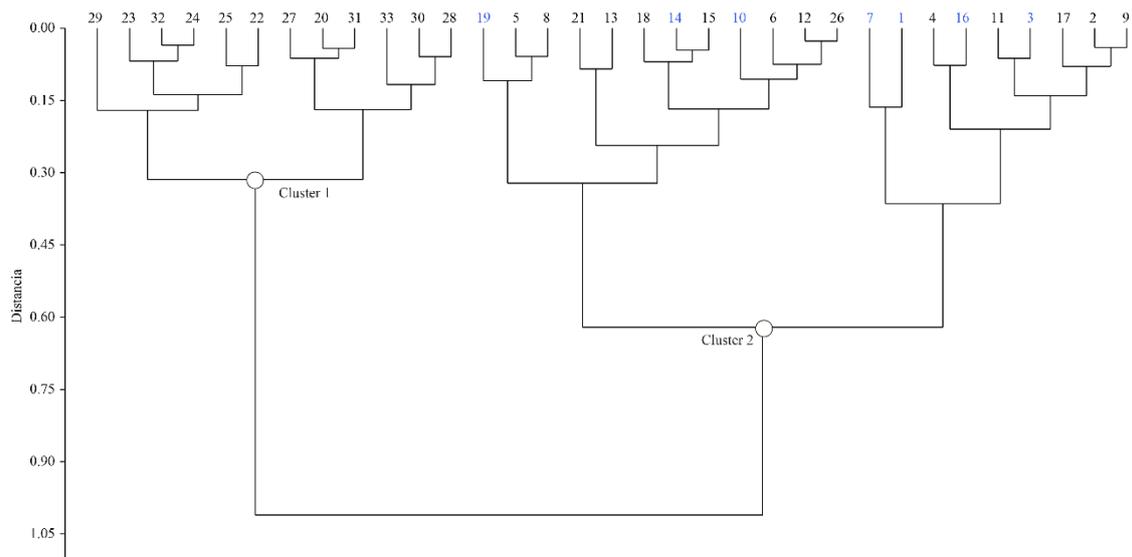


Figura 19. Dendrograma realizado a partir de las medidas lineales e índices de van der Meulen (1973). Individuos 1-19 pertenecen a La Cueva del Mirón, del 20-33 a La Galería de las Estatuas. Los individuos marcados en azul se corresponden a *T. pyrenaicus*, en negro a *T. lusitanicus*.

Al realizar un Análisis Discriminante la clasificación dada no varía sustancialmente. La clasificación dada inicialmente coincide en su mayoría con la aportada con el programa, apreciándose únicamente dos cambios. El individuo 14, clasificado inicialmente como *T. pyrenaicus*, el Análisis Discriminante lo clasifica como *T. lusitanicus*, y la muestra 8 el programa lo clasifica como *T. pyrenaicus* al contrario de la clasificación inicial.

10. Interpretación y discusión

Aunque no se han podido terminar de realizar los análisis paleogenéticos, y por tanto no se puede concluir si los fragmentos de ADN presentes pertenecen en efecto a las especies estudiadas, o por el contrario es contaminación externa tanto antigua como moderna, si se puede observar que estos tipos de muestras, de estos yacimientos y de esta cronología, pueden aportar, a falta de confirmarlo mediante secuenciación, información genética.

Además, se aprecia que aunque en la PCR de cebadores del gen 12S no se produzca la amplificación de dicho gen (Figura 13 y Figura 14), podría darse el caso de que las

muestras tuvieran efectivamente ADN endógeno (e.g., *T. duodecimcostatus-lusitanicus*, muestra 125, y *T. lusitanicus*, muestra 126). La amplificación vía PCR con cebadores 12S podrían haber dado resultados negativos por diferentes razones, ya sea por ausencia del material genético específico a amplificar, por tener un ADN muy fragmentado y de menor tamaño que el de la ampliación o porque por algún motivo se ha inhibido la reacción de amplificación.

