



**Universidad**  
Zaragoza



**Trabajo de Fin de Grado  
de la Universidad de  
Zaragoza**

# ANÁLISIS INTEGRADO DE MORFOLOGÍA Y GENÉTICA DE MICROTUS IBÉRICOS HOLOCÉNICOS

**Alumna:**

M<sup>a</sup> Pilar Alfaro Ibañez

**Directores:**

Gloria Cuenca-Bescós

Pere Bover Arbós

**Curso:** 2019/2020

## **Índice:**

<b>1. Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>3. Planteamiento y objetivos .....</b>	<b>2</b>
<b>4. Localización geográfica y geológica .....</b>	<b>3</b>
<b>4.1 Localización geográfica.....</b>	<b>3</b>
<b>4.2 Localización geológica.....</b>	<b>4</b>
<b>5. Descripción y geología de los yacimientos .....</b>	<b>4</b>
<b>6. Sistemática y metodología.....</b>	<b>8</b>
<b>6.1 Sistemática .....</b>	<b>8</b>
<b>6.2 Metodología.....</b>	<b>11</b>
<b>6.2.1 Metodología correspondientes a los análisis filogenéticos .....</b>	<b>11</b>
<b>6.2.2 Metodología correspondiente a los análisis de los caracteres morfológicos .....</b>	<b>13</b>
<b>6.2.3 Metodología correspondiente a los análisis combinados.....</b>	<b>14</b>
<b>7. Resultados .....</b>	<b>15</b>
<b>7.1 Resultados análisis citocromo b (cytb) .....</b>	<b>15</b>
<b>7.2 Resultados análisis morfológico .....</b>	<b>16</b>
<b>7.3 Resultados del análisis conjunto genético-morfológico.....</b>	<b>17</b>
<b>8. Discusión de los resultados .....</b>	<b>19</b>
<b>9. Conclusions .....</b>	<b>20</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>22</b>
<b>11. Anexos .....</b>	<b>26</b>

## 1. Abstract

Fossil voles (Arvicolinae, Rodentia) of the genus (or subgenus, depending of the authors) *Microtus*, *Iberomys*, *Terricola*, are essential in Quaternary biostratigraphy. In this work, different trees depicting the phylogeny of 13 species of modern common vole, currently present in the Iberian Peninsula, will be presented. The fossil material studied in this work are the result of the excavations of the archaeo-paleontological sites of the Sierra de Atapuerca (Burgos), and in the Cueva Del Mirón (Cantabria). The fossils are the isolated first lower molars (m1) of the different studied species.

An analysis of the genetic sequences of these species, corresponding in this case to the mitochondrial cytochrome b (cytb), is carried out, as well as the study of 17 different morphological traits in the occlusal surface, roots and lateral surfaces of the m1. With these data, first separately and secondly combined, the most probable tree has been inferred using different analyses and including the statistical support of the branches and nodes. For its elaboration, it has been necessary to learn how to use different cladistics and phylogeny programs, which use different types of support analysis.

As different types of analysis are used, it is possible to compare the different levels of support of each method, as well as the variations in the distribution of the species in the obtained trees, according to the analysis used. Furthermore, since analyses are carried out first using only morphological or genetic characters, and finally combining both types of data, it has been possible to observe the variability in the node support level and topology of the trees inferred, depending on the data used.

It has been observed that the addition of the set of genetic data to the morphological matrix, results in an increase in the level of support of the nodes. This can be observed in the value obtained with the Bremer support analysis, which presents well supported values when the genetic data were added. However, this result is not observed in the Bootstrap and in the Posterior Probability (PP) value, in which the support remains similar.

In all the results presented in this work, there is one fact that remains constant: the phylogeny of the Iberian modern common voles, used in this study, is far from being fully resolved. These results present a high controversy in the deep phylogeny of the group using both morphological and molecular data, and additional data would be necessary to fully resolve the topology of the trees presented.

## 2. Introducción

Los restos fósiles de los topillos actuales pertenecientes a los géneros (o subgéneros según los autores), *Microtus*, *Iberomys*, *Terricola*, de la subfamilia Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia) son la herramienta básica utilizada para las dataciones bioestratigráficas en medios continentales de edad Cuaternaria, así como para las reconstrucciones paleogeográficas, paleoambientales y paleoclimáticas durante el Cuaternario (Cuenca-Bescós et al., 2010, 2016; Fagoaga, 2020). Esto es así ya que sus dientes presentan una morfología propia de cada especie, especialmente el primer molar inferior (m1).

A partir de ahora, llamaremos *Microtus sensu latu* (*Microtus s.l.*) a los topillos ibéricos holocenos y actuales cuando nos estemos refiriendo en general a este grupo de roedores de edad holoceno-actual.

La diferenciación de las especies en la sistemática paleontológica de arvicolinos se realiza por la morfología dental, desde el momento en el que aparece el primer representante de esta subfamilia de roedores, *Allophaiomys*, hace aproximadamente 2 millones de años (Ma) (van der Meulen, 1973;

Chaline et al., 1999), momento a partir del cual los topillos han tenido una radiación evolutiva muy rápida, así como una amplia distribución en el hemisferio norte, adaptándose a diferentes tipos de ambientes.

Esta especialización a distintos entornos, así como su rápida tasa evolutiva en un corto periodo espacio-temporal, los hace unos excelentes fósiles guía, así como hace que su estudio sea una buena herramienta para diferentes investigaciones, como para conseguir tener un mejor entendimiento del fenómeno de especiación desde el origen al final de un linaje, entre otros estudios. Esta clase de análisis no se podrían llevar a cabo, o serían más complejos de realizar, con tasas de radiación evolutiva más bajas, o en un periodo más amplio de tiempo (Chaline et al., 1999).

Esta rápida evolución no solo se aprecia morfológicamente, sino también genéticamente. Por dicha razón, resulta interesante comparar los cladogramas y árboles filogenéticos que se obtendrían contrastando dichos caracteres, así como realizando un análisis conjunto de los mismos. Esta metodología, consistente en analizar de forma conjunta los caracteres genéticos y morfológicos, no se había realizado hasta ahora con los arvicolinos.

En adición, ha habido controversia en lo referente a la sistemática y taxonomía de estos roedores. Esto es debido igualmente a su alta tasa evolutiva. Siendo así, hay subgéneros que algunos investigadores consideran que deberían ser elevados al nivel de género. (Abramson and Lisovsky, 2012; Cuenca-Bescós et al., 2014 y literatura allí mencionada).

### 3. Planteamiento y objetivos

Esta memoria se corresponde a un Trabajo de Fin de Grado de Geología de la Universidad de Zaragoza, correspondiente al Departamento de Ciencias de la Tierra. Por dicha razón, en este trabajo se van a poner de manifiesto los conocimientos y habilidades obtenidas durante el tiempo en el cual se ha cursado dicho Grado.

En este trabajo se van a emplear las herramientas de sistemática filogenética o cladística para ver las relaciones de parentesco de los diferentes *Microtus s.l.*, utilizando tanto los caracteres morfológicos como los genéticos de las especies estudiadas, siendo la primera vez que se analizan de forma conjunta dichos caracteres en arvicolinos.

Para ello se han analizado 17 caracteres correspondientes a los m1 (primer molar inferior) de las 13 especies de arvicolinos actuales de la Península Ibérica, cuyos restos fósiles se han obtenido de los niveles holocenos de los yacimientos de la Sierra de Atapuerca (Burgos) y los de la Cueva del Mirón (Cantabria), para la realización de una matriz de caracteres. Dichos datos se combinarán con las secuencias de ADN mitocondrial correspondientes al citocromo b (cytb) de cada una de las especies.

Con estos datos, se va a realizar una evaluación de los caracteres morfológicos de *Microtus s.l.* en comparación a la filogenia molecular, con el objetivo de apreciar si las herramientas de clasificación genética y morfológica se pueden aunar para aplicar a los estudios de paleontología de pequeños vertebrados (microvertebrados). Concretamente en este trabajo, se pretende comprobar su eficacia a la hora de realizar la clasificación de los roedores, observando si este procedimiento refuerza o debilita las clasificaciones actuales. Esto es importante debido a que los roedores tienen, como hemos dicho, un gran valor como herramienta bioestratigráfica, siendo utilizados tanto para estudios de la geología del Cuaternario, como en estudios arqueológicos de datación y reconstrucción paleoambiental en relación con la presencia humana.

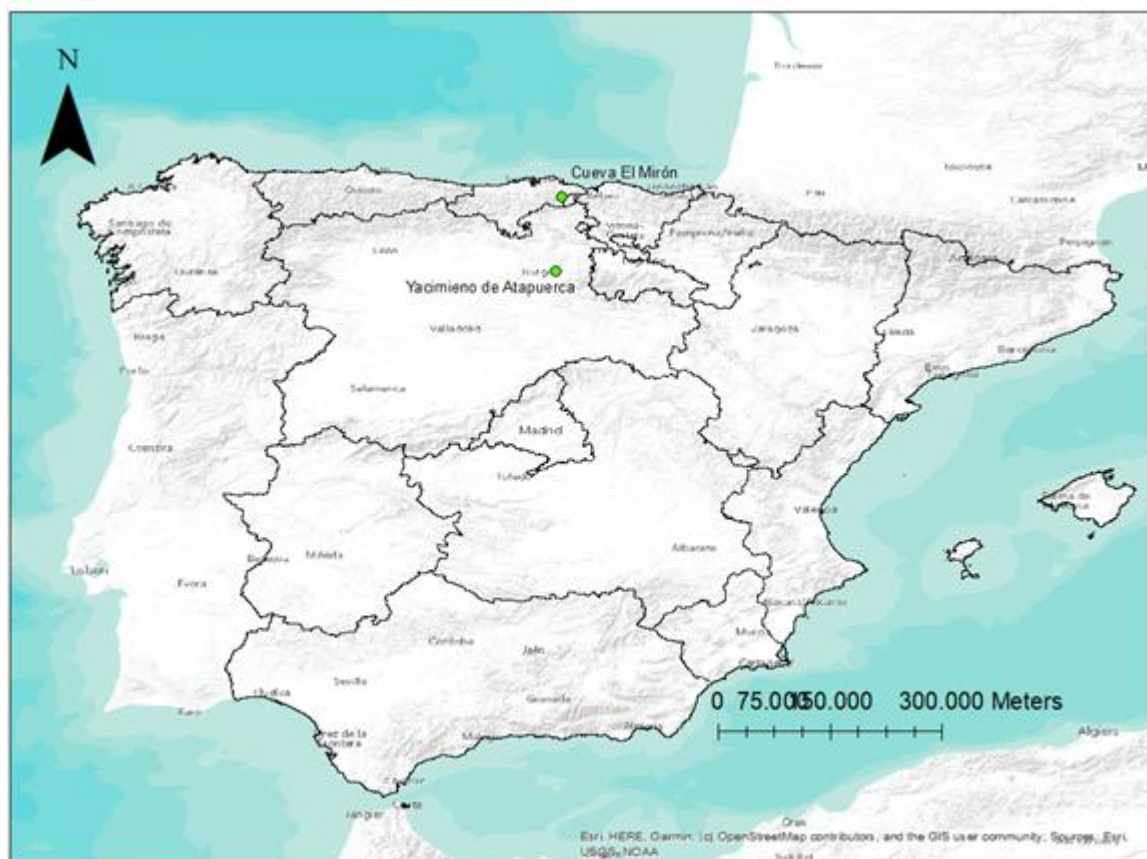
## 4. Localización geográfica y geológica

### 4.1 Localización geográfica

Los fósiles de las especies estudiadas se encuentran presentes en yacimientos arqueológicos y paleontológicos de la Sierra de Atapuerca, y en el yacimiento de la Cueva del Mirón. Ambos emplazamientos se encuentran al norte de la Península Ibérica.