En las muestras en las que se observa la presencia de gran cantidad de dímeros, ondulaciones en el electroferograma, así como la presencia de picos dobles, se han repetido las amplificaciones con los adaptadores Truseq (muestras 122, 123, 124, 127, 130, 131 y 132), controlando que la cantidad de ADN inicial no supere los 3.5 ng/reacción. En el caso de la muestra 129 (*Ch. nivalis*), que presenta un marcado pico en el valor de 100 pb, se ha repetido la purificación con las partículas SPRI. Con esto se ha realizado de nuevo la purificación de las PCR, su cuantificación por Qubit, y actualmente se encuentran en espera de ser cuantificadas en el Bioanalizador.

Tanto el dendograma (Figura 15) como el cladograma (Figura 16), realizados por caracteres morfológicos, agrupan por separado las especies de *Iberomys*, *Terricola*, así como las formas arvaloides (*M. arvalis*, *M. agrestis* y *M. jansoni*). Esto indica por tanto una mayor relación, al menos a nivel morfológico, entre dichas especies. También se observa como las especies de *M. oeconomus* y *Ch. nivalis* se encuentran formando un clado, aunque el género *Chionomys* ya ha sido definido como un género aparte del de *Microtus* (Abramson y Lissovsky, 2012). Las especies de *S. gregaloides* y *M. gregalis* también se encuentran relacionadas entre sí tanto por el cladograma como en el dendograma. Como ya ha sido mencionado, *M. gregalis* también se ha agrupado dentro de *Stenocranius*, pero algunos artículos recientes (Abramson y Lissovsky, 2012), sitúan dicha especie no solo en un género distinto de *Microtus*, sino incluso diferente de *Stenocranius*, dentro el género *Lasiopodomys* (Lataste, 1887).

Al observar las diferencias entre el cladograma y el dendograma se puede apreciar como en el segundo las especies de *Iberomys* se encuentran separadas del resto de arvicolinos estudiados, mientras que *Terricola* en este caso se localiza formando un subcluster con las especies de formas arvaloides. En el dendograma, a diferencia que en

el cladograma, las especies *Ch. nivalis*, *M. oeconomus*, *S. gregaloides* y *M. gregalis* forman un subcluster. Esto demuestra que, aunque los análisis fenotípicos aportan información sobre cómo pueden relacionarse las diferentes especies entre sí, la estructura general del dendograma puede acabar variando en comparación a un análisis cladístico.

Mediante la primera aproximación mediante morfometría al estudio del CCA de las especies de *Terricola*, se puede observar que en ningún caso los resultados terminan de ser concluyentes. Mediante la morfometría geométrica se ha podido intuir una separación entre las especies de *T. pyrenaicus* y *T. lusitanicus*, pero todas las muestras se encuentran dentro de la elipse del 95% de confianza. Mediante morfometría clásica no se ha observado esta separación entre especies, pero si se aprecia una clara separación según el origen de las muestras (yacimientos). El Análisis Discriminante sí que comparte en general la clasificación de las especies dada inicialmente.

Las muestras 3 y 14, consideradas al inicio como *T. pyrenaicus* probablemente correspondan a la especie *T. lusitanicus*. Ambas se encuentran separadas del subcluster 2 (Figura 17) donde se agrupan el resto de individuos clasificados como *T. pyrenaicus*. Además, la muestra 3 se encuentra más cercana a las muestras de *T. lusitanicus* que al resto de *T. pyrenaicus* mediante la representación de los componentes principales. La muestra 14 aunque en la figura 18 sí que se encuentra relacionada con los demás *T. pyrenaicus*, el Análisis Discriminante realizado la sitúa como *T. lusitanicus*.

11. Conclusiones

Debido a los diferentes problemas que se han presentado durante la realización de los análisis paleogenéticos, que han conllevado la necesidad de repetir los análisis, así como a la escasez mundial de los materiales necesarios, no se han podido terminar de realizar las secuenciaciones del material genético presente en las muestras. Aun sin saber si el ADN presente se corresponde a las muestras estudiadas o es contaminación, se ha observado que la metodología para la extracción de ADN fósil es aplicable a las

muestras de micromamíferos, y los resultados de dichos análisis se utilizarán en trabajos futuros.

El estudio filogenético, al no presentar soporte en las zonas internas de *Microtus s.l.* + *Ch. nivalis*, remarca la necesidad de realizar estudios complementarios que permitan aclarar la compleja sistemática de *Microtus*. En este análisis la especie de *Ch. nivalis* se localiza con las especies de *Microtus s.l.*, aunque ya se ha demostrado que *Chionomys* se trata de un género distinto, lo que demuestra que no se puede llegar a conclusiones precisas sobre la filogenética de este grupo únicamente mediante los análisis cladísticos.

La aproximación realizada mediante estudios morfométricos no ha terminado de ser resolutive. Se ha observado una cierta tendencia a la separación de las especies mediante la morfometría geométrica, pero la separación entre las dos especies analizadas no es muy marcada. También se ha podido apreciar que los estudios de morfometría clásica realizados son más resolutivos a la hora de separar las muestras según el yacimiento de origen más que por la especie a la que correspondan.

Respecto al posible carácter observado en *T. lusitanicus*, correspondiente a este cuello de gran longitud entre T4-T5 y T6-T7, aunque sí parece que tiene una cierta influencia en cómo se agrupan los individuos en el análisis de morfometría geométrica, haría falta realizar un estudio con una mayor cantidad de muestras y de especies de *Terricola* para apreciar si es característico de esta especie en concreto.

A raíz de todos los resultados obtenidos, y al apreciar la diferente aplicabilidad de las distintas metodologías aplicadas en este Trabajo Fin de Master, he llegado a las siguientes conclusiones:

1. Si las secuenciaciones indican que el ADN extraído pertenece en efecto a ADN fósil de las muestras estudiadas, su estudio y análisis sinérgico con los caracteres morfológicos puede aportar información de utilidad para resolver la compleja filogenia de *Microtus s.l.*

2. Los análisis cladísticos necesitan de estudios complementarios para poder resolver la compleja filogenia de *Microtus s.l.*
3. Los análisis de morfometría realizados en el complejo anterocónido (CCA) aportan información para realizar la separación entre diferentes especies de *Microtus s.l.* con gran similitud entre sus caracteres morfológicos. Aun así, el estudio de landmarks no termina de ser concluyente, y por tanto en trabajos futuros se propone realizar el estudio morfométrico mediante el contorno del CCA.

13. Agradecimientos

Agradezco al Instituto Universitario en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA) por haberme permitido utilizar el Laboratorio de Paleogenómica del IUCA para poder realizar la extracción y librerías del ADN fósil de las muestras estudiadas. También agradecer al laboratorio de genómica funcional del CIBA por prestar sus instalaciones para la realización de los trabajos post-PCR, así como al centro de genómica de la Universidad Complutense de Madrid por prestar sus servicios para el uso del Bionalizador “*Bioanalyzer*” para realizar las amplificaciones de los adaptadores Truseq de Illumina.

Finalmente agradecer a mis directores de TFM, Gloria Cuenca Bescós y Pere Bover Arbós por su ayuda, explicaciones y consejos a la hora de realizar los diferentes análisis y estudios, y para la elaboración de esta memoria de TFM, así como por plantearme este tema de trabajo y aportarme todo el material necesario para su elaboración.

12. Bibliografía

-Abramson, N.I. y Lissovsky, A.A. (2012): Subfamily arvicolinae. En: The Mammals of Russia: a Taxonomic and Geographic Reference, Archive of the Zoological Museum of MSU (Pavlinov, I.Y., Lissovsky, A.A, eds). KMK Scientific Press, Moscow, 52: 220-276.