La Sierra de Atapuerca se encuentra en las cercanías de Burgos, a unos 15 km al este de la misma (Fig. 1), al noreste de la provincia de Castilla y León, encontrándose delimitada por el río Arlanzón al sur, y por la Cordillera Cantábrica al norte.

El yacimiento de la Cueva del Mirón, se encuentra localizado en la Cordillera Cantábrica, cerca del límite este de la provincia de Cantabria. Dicha cueva se encuentra localizada cerca de la localidad de Ramales de la Victoria, concretamente a unos 2km al sureste de la misma, en lo que sería el valle del Río Asón. (Fig. 1).



**Figura 1.** Localización geográfica de los yacimientos de la Sierra de Atapuerca y de la Cueva del Mirón. Imagen realizada mediante ArGis, con imagen base de libre acceso de Esri.

## **4.2 Localización geológica**

La Sierra de Atapuerca, está constituida por materiales pertenecientes al Cretácico Superior, recubiertos por una cobertera de materiales cuaternarios. Esta sierra se trata de un monte mesozoico, con origen en la orogenia Alpina, relacionado con el sistema de la Cordillera Ibérica.

Este sistema constituye la rama más al norte de la citada cordillera, con una dimensión de 12km<sup>2</sup> y hasta 1.085 m de alto. El punto más alto se corresponde con la Colina de San Vicente, caracterizada por presentar cuatro superficies de erosión que dan lugar a dicha meseta, en la cual se localiza el sistema de cuevas que constituye estos yacimientos. (Ortega et al., 2014)

Además, esta sierra se encuentra en el paso entre la cuenca del Ebro y la cuenca del Duero, concretamente en el sector noreste de esta última, en el denominado corredor de Bureba. (Ortega et al., 2014, Cuenca-Bescós et al., 2009a)

La Cueva del Mirón, se encuentra en un sistema montañoso de origen Alpino, que se corresponde con el “Pirineo Vasco-Cantábrico”. La zona donde se encuentra también se trata de un sistema kárstico, concretamente, formando parte del sistema kárstico del Monte Pando, caracterizado por tener varias cuevas con yacimientos arqueológicos, paleontológicos y pinturas rupestres (Cuenca-Bescós et al., 2012, Iriarte-Chiapuso et al., 2015).

La entrada de este sistema kárstico se encuentra en la cara oeste de dicho monte (Marín-Arroyo, 2007; García, González y Straus, 2012), constituido por calizas del Cretácico, correspondientes a las facies Urgon.

## **5. Descripción y geología de los yacimientos**

### **Yacimientos de la Sierra de Atapuerca**

Los yacimientos de la Sierra de Atapuerca se encuentran localizados en el interior de un sistema kárstico dentro de la propia Sierra, desarrollándose en los 40-70 metros de potencia que presentan las calizas y dolomías del Cretácico Superior (Ortega et al., 2014).

Este sistema se encuentra relleno de materiales Cuaternarios, los cuales contienen los restos fósiles que han sido arrastrados hasta el interior desde la cobertera del sistema montañoso. Cabe destacar la presencia de restos de origen orgánico, procedentes de la actividad de predadores (Cuenca-Bescós, Canudo y Laplana, 1995), como por ejemplo, restos de microvertebrados en egagrópilas.

Dicho sistema de cuevas fue descubierto a inicios del siglo XX, cuando se construyó la trinchera para un ferrocarril, zona ahora conocida como Trinchera del Ferrocarril, que atravesó las calizas del flanco suroeste de la Sierra de Atapuerca. (Ortega et al., 2014).

La gran cantidad de hallazgos de restos de homínidos fue la principal razón por la cual dichos yacimientos se hicieron conocidos. Sin embargo, su contenido a nivel paleontológico de otros taxones es también de gran importancia, al encontrarse en el paso entre dos cuencas sedimentarias, tratándose por tanto de un importante emplazamiento para la vía migratoria entre el Mediterráneo y el Atlántico. (Cuenca-Bescós et al., 2009a).

Este sistema kárstico presenta 4.7 km de zonas exploradas (Ortega et al., 2014), los cuales se encuentran divididos en tres principales sistemas de cuevas: El Mirador, Cueva Mayor, y Trinchera del Ferrocarril o La Trinchera (Fig. 2).

Según indicó Vergés et al. (2002), la zona de El Mirador, constituye una de las mejores secuencias del Holoceno de la Península Ibérica. La zona de la Cueva Mayor, presenta entre sus yacimientos el correspondiente a la Sima del Elefante, sin embargo, este se encuentra expuesto en la zona de La Trinchera, en una parte del recorrido del antiguo ferrocarril. Por dicha razón la Sima del Elefante es en realidad parte de esta tercera zona, al igual que los yacimientos de la Gran Dolina y Galería.



**Figura 2.** Localización de las diferentes zonas que constituyen el sistema kárstico de la Sierra de Atapuerca, así como los diferentes yacimientos que se localizan en cada una de las zonas. Imagen tomada de Cuenca-Bescós et al. (2009a).

La riqueza de estos yacimientos en fósiles de micromamíferos es tal, con un registro prácticamente continuo desde el Pleistoceno inferior hasta la actualidad, que permite establecer una serie de unidades faunales (F.U) equiparables con las biozonas de la estratigrafía continental de la Península Ibérica (Fig. 3). Dicha biozonación se puede comparar con la observada en otros yacimientos en Europa, tales como la cueva de Kozarnika (Bulgaria) o Kärlich (Alemania), permitiendo así su comparación con la bioestratigrafía europea. (Cuenca-Bescós, 2018).

Las diferentes biozonas mencionadas se definen según los momentos de primera o última aparición de determinadas especies en el registro estratigráfico, así como por la presencia de una determinada asociación de especies en cada una de las biozonas. (Cuenca-Bescós, 2018).

Las biozonas definidas según los restos de micromamíferos son las mencionadas a continuación (Cuenca-Bescós et al., 2010, 2016). En este caso, solo se va a mencionar las asociaciones de arvicolinos:

-*Allophaiomys pliocaenicus*: El límite inferior está marcado por la primera aparición en el registro de esta especie, mientras que el límite superior se corresponde con el último registro de la misma, así como el primer registro de *Allophaiomys lovacati*. Esta biozona también está caracterizada con la desaparición de las especies de *Mimomys* en la Península Ibérica, a excepción de *M. savini*.

-*Allophaiomys lovacati*: Delimitada en su límite superior por la primera aparición de *Allophaiomys lovacati*, así como por la aparición de *A. nutiensis*, *A. burgodiae* y *C. rivas*. El límite superior está marcado por el último registro de las especies mencionadas.

-*Victoriamys chalinei*: El límite inferior de esta biozona está marcado por la primera aparición de las siguientes especies de arvicolidos: *V. chalinei*, *S. gregaloides*, *T. arvalidens*, *M. seseae*, *M. savini*, *M. huescarensis*, *P. episcopalis*. El límite superior se corresponde con el último registro de *P. episcopalis*, *M. savini* y *M. huescarensis*.

-*Unnamed*: Esta biozona, actualmente sin nombre, se corresponde al intervalo desde la desaparición de las especies mencionadas en el límite superior de la anterior biozona, hasta el último registro de *T. arvalidens* y *M. seseae*, así como el primer registro de *M. ratticepoides*, el cual delimita la próxima biozona.

-*Microtus ratticepoides*: Se encuentra delimitada por el primer y el último registro de *M. ratticepoides*. Su límite inferior también está marcado por la desaparición de *T. arvalidens* y *M. seseae*.

-*Iberomys mediterraneus*: Su límite inferior se corresponde con la primera aparición de *I. mediterraneus*. Esta biozona se corresponde con el primer registro de *T. atapuerquensis*, *M. arvalis*, *M. jansoni*, *P. lenki* y *A. sapidus*.

-*Unnamed*: Esta biozona sin nombrar se corresponde con la fauna del Pleistoceno medio, y aún no presenta una definición detallada.

-*Clethrionomys glareolus*: Delimitada por la primera aparición de esa misma especie en el límite inferior. El límite superior se encuentra marcado por la aparición de *Iberomys cabreræ*.

Sistema	Serie/ Subserie	M.A	Biozonas	Atapuerca F.U
Cuaternario	Holoceno	0.00	Fauna actual	9
		0.003-0.0026	<i>T. lusitanicus</i>	8
		0.0117	<i>I. cabreræ</i>	7
	Pleistoceno	0.125		
		0.129	<i>C. glareolus</i>	6c
		0.240	Unnamed	6b
		0.313		
			<i>I. mediterraneus</i>	6a
		0.611		
		0.774	<i>M. ratticepoides</i>	5b
	Inferior	0.780	Unnamed	5a 4
		0.833		3
			<i>Victoriamys chalinei</i>	2
		1.2		
			<i>Allophaiomys lovacati</i>	1
		1.5		
			<i>Allophaiomys pliocaenicus</i>	
		1.8		

**Figura 3.** Distribución de las biozonas de micromamíferos presentes en la Península Ibérica, a lo largo del Cuaternario, excluyendo el primer piso del Pleistoceno (Gelasiense), según los trabajos de Cuenca-Bescós et al. (2010, 2016) y Cuenca-Bescós, (2018), equiparados con las unidades faunales (F.U) presentes en los yacimientos de la Sierra de Atapuerca.



-*Iberomys cabreræ*: Diferenciada de la anterior por la aparición del topillo de cabrera. Su límite inferior también se corresponde con la aparición *M. oeconomicus*, *T. duodecimcostatus*, *T. pyrenaicus*, *Ch. nivalis* y *A. terrestris*. Su límite superior se corresponde con la aparición de *T. lusitanicus*,

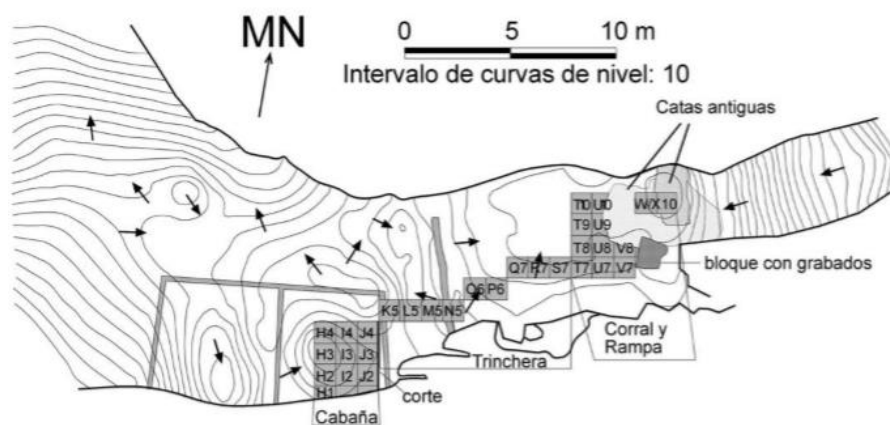
-*Terricola lusitanicus*, Delimitada de nuevo por la aparición de esta especie, y abarca desde ese momento hasta la fauna actual.

-**Fauna actual**: El registro actual de las especies de arvicolinos, contiene las 13 especies estudiadas en este trabajo.

### La Cueva del Mirón

La Cueva del Mirón fue descubierta a inicios del siglo XX, pero su excavación no comenzó hasta 1996.

Se trata de un sistema kárstico que se encuentra de nuevo relleno de materiales cuaternarios, los cuales provienen en gran parte del abanico coluvial-aluvial presente en el borde de la cueva, así como de materiales crioclásticos y materiales originados por caída de bloques. Además, también hay presencia de precipitaciones de carbonato, a partir de las calizas que constituyen las paredes y el techo del sistema (Cuenca-Bescós et al., 2009b).



**Figura 4.** Plano de la Cueva del Mirón, en el que se observa la distribución de cada una de sus zonas de excavación. Imagen tomada de Cuenca-Bescós et al. (2008).