- Alfaro-Ibañez, M.P. (2020): Análisis integrado de morfología y genética de *Microtus* ibéricos holocénicos. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 25p.
- Arsuaga, J.L., Gómez-Olivencia, A., Sala, N., Martínez-Pillado, V., Pablos, A., Bonmatí, A., Pantoja-Pérez, A., Lira-Garrido, J., Alcázar De Velasco, A., Ortega, A.I., Cuenca-Bescós, G., García, N., Aranburu, A., Ruiz-Zapata, B., José Gil-García, M., Rodríguez-Álvarez, X.P., Ollé, A. y Mosquera, M. (2017): Evidence of paleoecological changes and Mousterian occupations at the Galería de las Estatuas site, Sierra de Atapuerca, northern Iberian plateau, Spain. *Quaternary Research* 88, 345–367.
- Baca, M., Popović, D., Baca, K., Lemanik, A., Doan, K., Ivan Horáček, I., López-García, J.M., Bañuls-Cardona, S., Pazonyi, P., Desclaux, E., Crégut-Bonnoure, E., Berto, C., Lenardić, J.M., Miękina, B., Murelaga, X., Cuenca-Bescós, G., Krajcarz, M. y Marković, Z. (2020): Diverse responses of common vole (*Microtus arvalis*) populations to Late Glacial and Early Holocene climate changes – Evidence from ancient DNA. *Quaternary Science*, 233: 1-13.
- Baena, J., Carrión, E., Ruiz, B., Ellwood, B., Sesé, C., Yravedra, J., Jordá, J., Uzquiano, P., Velázquez, R., Manzano, I., Sánchez-Marco, A. y Hernández, F. (2005): Paleoeología y comportamiento humano durante el Pleistoceno Superior en la comarca de Liébana: La secuencia de la Cueva de El Esquilleu (Occidente de Cantabria, España). Museo de Altamira. Monografías, 20: 461-487.
- Barbosa, S., Paupério, J., Pavlova, S.V., Alves, P.C. y Searle, J.B. (2018): The *Microtus* voles: Resolving the phylogeny of one of the most speciose mammalian genera using genomics, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 125: 85-92.
- Bibi, F., Vrba, E. y Fack, F. (2012): A new African fossil caprin and a combined molecular and morphological bayesian phylogenetic analysis of caprini (Mammalia: Bovidae). *J Evol Biol*, 25, 1843-1854.
- Bover, P., Mitchell, K.J., Llamas, B., Rofes, J., Thomson, V.A., Cuenca-Bescós, G., Alcover, J.A., Cooper, A. y Pons, J. (2018): Molecular phylogenetics supports the origin of an endemic Balearic shrew lineage (Nesiotites) coincident with the Messinian Salinity Crisis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 125, 188–195.

- Bover, P., Llamas, B., Mitchell, K.J., Thomson, V.A., Alcover, J.A., Lalueza-Fox, C., Cooper, A. y Pons, J. (2019): Unraveling tyhe phylogenetic relationships of the extinct bovid *Myotragus balearicus* Bate 1909 from the Balearic Islands. *Quat. Sci. Rev.* 215, 185–195.
- Bremer, K. (1994): Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295–304.
- Brotherton, P., Haak, W., Templeton, J., Brandt, G., Soubrier, J., Adler, C.J., Richards, S.M., Der Sarkissian, C., Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., van Oven, M., Kenyon, R., Van der Hoek, M.B., Korfach, J., Luong, K., Ho, S.Y.W., Quintana-Murci, L., Behar, D.M., Meller, H., Alt, K.W. y Cooper, A., (2013): The Genographic Consortium. 2013. Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origin of Europeans. *Nat. Commun.* 4, 1764-1778.
- Brunet-Lecomte, P. (1990): Evolution morphologique de la premiere molaire inferieure des campagnols Souterrains d'Europe (Arvicolidae, Rodentia). *Z. Säugetierkunde*, 55: 371-382.
- Brunet-Lecomte, P. (2010): Odontometrical divergence in the Gerb's vole *Microtus (Terricola) pyrenaicus gerbei* (Gerbe, 1879) in comparison to the Pyrenean vole *M. (Terricola) pyrenaicus* (e Sélys Longchamps, 1947) (Mammalia: Rodentia: Arvicolinae). *Vertebrate Zoology*, 60: 243-248.
- Campaña, I., Pérez-González, A., Benito-Calvo, A., Rosell, J., Blasco, R., Bermúdez de Castro, J.M., Carbonell, E. y Arsuaga, J.L. (2016): New interpretation of the Gran Dolina-TD6 bearing *Homo antecessor* deposits through sedimentological analysis. *Sci. Rep.* 6 (34799): 1-13.
- Chaline, J. (1972): Les rongeurs du Pleistocène moyen et supérieur de France. *Cahiers de Paléontologie CNRS*, 1-410.
- Chaline, J. y Graf, J.D. (1988): Phyogeny of the Arvicolidae 8Rodentia): Biochemical and paleontological evidence. *J. Mammal*, 69: 22-23.
- Chaline, J., Brunet-Lacomte, P., Montuire, S., Viriot, L. y Courant, F. (1999): Anatomy of arvicoline radiation (Rodentia): paleogeographical, paleoecological history and evolutionary data. *Ann. Zool. Fennici*, 36: 239-267.

- Cuenca-Bescós, G., Canudo, J.I., y Laplana, C. (1995): Los arvicólidos (Rodentia, Mammalia) de los niveles inferiores de Gran Dolina (Pleistoceno inferior, Atapuerca, Burgos, España). *Revista Española de Paleontología*, 10 (2): 202-218.
- Cuenca-Bescós, G., Laplana, C. y Canudo, J.I. (1998): Biocronological implications of the Arvicolidae (Rodentia, Mammalia) from the Lower Pleistocene hominid-bearing level of Trinchera Dolina 6 (TD6, Atapuerca, Spain). *Journal of Human Evolution*, 37: 353-373.
- Cuenca-Bescós, G., Canudo, J.I., y Laplana, C. (2001): La séquence des rongeurs (Mammalia) des sites du Pléistocène inférieur et moyen d'Atapuerca (Burgos, Espagne). *L'Anthropologie*, 105: 15-130.
- Cuenca-Bescós, G. y García. N. (2007): Biostratigraphic succession on the Early and Middle Pleistocene mammal's faunas of the Atapuerca cave site (Burgos, Spain). *Courier Forschung-Institut Senckenberg*, 259: 99–110.
- Cuenca-Bescós, G., Strauss, L. G., González Morales, M. R. y García Pimienta, J. C. (2008): Paleoclima y paisaje del final del cuaternario en Cantabria: Los Pequeños mamíferos de la cueva del Mirón (Ramales de la Victoria). *Revista Española de Paleontología*, 23 (1): 91-126.
- Cuenca-Bescós, G., Rofes, J., López-García, J.M., Blain, H.A., De Marfa, R.J., Galindo-Pellicena, M.A., Bennásar-Serra, M.Ll., Melero-Rubio, M., Arsuaga, J.L., Bermúdez de Castro, J.M. y Carbonell, E. (2010): Biochronology of Spanish Quaternary small vertebrate faunas. *Quaternary International*, 30: 1-11.
- Cuenca-Bescós, G., Melero-Rubio, M., Rofes, J., Martínez, I., Arsuaga, J.L., Blain, H.A., López-García, J.M., Carbonell, E. y Bermudez de Castro, J.M. (2011): The Early–Middle Pleistocene environmental and climatic change and the human expansion in Western Europe: A case study with small vertebrates (Gran Dolina, Atapuerca, Spain), *Journal of Human Evolution*, 60: 481-491.
- Cuenca-Bescós, G., López-García, J., Galindo-Pellicena, M., García-Perea, R., Gisbert, J., Rofes, J. y Ventura, J. (2014): The Pleistocene history of *Iberomys*, an endangered endemic rodent from South Western Europe. *Integrative Zoology*, 9: 481-497.