Esta cueva se divide en diversas zonas, denominadas la Cabaña, la Trinchera, el Corral del Gran Vestíbulo Soleado, y la Rampa (Fig. 4).

Estas zonas están divididas en niveles estratigráficos o arqueológicos, que presentan diferente potencia según su contenido arqueológico. Esto se debe a que este yacimiento se encuentra excavado y estudiado con metodología arqueológica, lo que conlleva que los estratos se encuentren numerados al contrario de lo que correspondería según la metodología en geología, colocando la cota 0 en el techo. Esto también es debido a que en las excavaciones llevadas a cabo el sustrato rocoso aún no ha sido alcanzado, el cual según los sondeos de georradar realizados, debe encontrarse a unos 9 o 10 metros de profundidad (García, González y Straus, 2012).

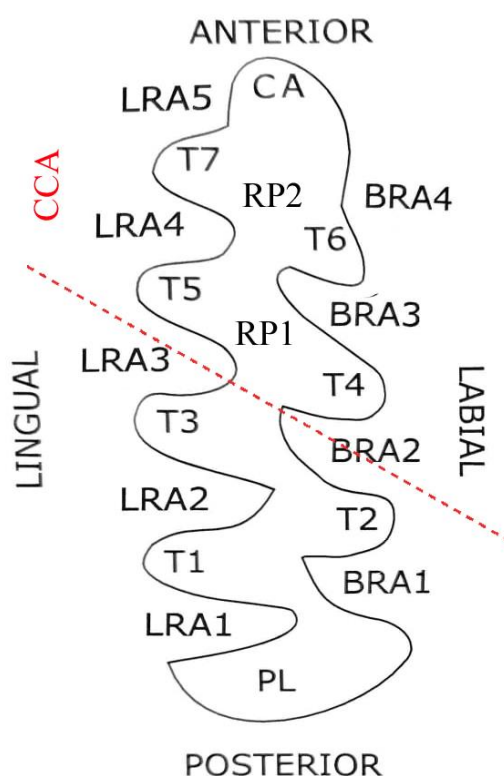
La zona de la Cabaña, presenta una gran riqueza con respecto a fósiles de micromamíferos. Es además la zona a la que corresponde el nivel 17, al cual pertenecen las muestras que se han estudiado en físico en este TFG. En la zona de La Trinchera, se observan niveles con una menor cantidad de

micromamíferos, lo que también podría deberse a un menor estudio de estos niveles, dándose el caso que las especies escasas en las otras zonas, aquí están ausentes. Por último, la zona de la Rampa distal de la terraza aluvial está constituida por los niveles de mayor antigüedad alcanzados en la Cueva del Mirón. (Cuenca-Bescós et al., 2008).

## 6. Sistemática y metodología

Para la clasificación sistemática de las especies estudiadas en este trabajo, se ha seguido la presente en el Proyecto de Investigación la Fauna Ibérica, del Museo Nacional de Ciencias Naturales (web: <http://www.faunaiberica.es/>).

La nomenclatura utilizada para la descripción de los caracteres correspondientes al m1 de las especies estudiadas se puede observar en la fig. 5.



**Figura 5.** Nomenclatura utilizada en la descripción del primer molar inferior (m1). CA= cúspide anterior, CCA: complejo anterocónico, LRA: entrante lingual, BRA: entrante bucal, T: triángulos, RP: rombo pitimiano, PL: lóbulo posterior. Imagen modificada de Bañuls-Cardona (2017).

### 6.1 Sistemática

Se ha realizado el análisis, tanto morfológico como de ADN de 13 especies distintas de la línea evolutiva de los de *Microtus s.l.* de la Península Ibérica, aunque en el estudio no se han tenido en cuenta las posibles variaciones morfológicas que puede haber dentro de una misma especie. Las especies que han sido estudiadas en este trabajo son las siguientes:

**Familia:** Cricetidae, Fisher, 1817

**Subfamilia:** Arvicolinae, Gray, 1821

**Género:** *Clethrionomys* (=Myodes), Tilesius, 1850

**Especie:** *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780)

**Breve descripción:** El topillo rojo, *Clethrionomys glareolus* es una especie actual, caracterizada por ser la única representante de los arvicolinos actuales de la Península Ibérica que aún conserva raíces. Se caracteriza también por presentar cemento en los entrantes tanto linguales como labiales, presentando 4 entrantes linguales. Presenta el mismo espesor de esmalte a lo largo de todo el perímetro, sin zonas libres de esmalte. Además, todos sus triángulos se encuentran confluyentes entre sí. Se ha observado la presencia de más de 3 triángulos antes del complejo anterior, estando T4 y T5 comunicados entre sí, así como la ausencia de cuello entre T6 y T7 y la cúspide anterior. A partir de este momento nos referiremos a esta especie como *Myodes glareolus*.

**Género:** *Arvicola*, Lacépède, 1799

**Especie:** *Arvicola sapidus* (Miller, 1908)

**Breve descripción:** La comúnmente denominada rata de agua, o rata de agua meridional, *A. sapidus* se trata de la especie que se ha elegido como outgroup en los análisis realizados, se caracteriza por presentar esmalte tipo *Mimomys*, es decir más fino en la parte anterior de los triángulos, y más grueso en la posterior, presentando también zonas libres de esmalte. Presenta hasta T5, con 4 entrantes linguales, estando T5 y T4 convergentes, dando lugar al primer rombo pitimiano, y a la vez confluyentes con el complejo anterior, con presencia de cuello. Siendo así, se observa una estructura de 3T + CA (tres triángulos más complejo anterior). Como es característico de su género, se observa un islote libre de esmalte en la cúspide anterior. Esta especie se ha elegido como outgroup en los análisis filogenéticos y morfológicos realizados.

**Especie:** *Arvicola terrestris* (Linnaeus, 1758)

**Breve descripción:** La rata topera, o rata de agua nortea, *A. terrestris* es similar a *A. sapidus*, presentando parecidos caracteres que la anterior, pero es de menor tamaño y el esmalte es de tipo *Microtus*, es decir, más grueso en la parte anterior de los triángulos que en la anterior, presentando al igual que *A. sapidus*, zonas libres de esmalte. Esta especie se utilizará junto a *A. sapidus* como outgroup en los análisis filogenéticos realizados.

Las especies de los géneros (o subgéneros) *Chionomys*, *Microtus*, *Terricola* e *Iberomys* que se describen a continuación, tienen el esmalte del tipo *Microtus*, es decir con el esmalte más grueso en la parte anterior de los triángulos del m1, como en *Arvicola terrestris*.

**Género:** *Chionomys*, Miller, 1908

**Especie:** *Chionomys nivalis* (Martins, 1842)

**Breve descripción:** la especie *Chionomys nivalis*, o también conocido como el topillo nival, o el neverón, se caracteriza por la extraña 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, con T6 cayendo con forma de “gota” en algunos casos. Presenta esmalte diferenciado con zonas libres de esmalte. Esta especie no presenta el primer rombo pitimiano, estando T5 y T4 sin conexión entre sí.

**Género:** *Microtus*, Schrank, 1798

**Especie:** *Microtus arvalis* (Pallas, 1779)

**Breve descripción:** El topillo campesino, *M. arvalis*, denominado antiguamente como *M. terrestris* Schrank, 1798, se corresponde con la especie tipo del género *Microtus*. Esta especie, presenta esmalte tipo *Microtus* con zonas libres de esmalte, así como una disposición simétrica y paralela de los triángulos presentes, hasta T7, y de los correspondientes ángulos entrantes, llegando hasta 5 entrantes linguales, encontrándose T4 y T5 sin conexión. Presenta una cúspide anterior más redondeada que la observable en *M. agrestis*, con presencia igualmente de cuello entre la cúspide anterior y T6 y T7.

**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. Estas dos especies se diferencian por presentar T4 y T5, así como T6 y T7 y sus respectivos entrantes una disposición no tan simétrica ni paralela como lo observado en *M. arvalis*, produciendo como consecuencia que la cúspide anterior no sea tan redondeada. 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)

**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.*, así como presenta zonas libres del esmalte. Se observa hasta T7, pero con un reducido o inexistente T6. T5 y T4 se encuentran incomunicados, y se observa un cuello entre T7 y T6 y la cúspide anterior, menos marcado que en otras especies, lo que conlleva a que presente un total de 5 entrantes linguales.

**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, aun así, se observan un total de 5 entrantes linguales. *M. oeconomus* también presenta zonas libres de esmalte, así T5 y T4 aislados.

**Especie:** *Iberomys cabreræ* (Thomas, 1906)

**Breve descripción:** El iberón o topillo de cabreræ, *I. cabreræ*, se diferencia del resto de especies de *Microtus* mencionadas por la morfología que presenta el m1 de esta especie, con presencia en los salientes linguales de una mayor longitud lateromedial en comparación con los entrantes labiales, característica denominada “asimetría labio-lingual” (Cuenca-Bescós et al., 2014). Otra característica distintiva es la presencia de un complejo anterocónico triangular, con un marcado espolón en su ápice, denominado gancho lingual proximal, así como el hecho de que el 4 entrante lingual es muy profundo, alcanzando prácticamente el lado labial. Estas características ya fueron observadas por Chaline (1972), siendo debido a ellas por lo que algunos investigadores consideran que la especie *I. cabreræ* debería separarse como un género aparte de los *Microtus*, junto con las especies extintas de *I. dentatus*, *I. mediterraneus* e *I. huescarensis* elevándose *Iberomys*, Chaline (1972) al nivel de género, siendo *I. cabreræ* el único representante actual (Cuenca-Bescós et al., 2014).

**Género:** *Terricola*, Fatio, 1867

La diferenciación de las diferentes 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 y la abertura de la cúspide anterior.

**Especie:** *Terricola lusitanicus* (Gerbe, 1879)

Breve descripción: El topillo lusitano, *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.

**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.

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

Breve descripción: El topillo de Gerbe, *T. gerbei*, al igual que el resto de las especies de *Terricola* presenta T4-T5 confluyentes, formando el primer rombo pitimiano, así como la presencia de T6 y T7 conformando el segundo, separados de la cúspide anterior por un cuello, y con presencia de 5 entrantes linguales. También presenta zonas libres de esmalte.

**Especie:** *Terricola pyrenaicus* (*gerbei*) (Sélys-Longchamps, 1847)

Breve descripción: *T. pyrenaicus*, o el topillo de Gerbe pirenaico, es muy similar a *T. gerbei*, por este hecho, algunos autores no los diferencian, o tratan a *T. pyrenaicus* como una subespecie dentro de *T. gerbei*, refiriéndose al primero como *T. gerbei gerbei* y al segundo como *T. gerbei pyrenaicus*. En sí, las diferencias entre uno y otro es la mayor relación longitud/ancho en *T. gerbei* con respecto a *T. pyrenaicus*, así como el hecho de que el segundo rombo pitimiano se encuentra menos inclinado, y la parte delantera del complejo anterocónico es más abierto (Brunet-Lecomte, 2010). Estos caracteres no se han tenido en cuenta en la matriz realizada en este trabajo, siendo así, en los caracteres estudiados presentan una completa similitud.

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Metodología correspondientes a los análisis filogenéticos

En este trabajo no se ha planteado la extracción de ADN antiguo ante la dificultad de extraer ADN de las muestras fósiles en el marco de un Trabajo de Fin de Grado. Por esto, se ha recurrido a la base de datos de Genbank (Benson et al., 2013) para la obtención de los datos del genoma mitocondrial utilizado ampliamente en la literatura científica. Algunos ejemplos de trabajos en los cuales se ha utilizado el

genoma mitocondrial, en este caso para el estudio de los arvicolinos, son; Baca et al. (2020), Li et al. (2016) y Galewski et al. (2006).

Se ha elegido una secuencia mitocondrial de cada una de las especies, a excepción de *I. cabreræ* del cual se han obtenido todas las secuencias disponibles.

Como vamos a analizar el genoma mitocondrial, se ha elegido trabajar con el citocromo b (cytb). En concreto, se ha elegido dicho gen ya que presenta una tasa de mutación lo suficientemente elevada como para poder realizar la discriminación entre especies.

En este caso, únicamente se han usado aquellas secuencias que se encontraban completas con 1143 caracteres, o 1140 si el *stop codon* había sido eliminado al final de la secuencia. Este *stop codon* se refiere a los tres últimos nucleótidos que indican el final para la codificación del gen.

Los datos se han procesado y alineado mediante el programa Mega v.10.0.5 (Kumar et al., 2018), con el que se ha procedido a la eliminación de las secuencias repetidas o con ausencia de gran cantidad de nucleótidos (*missing data*), seleccionándose finalmente una secuencia por cada especie.

La filogenia se ha realizado por medio de un análisis de tipo Máxima Verosimilitud, que consiste básicamente en elegir el resultado más compatible con los datos observados, ver Fisher (1922). Este análisis se ha realizado por medio del programa RAxML v.8.2.11 (Stamatakis, 2014), con el que se han llevado a cabo un total de 100 Bootstrap.

Posteriormente se ha procedido a la identificación de la posición de los diferentes nucleótidos en los codones de las secuencias de cada una de las especies por medio del programa Dambe v.7.0.5 (Xia, 2017). Los codones correspondientes a los genes que se encargan de la codificación de proteínas se encuentran divididos en tres posiciones distintas (nucleótidos), siendo la tercera de ellas la que puede presentar mayores cambios y alteraciones debidas a mutaciones, ya que se trata de la más susceptible a estos procesos, debido a que los cambios realizados en esta posición no suelen generar cambios en el aminoácido que codifican, tratándose por tanto de mutaciones silenciosas y no letales.

Una vez obtenidas las posiciones en cada codón, se han concatenado, o unido, usando de nuevo el programa Mega. Con estos datos, se ha realizado un análisis por PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear et al., 2016) para inferir el mejor esquema de particiones y qué modelo evolutivo se ajusta mejor a cada una de las particiones realizadas.

A continuación, se ha realizado la filogenia usando RAxML, con la misma cantidad de Bootstrap, y un análisis de Inferencia Bayesiana por medio del programa MrBayes v.3.2.3 (Ronquist et al., 2012), en el cual se han realizado 10 millones de generaciones, en las cuales se ha procedido a registrar cada 10 mil, eliminándose un 10% (0.1) como *burnin*. Una explicación de en qué consisten los análisis de Inferencia Bayesiana, así como su aplicación mediante MrBayes se encuentra en Ronquist et al. (2009)

Todos los análisis se han realizado por medio de la plataforma online CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

Con estos análisis se obtienen un archivo tipo *.tree*, que se ha visualizado mediante el programa Figtree v.1.4.3 (Rambaut, 2009), dando así lugar a los árboles filogenéticos, en los cuales se han utilizado las especies de *Arvicola* como outgroup. Este programa nos permite ver el valor del soporte de los nodos generados.

El valor de soporte, indicado con un número en cada nodo (ver las figuras de los cladogramas más adelante), nos indica si los taxones que engloba cada nodo se encuentran más o menos soportados de forma estadística, es decir, si ese clado se puede considerar que se encuentra verificado o no según los datos utilizados para realizar los análisis. Un nodo con valor de Bootstrap de 100 en los análisis mediante RAxML o un valor de 1 en Probabilidad Posterior (PP) usando MrBayes, indicará la presencia de un soporte máximo en dicho nodo. Que un nodo presente un buen soporte no impide que, dentro del clado que engloba pueda haber otros que no se encuentren soportados.

El valor de soporte mediante el cual un nodo se considera bien soportado varía según el tipo de análisis que se realice. En el caso de los análisis usando MrBayes, el nodo se considera soportado cuando tenga un valor de PP mayor o igual a 0.95 con respecto a 1. Por otro lado, en los análisis de Máxima Verosimilitud usando RAxML, se considera un valor aceptable de Bootstrap a partir de 75 sobre 100. De todas formas, el intervalo en el cual el nodo se considera soportado varía según autores.

### 6.2.2 Metodología correspondiente a los análisis de los caracteres morfológicos

Se ha analizado la morfología y los caracteres del primer molar inferior (m1) de las especies de Arvicolinae analizadas en este trabajo. Para ello se ha recurrido a las descripciones en diferentes publicaciones (Bañuls-Cardona, 2017; Cuenca-Bescós et al., 2008, Cuenca-Bescós et al., 2009a) de los niveles holocénicos de los yacimientos de la Sierra de Atapuerca y de la Cueva del Mirón, para observar las especies presentes durante el Holoceno en la Península Ibérica, así como la morfología de los m1 de las poblaciones de esas zonas. Igualmente se ha estudiado muestras de la Cueva del Mirón, nivel 17, donde se ha observado una cierta variabilidad morfológica (Fig. 6). Aunque en este trabajo, dicha variabilidad no se va a tener en consideración, es importante tener en cuenta que estas variaciones se dan en la naturaleza.



**Figura 6.** Fotografía de una muestra del nivel 17 de la Cueva del Mirón (escala 1mm). En la imagen se observa un m1, probablemente correspondiente a un ejemplar de *M. agrestis* o *arvalis*, aunque la morfología que se observa no es la que estas especies suelen presentar. Se ha clasificado de esta forma debido sobre todo al tamaño que presenta el molar, sin ser tan largo como los m1 de *Chionomys nivalis* y ser de mayor tamaño que *M. oeconomus*. Ambas especies también se han observado en dicho nivel junto a *M. agrestis* y *arvalis*.

Se ha construido una matriz de caracteres, codificada en 0/1/2 según la presencia, ausencia, o estado intermedio, del carácter en la especie estudiada (Fig.7). En total se han estudiado 17 caracteres en 13 especies diferentes, sin determinar si dichos caracteres están relacionados o evolucionaron por medios

distintos. Es importante tener en cuenta que algunas características diagnósticas de las especies no se han tenido en cuenta a la hora de realizar la matriz, como la morfología en forma de “seta” de la cúspide anterior de *Ch. nivalis*.

Especies	Caracteres																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>A. sapidus</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
<i>A. terrestis</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
<i>Myodes glareolus</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Chionomys nivalis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0
<i>M. gregalis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1
<i>M. oeconomus</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	0	0	0	1
<i>M. agrestis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	0	2	1
<i>M. arvalis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	0	2	1
<i>I. cabreræ</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	1	2	0	1	1	0	1
<i>T. lusitanicus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1
<i>T. duodecimcostatus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1
<i>T. pyrenaicus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1
<i>T. gerbei</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1

**Figura 7.** Matriz de caracteres morfológicos de las 13 especies estudiadas. Se ha aplicado un código de colores, de acuerdo a las figuras adjuntadas en el Anexo 1. Los caracteres representados son: **1.** Ausencia de raíces, **2.** Presencia de esmalte diferenciado, **3.** Esmalte tipo *Mimomys*, **4.** Esmalte tipo *Microtus*, **5.** Presencia de zonas libres de esmalte, **6.** 3T+CA (complejo anterior), **7.** Presencia de 5T cerrado, **8.** 4T+5T cerrados o abiertos con presencia de 6T y 7T, **9.** T6 y T7 cerrados o abiertos (presencia segundo rombo pitimiano), **10.** 5T y 4T no comunicados (ausencia primer rombo pitimiano), **11.** 4li (LRA4) probergente, **12.** Ausencia de T6, **13.** Presencia de islote de esmalte, **14.** Asimetría labio-lingual (LaLi), **15.** Presencia de gancho lingual proximal, **16.** Presencia de cuello antes de la cúspide anterior, **17.** Número de entrantes linguales, 4 o 5.

Los datos de la matriz se han trasladado al programa TNT v. 1.5 (Goloboff y Catalano, 2016), donde se ha obtenido un cladograma de acuerdo a los datos aportados mediante la matriz de caracteres realizada a Excel. El análisis se ha llevado a cabo mediante la opción de búsqueda tradicional, mediante la cual se han realizado un total de 1000 replicaciones (número de secuencias añadidas de forma aleatoria), de las cuales se han guardado 100 árboles por replicación.

En estos cladogramas se ha utilizado *A. sapidus* como outgroup de las especies estudiadas. Una vez obtenido el cladograma, se ha realizado un análisis tipo Bremer support (Bremer, 1994), también llamado “decay index”, comúnmente usado en paleontología, y otro tipo Bootstrap estándar (Felsenstein, 1985). Ambos son análisis de soporte de ramas de tipo parsimonia.

Estos análisis sirven para determinar el índice de soporte de las ramas que forman el cladograma resultante, dando así una visión más objetiva de la certeza de los resultados obtenidos. De carácter general, todo lo que esté por debajo de un valor de 4 o 5 en Bremer, y por debajo de 80 en Bootstrap, se considera que está poco soportado.

### 6.2.3 Metodología correspondiente a los análisis combinados

Los datos obtenidos por cada método se han analizado conjuntamente, utilizando de nuevo el programa TNT, con la especie *A. sapidus* como outgroup. Para esto, se ha creado un documento de texto en el cual se han añadido de forma conjunta los datos morfológicos y genéticos de cada una de las especies.

Dicho archivo se ha abierto por medio de TNT, obteniéndose esta vez un cladograma resultante de los dos bloques de datos, en el que se han realizado también los análisis de soporte de ramas de tipo Bremer



support y Bootstrap estándar. Los valores para buen soporte en estos análisis son, al igual que en el apartado anterior, correspondientes a un valor mayor o igual de 4/5 en Bremer y de 80 en Bootstrap.

A parte del cladograma realizado por medio de TNT, se ha realizado un análisis de tipo Inferencia Bayesiana, mediante MrBayes, con esta misma matriz de datos conjuntos, usando ambas especies de *Arvicola* como outgroup.

El objetivo de realizar los dos tipos de análisis es poder llevar a cabo una comparación del nivel de soporte al obtenerse resultados de diferentes tipos de análisis. En este último caso, al igual que en el punto 6.1, los nodos se considerarán soportados cuando se encuentren por encima de 0.95.

Para terminar, se ha realizado un mapeo de los caracteres morfológicos en el árbol resultante de la Inferencia Bayesiana, mediante el programa Mesquite v.3.61 (Maddison & Maddison, 2019). Los árboles resultantes se han incluido en el Anexo 1.

## 7. Resultados

### 7.1 Resultados análisis citocromo b (cytb)

Los resultados obtenidos por los análisis de los datos genéticos, realizados por Máxima Verosimilitud y por Inferencia Bayesiana se han representado conjuntamente en la fig. 8.