- Cuenca-Bescós, G., Blain, H.A., Rofes, J., López-García, J.M., Lozano-Fernández, I., Galán, J. y NíñezLahuerta, C. (2016): Updated Atapuerca biostratigraphy: Small-mammal distribution and its implications for the biochronology of the quaternary in Spain. *Comptes Rendus Palevol*, 15 (6): 621- 634.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J.L. y Meyer, M. (2013): Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15758–15763.
- Fagoaga, A. (2020): Estudio paleoambiental de la región central del Mediterráneo ibérico durante el Pleistoceno a partir de las faunas de microvertebrados de los yacimientos de El Salt y Abric del Pastor (Alcoi, Alicante). Tesis Doctoral, Univ. de Valencia, 259p.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- García, M., González Morales, M.R. y Straus, L.G. (2012): El grafismo rupestre paleolítico de la cueva de El Mirón (Ramales de la Victoria, Cantabria, España): una propuesta para su datación estratigráfica. *Trabajos de Prehistoria*, 69: 21-36.
- Gerbe, Z. y L'Isle, A. (1880): Description d'une nouvelle espèce de campagnol de France. *Soc Zool. Fr.*, 5: 49 – 61.
- Giebel, C.G. (1847): Fauna der Vorwelt mit steter Berücksichtigung der lebenden Thiere. *Brodhaus 1, Leipzig*, 1–553p.
- Gil, E. (1996): *Terricola atapuerquensis* (arvicolidae, rodentia) nueva especie en el Pleistoceno medio de Atapuerca (Burgos, España). *Geogaceta*, 20: 250-252.
- Gil, E. (1997): Los micromamíferos del tránsito Pleistoceno inferior-medio de Atapuerca (Burgos, España). Implicaciones bioestratigráficas y evolutivas. *Geogaceta*, 22: 73-76.
- Goloboff P.A. y Catalano, S.A. (2016): TNT versión 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics*, 32: 1-18.

- Graf, J.D. (1982): Génétique biochimique, taxonomie et evolution des Arvicolidae (Mammalia, Rodentia). Rev. suisse. Zool., 89: 749-787.
- Graf, J.D. y Scholl, A. (1975): Variations enzymatiques et relations phylétiques entre neuf espèces de Microtinae (Mammalia, Rodentia). Rev. Suisse. Zool., 82: 681-687.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. y Paul D.R. (2001): Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica, 4, artículo 4: 1-9.
- Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., Nordenfelt, S., Valdiosera, C., Richards, S.M., Rohrlach, A., Barreto Romero, M.I., Flores Espinoza, I., Tomasto Cagigao, E., Watson Jiménez, L., Makowski, K., LeBoreiro Reyna, I.S., Mansilla Lory, J., Ballivián Torrez, J.A., Rivera, M.A., Burger, R.L., Ceruti, M.C., Reinhard, J., Wells, R.S., Politis, G., Santoro, C.M., Standen, V.G., Smith, C., Reich, D., Ho, S.Y.W. Cooper, A. y Haak, W. (2016): Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. Sci. Adv. 2, 1-10.
- López-García, J.M. (2008): Evolución de la diversidad taxonómica de los micromamíferos en la Península Ibérica y cambios Paleoambientales durante el Pleistoceno Superior. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, 368p.
- Luzi, E. (2018): Morphological and morphometric variations in Middle and Late Pleistocene *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* populations: chronological insight, evolutionary trends and palaeoclimatic and palaeoenvironmental inferences. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, 138p.
- Macqueen, P., Seddon, J.M., Austin, J.J., Hamilton, S. y Goldizen, A.W. (2010): Phylogenetics of the pademelons (Macropodidae: Thylogale) and historical biogeography of the Australo-Papuan region. Mol. Phylogenet. Evol. 57, 1134–1148.
- Maul, L.C. y Markova, A.K., (2007): Similarity and regional differences in Quaternary arvicolid evolution in Central and Eastern Europe. Quaternary International 160, 81–99.