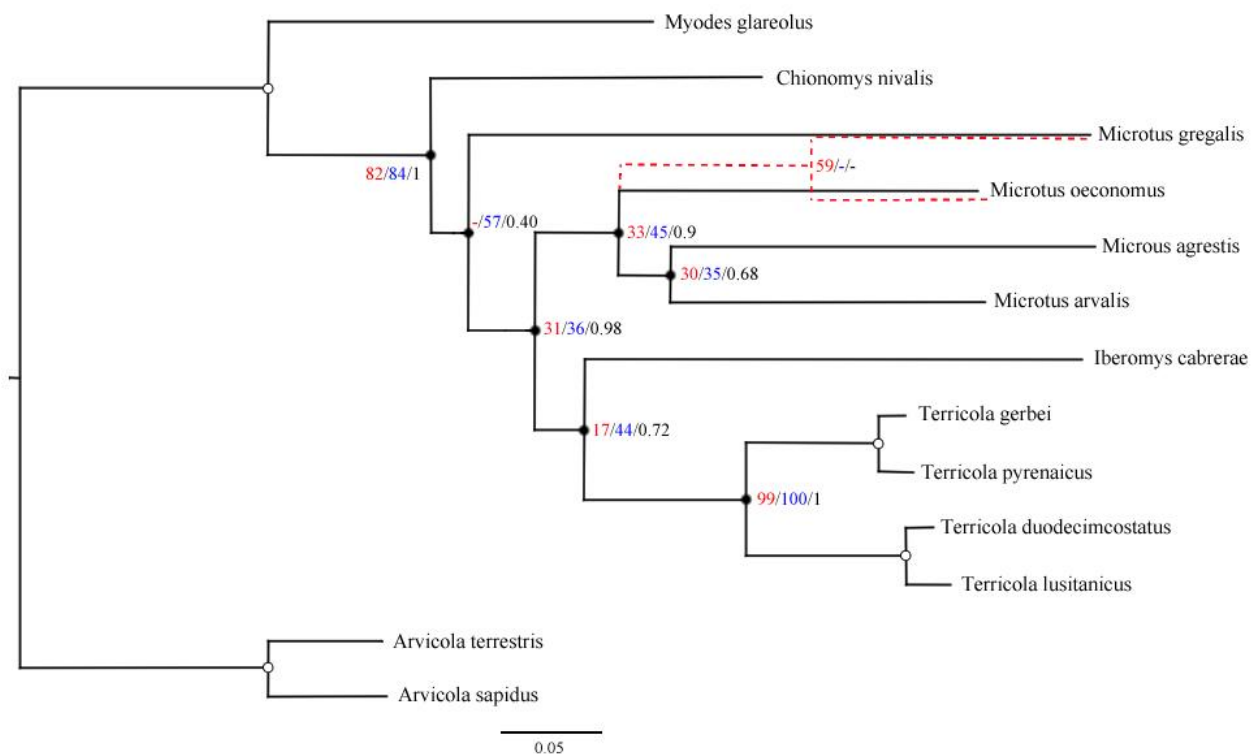
La topología del árbol filogenético en cada uno de los tres análisis es idéntica, a excepción de un cambio en el análisis de Máxima Verosimilitud realizado sin particionar las secuencias mitocondriales según cada una de las posiciones de los codones. Este cambio se observa en la posición que presenta *M. gregalis*, encontrándose este junto a *M. oeconomus*, presentando por lo tanto una mayor relación entre sí. En este caso, formarían un clado, hermano del formado por *M. arvalis* y *M. agrestis*.

En los otros resultados *M. gregalis* se encuentra como rama basal del clado de los *Microtus*, mientras *M. oeconomus* se encuentra conformando un clado no soportado con *M. arvalis* y *M. agrestis*.

Como se puede observar, *I. cabreræ* forma un clado con el grupo de los *Terricola*. Aunque el clado que conforman estas especies no se encuentra soportado, *Terricola* presenta un completo soporte en los tres análisis. Por el contrario, el resto de nodos que se observan dentro de los *Microtus s.l.* no presenta un buen soporte estadísticamente. Esta característica generalizada tiene una excepción en el análisis de MrBayes, con presencia de un nodo soportado con valor de 0.98, que nos englobaría todos los *Microtus s.l.* a excepción de *M. gregalis*.

El nodo que engloba a todos los *Microtus s.l.* más *Ch. nivalis* se encuentra soportado, en el análisis bayesiano completamente, y por los realizados por Máxima Verosimilitud con un valor muy similar entre sí, que ya se considera como un valor de buen soporte (>75).

El resto de nodos presentes, en cualquiera de los análisis realizados, no se encuentra soportado, y además el valor que presentan en la gran mayoría de casos no se acerca al valor con el cual ya se consideraría como un buen soporte. De nuevo, se observa una excepción, en la presencia de un nodo con valor de 0.9 del análisis de Inferencia Bayesiana, el cual nos engloba *M. oeconomus*, *M. agrestis* y *M. gregalis*. Este nodo aun sin estar soportado, se encuentra cerca del valor de 0.95, ya correspondiente a un soporte moderado.



**Figura 8.** Resultados de los análisis realizados de Máxima Verosimilitud y de Inferencia Bayesiana para las especies estudiadas usando los datos moleculares. Los análisis se han realizado mediante RAXML y MrBayes, respectivamente. Los valores de soporte de los nodos de los análisis por RAXML se encuentran en color rojo (sin separación de los codones por posiciones) y en azul, (con separación de los codones de las secuencias mitocondriales de CYTB). Los análisis realizados por MrBayes se encuentran en negro. En el análisis RAXML realizado con las secuencias sin la separación de los codones, hay una diferencia con respecto a los otros dos análisis, como se indica mediante líneas rojas discontinuas. Los nodos totalmente soportados por los tres análisis, es decir, con valor de Bootstrap=100 en ambos análisis realizados por RAXML y con valor de Probabilidad Posterior = 1 en el realizado por MrBayes, se han representado por medio de un círculo blanco en dicho nodo.

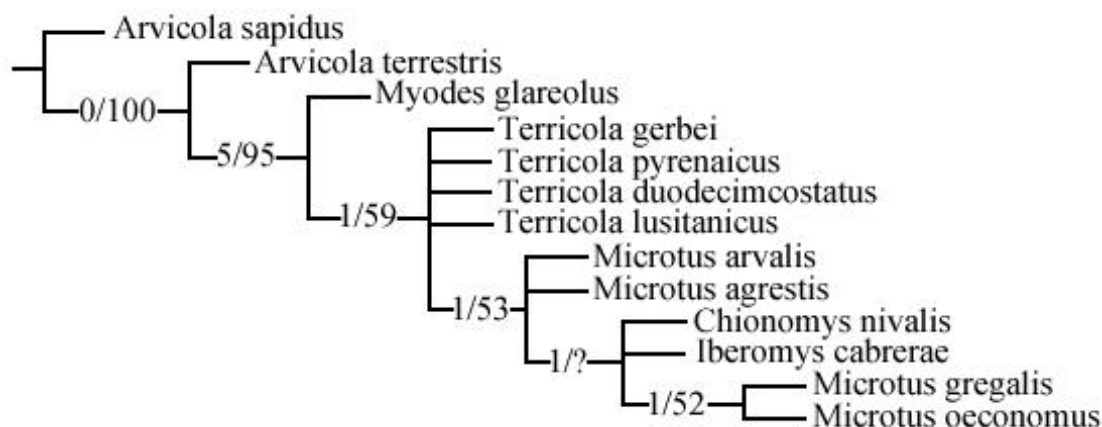
## 7.2 Resultados análisis morfológico

Mediante el programa TNT, se ha realizado un análisis por medio de búsqueda tradicional de los datos morfológicos, obteniéndose un único resultado (Fig. 9).

Al utilizarse la especie *A. sapidus* como outgroup, *A. terrestris* se presenta separado tanto del outgroup como del resto de especies. Se observa como *Myodes glareolus* es la otra especie que se encuentra separada de los *Microtus s.l.*

Las especies de *Terricola* son las que se encuentran más cercanas al outgroup y a *Myodes glareolus*, siendo la rama basal del clado de *Microtus*. En otro grupo se observa que se encuentran en conjunto *M. arvalis* y *M. agrestis*, y se observa un último grupo donde se aprecia la presencia de *Chionomys nivalis* y *I. cabrerar* por un lado, y *M. oeconomus* y *M. gregalis* por el otro.

Los valores de soporte se observan en la fig. 9, siendo los correspondientes a Bremer los representados a la izquierda y los de Bootstrap a la derecha. Los resultados muestran que las ramas que conforman el cladograma, no se encuentran soportadas por ninguno de los dos análisis, incluso llega a ser inferior a 50 en el caso de Bootstrap, presentándose entonces con un interrogante.

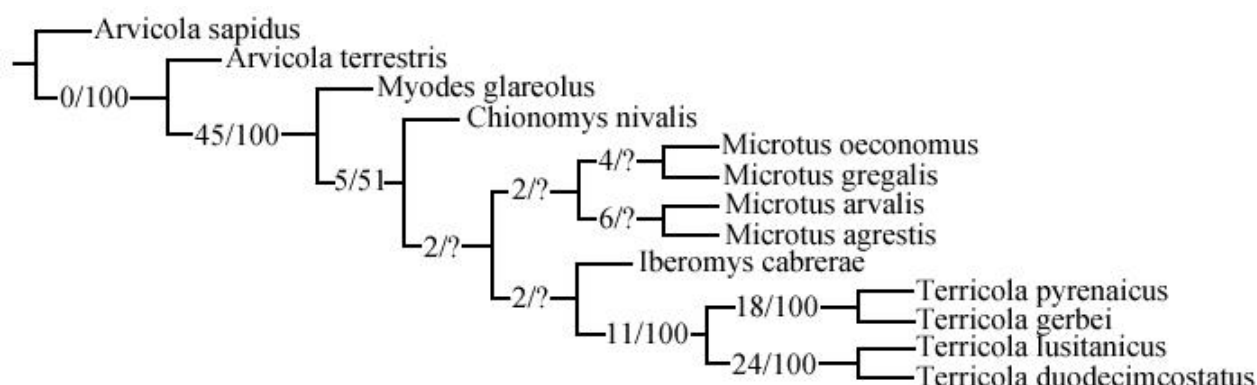


**Figura 9.** Resultados de los análisis realizados mediante el programa TNT, de las especies estudiadas con datos morfológicos. En el cladograma se han representado el nivel de soporte de los nodos mediante la realización de análisis Bremer (izquierda) y Bootstrap (derecha) respectivamente.

### 7.3 Resultados del análisis conjunto genético-morfológico

Al realizar el análisis conjunto de los caracteres genéticos y morfológicos mediante el programa TNT, se ha obtenido los resultados presentes en la fig. 10. En el cladograma obtenido se observa un mayor soporte por parte de los análisis de tipo Bremer que por los análisis de tipo Bootstrap.

Hay presencia de ramas que no se encuentran soportadas por Bootstrap, en la mayoría de casos con valores menores de 50%, pero que por el contrario se encuentran soportados por Bremer, con valores entre 4 y 6. Dentro de los *Microtus s.l.*, los *Terricola* son los únicos que se encuentran soportados por ambos análisis. Se observa como de nuevo *M. gregalis* y *M. oeconomus* forman un clado hermano con *M. arvalis* y *M. agrestis*, en este caso soportados por Bremer, pero no por Bootstrap. También se observa la presencia de un clado formado por *I. cabreræ* y *Terricola*, en este caso sin estar soportado por ninguno de los dos tipos de análisis.

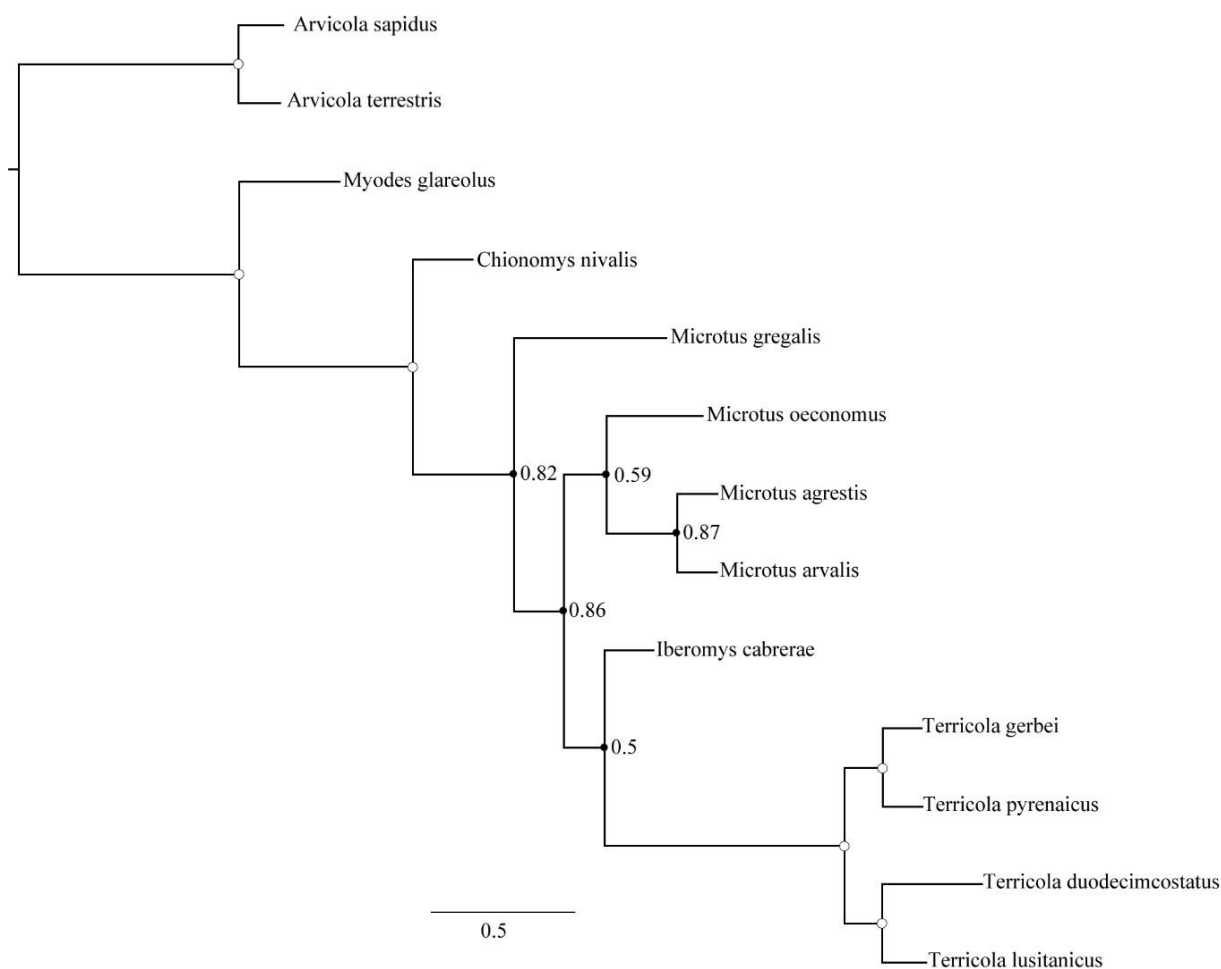


**Figura 10.** Cladograma obtenido al realizar una búsqueda tradicional por medio del programa TNT, con los datos combinados, genéticos y morfológicos. Se han colocado los valores de soporte de los nodos obtenidos por los análisis tipo Bremer (izquierda) y Bootstrap (derecha). Los valores de Bootstrap que se encuentran por debajo de 50, se han substituido por un interrogante.

Al realizar los análisis por Inferencia Bayesiana, mediante MrBayes, se obtienen resultados diferentes a los anteriores (Fig. 11), tanto en la disposición de las especies (topología) como en los valores de los nodos.

En lo referente a la topología del árbol resultante, *M. gregalis* no se encuentra junto a *M. oeconomus* dando lugar a un clado, al contrario de lo observado en el otro análisis (Fig. 10). Siendo así, en este caso *M. gregalis* constituye la rama basal del clado de los *Microtus s.l.* El resto de la topología observada en este árbol filogenético, es idéntica a la que presenta los análisis realizados mediante el programa TNT.

Respecto al valor de los nodos, en este análisis ninguno dentro del clado de *Microtus s.l.* presenta un valor considerado como un buen soporte, estando siempre por debajo de 0.95, excepto en el caso de *Terricola*, cuyo grupo se vuelve a encontrar totalmente soportado.



**Figura 11.** Resultados de los análisis de Inferencia Bayesiana, mediante MrBayes, realizados con la filogenia combinada de los caracteres genéticos y morfológicos. Se ha señalado con un punto blanco aquellos nodos que se encuentran totalmente soportados (Probabilidad Posterior=1).

En las figuras presentes en el Anexo 1, se puede observar como especies que aparecen menos emparentadas en los análisis de MrBayes, pero más cercanas en los resultados presentados en el apartado 7.2, comparten algunos de los caracteres morfológicos estudiados.

## 8. Discusión de los resultados

En los análisis realizados se observa una diferencia entre los valores de soporte de los nodos, incluso con el mismo tipo de datos. Esto se debe a que se han utilizado análisis diferentes, tanto paramétricos, como es el caso de los análisis de Inferencia Bayesiana, como no paramétricos, siendo este el caso de los análisis por Bootstrap estándar, y los realizados por medio RAxML usando Máxima Verosimilitud. Es un hecho conocido, así como comprobado, que los análisis realizados por Inferencia Bayesiana pueden dar valores más altos que los realizados por medio de Máxima Verosimilitud (Erixon et al., 2003; Douady et al., 2003).

Este hecho se puede observar en la fig. 8, observándose que los análisis realizados por medio de RAxML presentan valores de soporte similares, mientras que en el realizado por MrBayes se observan valores mucho más altos, llegando en un caso hasta valores que se consideran de buen soporte. Esto se puede observar en el nodo con valor de soporte de 0.98 de Probabilidad Posterior (PP), mientras que en los análisis mediante RAxML dan valores de 31 y 36 de Bootstrap para ese mismo nodo.

Al observar los resultados obtenidos, y comparar los realizados mediante los caracteres morfológicos con los realizados para los caracteres genéticos y por combinación de ambos, la diferencia que más se aprecia es la posición de las especies, es decir, en relación con la topología de los cladogramas. Se ha de mencionar que con los valores tan bajos de soporte que se han obtenido en los nodos y ramas internas de *Microtus s.l.*, es factible que la posición de las especies cambie entre los análisis.

Uno de los cambios más notables en este aspecto es el que se observa en la fig. 9, donde *Terricola* se encuentran como rama basal del clado de *Microtus s.l.*. Con respecto a *Terricola*, cabe destacar lo observable en las fig. 16 y 17 del Anexo 1, donde se puede apreciar como comparten algunos de sus caracteres morfológicos con *M. glareolus* y *Arvicola*, no presentes en el resto de *Microtus s.l.*.

Conviene también mencionar la presencia de *I. cabreræ* formando un clado (no soportado) con *Terricola*, en todos los resultados a excepción de los obtenidos únicamente con datos morfológicos (Fig. 9). Tanto *Terricola* como *Iberomys* son especies cuyas formas se corresponden a algunas de las más primitivas de entre las especies del género *Microtus* actuales, aspecto que podría estar relacionado con que estas especies aparezcan relacionadas en la mayoría de resultados.

Otra diferencia en los resultados de los análisis morfológicos de la fig. 9 es la posición de *Ch. nivalis*, formando un clado con *I. cabreræ*, así como con *M. oeconomus* y *M. gregalis*. Estas dos últimas especies también aparecen relacionadas en las figs. 8 y 10, formando, en estos dos casos, un clado hermano con *M. arvalis* y *M. agrestis*.

En la fig. 18 del Anexo 1 se puede observar que únicamente *M. oeconomus* y *M. gregalis* son las especies que comparten el carácter 12 (ausencia de T6).

Estas diferencias que se observan pueden ser debidas al hecho de que la selección de caracteres para la realización de los análisis se ha realizado sin tener en cuenta, por ejemplo, caracteres identificativos como la forma característica de “seta” que presenta la cúspide anterior en *Ch. nivalis*. Otro factor que puede haber influido notoriamente en la distribución de las especies en los cladogramas y árboles filogenéticos, en concreto en la fig. 8, es que no se ha tenido en cuenta que alguno de los caracteres observados, aunque puedan parecer similares en varias especies, pueden tener un origen o evolución distinta, ni tampoco la antigüedad de cada una de las especies con las que se ha trabajado.

Como se ha indicado, *M. gregalis* y *M. oeconomus* aparecen relacionados en varios de los resultados (Figs. 8, 9, 10), en los árboles obtenidos por el programa TNT y por el análisis de Máxima Verosimilitud realizado por RAxML, previo a la separación de las posiciones de los codones de las secuencias

mitocondriales. Por el contrario, en los realizados posteriormente a la separación de los codones, utilizando MrBayes y RAxML, así como en el realizado por Inferencia Bayesiana con los datos combinados de morfología y genética, *M. gregalis* se encuentra separado del resto de *Microtus*, actuando esta especie como rama basal del clado. Cabe decir que algunos autores consideran a *M. gregalis* como un género diferente a *Microtus s.l.*, clasificándolo como *Lasiopodomys gregalis*, (Abramson y Lissovsky, 2012), pero los valores de soporte presentes en los nodos obtenidos tampoco permiten confirmar, ni desmentir, dicha clasificación.

Un caso similar al de *M. gregalis* sucede con *Iberomys cabreræ*. Se ha propuesto elevar el subgénero *Iberomys* a género (Cuenca-Bescós et al., 2014), pero al igual que con *M. gregalis*, los resultados obtenidos en este trabajo, no pueden verificar, así como tampoco desmentir, esta clasificación.

En los resultados de los análisis se puede apreciar que, independientemente del método utilizado, los valores de soporte presentes en los nodos no validan las posiciones de las especies dentro del clado de *Microtus s.l.* en los árboles obtenidos.

El único caso donde sí se observa un mayor soporte es en la fig. 10, y únicamente por medio de Bremer support. Esto puede ser consecuencia del tipo de análisis de soporte de ramas que se realiza con ese método, el cual suele sobreestimar dichos valores de soporte (Müller, 2005). Siendo así, presenta ramas soportadas con valores de 4 y 6, concretamente correspondientes a *M. gregalis*, *M. oeconomus*, *M. arvalis* y *M. agrestis*, las cuales no se encuentran soportadas por Bootstrap.

En este caso en concreto, se aprecia que la adición de los caracteres genéticos hace que el nivel de soporte aumente en relación al observado en la fig. 9, tanto en Bremer como en Bootstrap de carácter general. Es cierto que con respecto a Bootstrap se obtiene una mayor cantidad de valores por debajo de 50, aun así, hay presencia de valores con un valor de 100 de soporte, no presentes en los resultados de la fig. 9.

Por el contrario, al realizar el análisis combinado por medio de Inferencia Bayesiana, el soporte de los nodos disminuye levemente al añadir los caracteres morfológicos (Fig. 11), en comparación a los análisis realizados únicamente con la matriz de caracteres genéticos (Fig. 8). Igualmente, estos valores siguen siendo más altos que los obtenidos por el análisis no paramétrico de Bootstrap, pero tal como se ha indicado, son menores que los que presenta el análisis de Bremer support (Fig. 10).

## 9. Conclusions

The results obtained in this work, show the effect of the high evolutionary rate presented by the *Microtus* species. The current common voles have had a high radiation, with a large number of species present since the appearance of the genus *Allophaiomys*, in the so-called second phase of the evolutionary vole radiation (Chaline et al., 1999).

This high speciation could explain the low support observed in the cladograms. Rapid genetic changes, which are responsible of the speed of the different morphological changes, lead to rapid differentiation between them and their classification into a huge variety of different species, genera and sub-genera by researchers.

As observed in the analyses done in this work, the cladistics in the *Microtus s.l.* are complex, with the presence of very rapid genetic and morphological changes, which except in some cases, as observed in *Terricola* clade.

In general, the differences in both, molecular and morphological data are not sufficiently marked or important numerically to guarantee that it is a sub-genera or a genera, at least with the data analyzed in this work.

Using this methodology and dataset, the current internal cladogenesis of the studied *Microtus*, although the support value of the nodes increase with the addition of the genetic data to the morphological, cannot be statistically supported, and therefore it would be necessary additional data to achieve viable results.