- Meyer, M. y Kircher, M. (2010): Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 1–10.
- Miller, G.S. (1908): The recent voles of *Microtus nivalis* group. *Ann. Mag. nat. Hist.*, 8: 97-103.
- Olivé, A., Ramírez, J.I. y Ortega, L.I. (1987): Mapa Geológico de España 1:50.000, hoja nº 201 (Belorado) y memoria. IGME, Madrid. 40 p.
- Ortega, A.I. (2009): La evolución geomorfológica del karst de la Sierra de Atapuerca (Burgos) y su relación con los yacimientos pleistocenos que contiene. Tesis Doctoral, Universidad de Burgos, 624p.
- Ortega, A.I., Pérez, A., Benito, A. y Martín, M.A. (2011): El Karst de la Sierra de Atapuerca. Estudio Geomorfológico. *Cubía Boletín del Grupo Espeleológico Edelweiss*, 15: 70-88.
- Ortega, A.I., Benito Calvo, A., Pérez-González, A. Carbonell, E., Bermúdez de Castro, J.M. y Arsuaga, J.L. (2014): Atapuerca Karst and its Palaeoanthropological Sites. En: *Landscapes and Landforms in Spain, World Geomorphological Landscapes* (Gutiérrez, F., y Gutiérrez, M, eds). Springer Science+Business Media, Dordrecht 7: 101-110.
- Pal'Chekh, N.A., Mal'Kova, M.G., Kuz'Min, I.V. y Yakimenko, V.V. (2003): The Structure of Narrow-Skulled Vole (*Microtus gregalis* Pall.) Colonies in Western Siberia. *Russian Journal of Ecology* 34, 327–331.
- Palomo, L. J., Gisbert, J. y Blanco, J. C. (2007): Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid, 588p.
- Parés, J.M. y Pérez-González, A. (1995): Paleomagnetic ages for hominids at Atapuerca Archaeological site, Spain. *Science*, 269: 830–832.
- Pineda, A. y Arce, J.M. (1990): Mapa Geológico de España 1:50.000, hoja nº 200 (Burgos) y memoria. IGME, Madrid. 89 p.

- Pokines, J.T. (1998): The paleoecology of Lower Magdalenian Cantabrian Spain. *Bar International Series*, 713: 1-189.
- Portero, J.M., Ramírez, J., Olmo, P., Aguilar, M.J. y Martín, J.M. (1978): Mapa Geológico de España 1:50.000, hoja nº 60 (Valmaseda) y memoria. IGME, Madrid. 39 p.
- Rofes, J. (2014): Los microvertebrados y el registro fósil, sistemática, biogeografía, biocronología y reconstrucciones paleoambientales. En: *New Insights on Ancient Life. XII EJIP Sobrarbe* (Comité organizador del XII EJIP, eds): 17-21.
- Rohlf, F.J. (2015): The Tps series of software. *Hystrix*, 26: 1-4.
- Ruiz Bustos A. (1988): Estudio sobre los arvicólidos cuaternarios. *Paleomammalia*, 2: 1-89.
- Straus, L.G. y González Morales, M. (2003): El Mirón Cave and the 14C Chronology of Cantabrian Spain. *Radiocarbon* 45, 41-58
- Straus, L.G. y González Morales, M. (2019): The Upper paleolithic sequence in el Mirón Cave (Ramales de la Victoria, Cantabria, Spain): An overview. *Journal of Archaeological Sciences: Reports*, 27: 1-18.
- Signor, P.W. III. y Lipps, J.H. (1982): Sampling bias, gradual extinction patterns and catastrophes in the fossil record. *Geological Society of America Special Paper*, 190: 291-296.
- van der Meulen, A. (1973): Middle Pleistocene smaller Mammals from the Monte Peglia (Orvieto, Italy), with Special Reference to the Phylogeny of *Microtus* (Arvicolidae, Rodentia). *Quaternaria*, 17: 1-144.