## 10. Bibliografía

- Abramson, N.I., 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.
- 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., 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. & Hernández, F. (2005). Paleoecología y comportamiento humano durante el Pleistoceno Superior en la comarca de Liébana: La secuencia de la Cueva de El Esquilieu (Occidente de Cantabria, España). Museo de Altamira. *Monografías*, 20: 461-487.
- Bañuls-Cardona, S. (2017). *Human impact on small-mammals from late glacial to late Holocene of wester mediterranean region: new environmental and climatic approach*. Tesis doctoral, Università degli Studi di Ferrara, 218p.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M, Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2013). Genbank. Nucleic Acids Research, (Database Issue) 41: D36-D42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Bremer, K. (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295–304.
- 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 pyrenaicus* (e Sélys Longchamps, 1947) (Mammalia: Rodentia: Arvicolinae). *Vertebrate Zoology*, **60** (3): 243-248.
- Chaline J. (1972). Les rongeurs du Pleistocène moyen et supérieur de France. *Cahiers de Paléontologie CNRS*, 1-410.
- Chaline, J., Brunet-Lacomte, P., Montuire, S., Viriot, L., Courant, F. (1999). Anatomy of arvicoline radiation (Rodentia): paleogeographical, paleoecological history and evolutionary data. *Ann. Zool. Fennici*, 36: 239-267.
- Cuenca-Bescós, G. (2018). Quaternary Micro-Mammal Zones. En: *The Encyclopedia of Archaeological Sciences*. (López Varela, S.L, eds). John Wiley & Sons, Inc, 1-4.
- Cuenca-Bescós, G., Canudo, J.I., Laplana. C. (1995). Los Arvicólidos (Rodentia, Mammalia) de los niveles inferiores de Gran Dolina (Pleistoceno Inferior, Atapuerca, Burgos, España). *Revista Española de Paleontología*, 10: 202-218.



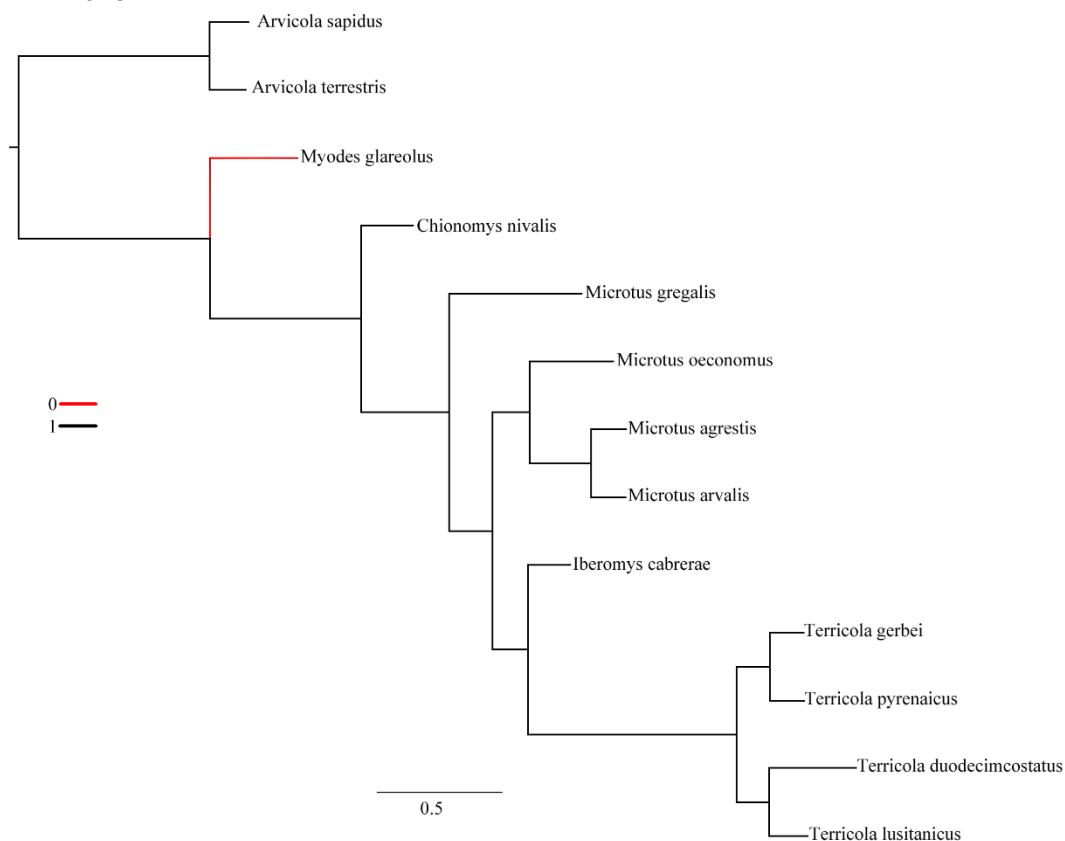
- Cuenca-Bescós, G., Strauss, L. G., González Morales, M. R. & García Pimienta, J. C. (2008). Paleoclima y paisaje del final del cuaternario en Cantabria: Los Pequeños mamíferos de la cueva del Mirón (Ramales de la Victoria). *Revista Española de Paleontología*, **23** (1): 91-126.
- Cuenca-Bescós, G., 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. (2009a). Biochronology of Spanish Quaternary small vertebrate faunas. *Quaternary International* 30: 1-11.
- Cuenca-Bescós, G., Straus, L.G., González, M.R., García, J.C. (2009b). The reconstruction of past environments through small mammals: from the Mousterian to the Bronze Age in El Mirón Cave (Cantabria, Spain). *Journal of Archaeological Science*, 36: 947-955.
- 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., Carbonell, E. (2010) Biochronology of Spanish Quaternary small vertebrate faunas. *Quaternary International*, 30: 1-11.
- Cuenca-Bescós, G., Marín-Arroyo, A.B., Martínez, I., González Morales, M., Straus, L.G. (2012). Relationship between Magdalenian subsistence and environmental change. The Mammalian evidence from El Mirón (Spain). *Quaternary International*. 272-273: 125-137.
- Cuenca-Bescós, G., López-García, J., Galindo-Pellicena, M., García-Perea, R., Gisbert, J., Rofes, J., 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 Níñez-Lahuerta, 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.
- Douady, C.J., Delsuc, F., Boucher, Y., Doolittle, W.F., Douzery, E.J.P. (2003). Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 248-254.
- Erixon, P., Svennblad, B., Britton, T., Oxelman, B. (2003). Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap frequencies in phylogenetics. *Systematic Biology*, 52: 665-673.
- 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.
- Fisher R.A. (1922) On the mathematical foundations of the theoretical statistics. *Philos. Trans., R. Soc. London A*, 222: 309-368.
- Galewski, T., Tilak, M.-K., Sanchez, S., Chevret, P., Paradis, E., and Douzery, E.J. (2006). *BMC Evolutionary Biology*, 6: 80-97.

- García Díez, M., González Morales, M.R., 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 (1): 21-36.
- Goloboff P.A., Catalano, S.A. (2016). TNT versión 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics*, 32: 1-18.
- Iriarte-Chiapusso, MJ. Arrizabalaga, A., Cuenca-Bescós, G. (2015). The vegetational and climatic contexts of the Lower Magdalenian human burial in El Mirón Cave (Cantabria, Spain). *Journal of Archaeological Science*, 60: 66-74.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 772-773.
- Li, Y., Shi, Y., Lu, J., Ji, W., Wang, Z. (2016). Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of *Lasiopodomys mandarinus mandarinus* (Arvicolinae, Rodentia). *Gene*, 593: 302-307.
- Marín-Arroyo, A.B., Landete Ruiz, M.D., Vidal, G., Seva, R., González Morales, M.R., Straus, L.G. (2007). Archaeological implications of human-derived manganese coatings: A study of blackened bones in El Mirón Cave, Cantabrian Spain. *Journal of Archaeological Science*, 35: 801-813.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. En: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop. *IEEE, New Orleans*, pp. 45-52.
- Müller, K.F. (2005). The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, Bootstrap, and Bremer support. *BMC Evolutionary Biology*, 5: 1-10.
- Ortega, A.I., Benito Calvo, A., Pérez-González, A. Carbonell, E., Bermúdez de Castro, J.M., 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:101-110.
- Pokines, J.T. (1998). The paleoecology of Lower Magdalenian Cantabrian Spain. *Bar International Series*, 713: 1-189.
- Rambaut, A. (2009). Programa distribuido por el autor a través de la web <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Ronquist, F., van der Mark P., Huelsenbeck, J.P. (2009). Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. En: *The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A-M., eds). Cambridge University Press, New York, 210-266.

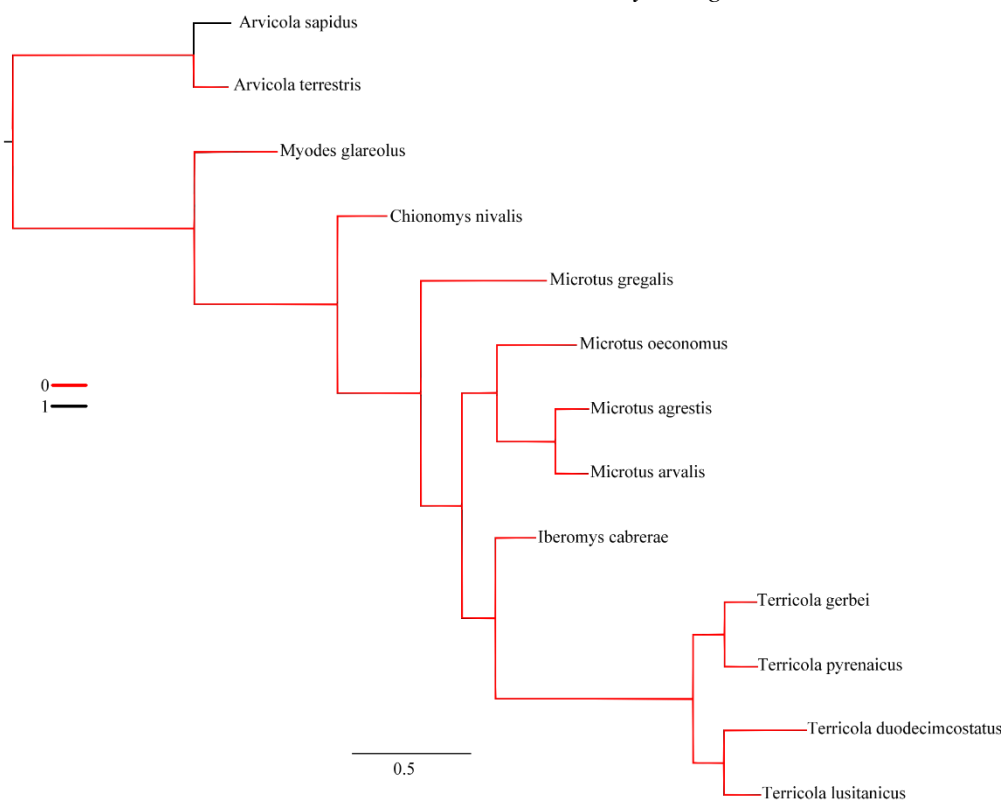
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539-542.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312-1313.
- 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.
- Vergés, J.M., Allué, E., Angelucci, D., Cebrià, A., Díez, C., Fontanals, M., Manyanòs, A., Montero, S., Moral, S., Vaquero, M., Zaragoza, J. (2002). La Sierra de Atapuerca durante el Holoceno: datos preliminares sobre las ocupaciones de la Edad del Bronce en la cueva de El Mirador (Ibeas de Juarros, Burgos). *Trabajos de Prehistoria*, 59: 107-126.
- Xia, X. (2017). DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. *Journal of Heredity*, 108: 431-437.

## **11. Anexos**

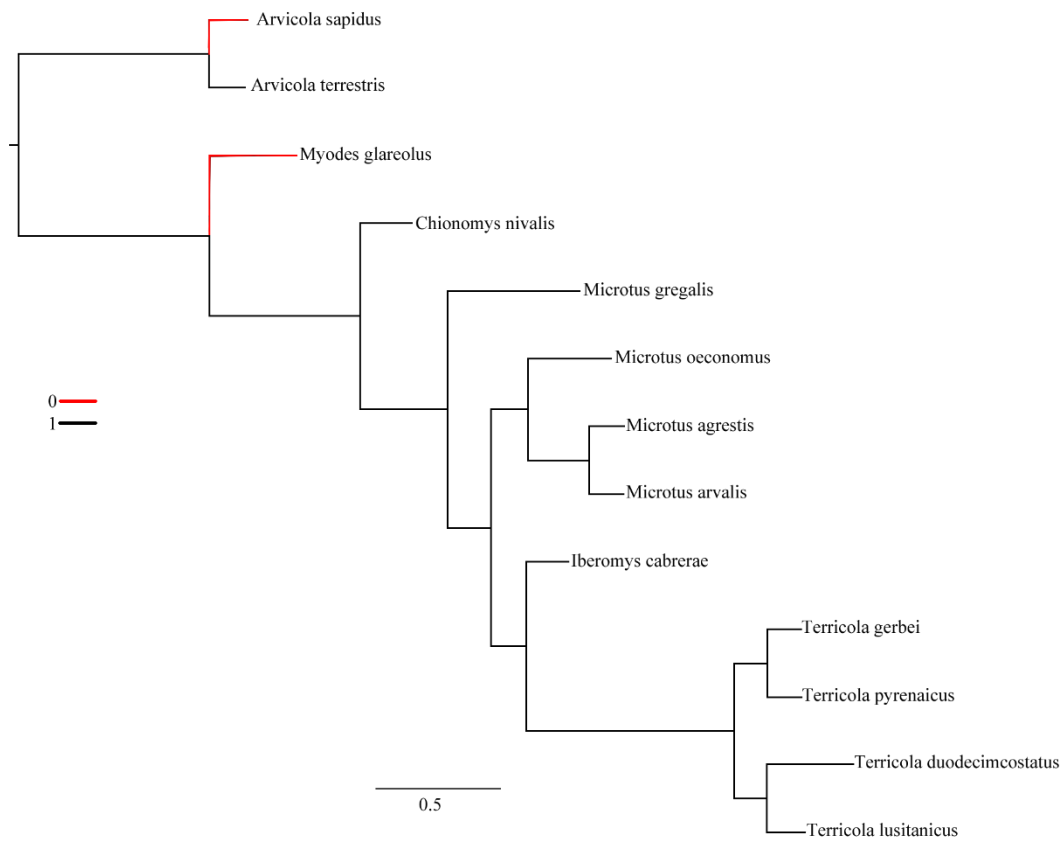
## Anexo 1



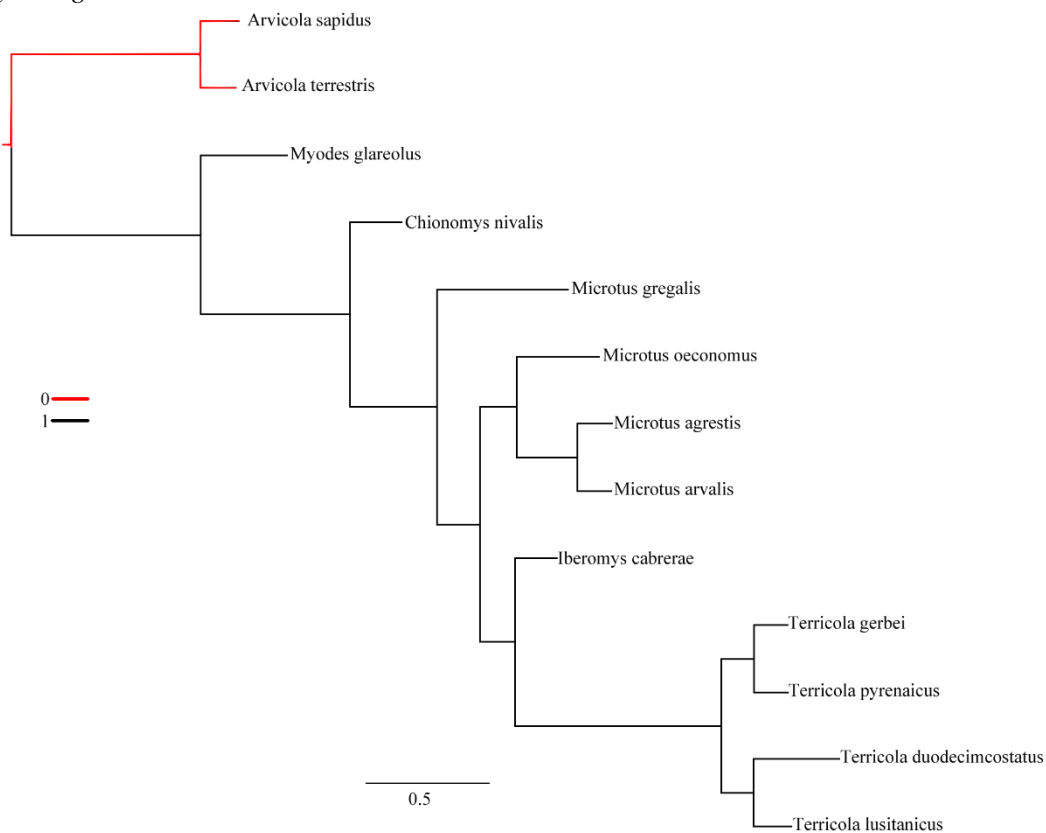
**Figura 12.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia de los caracteres 1(ausencia de raíces), 2(esmalte diferenciado) y 5 (zonas libres de esmalte) en las diferentes especies estudiadas. Se observa como dichos caracteres están ausentes en *Myodes glareolus*



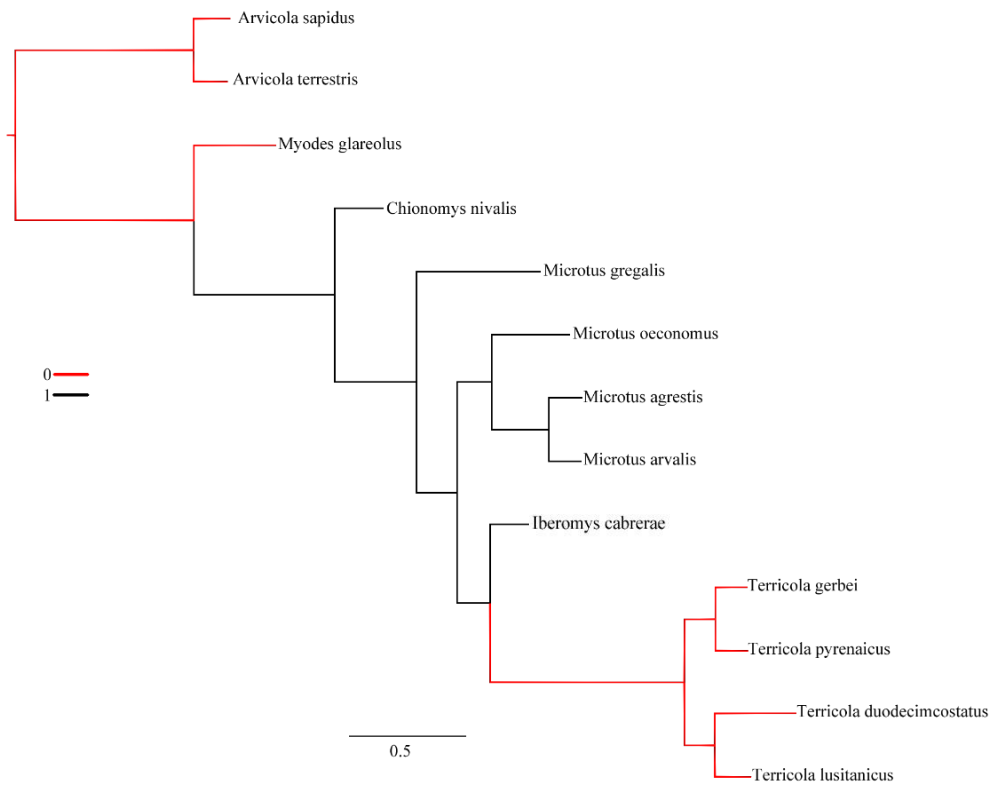
**Figura 13.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 3 (esmalte tipo *Mimomys*) en las diferentes especies estudiadas. Se observa como *A. sapidus* es el único que tiene este esmalte.



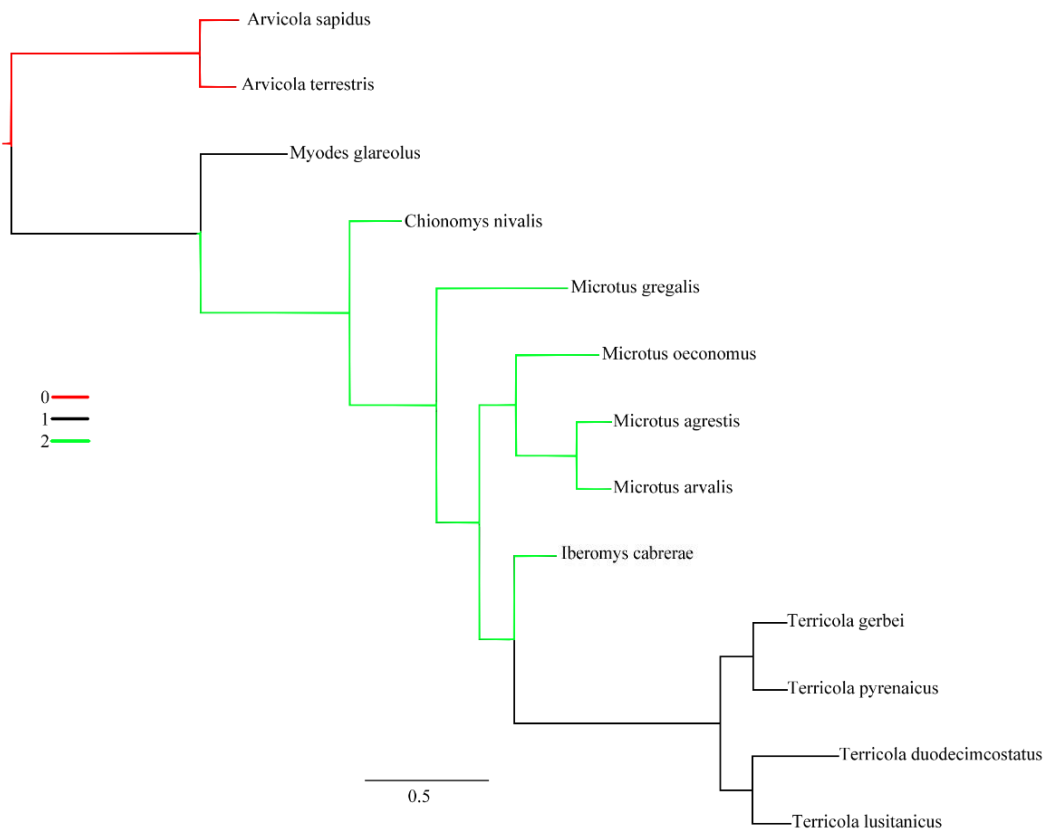
**Figura 14.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 4 (esmalte tipo *Microtus*) en las diferentes especies estudiadas. Está presente en todas las especies a excepción de *A. sapidus* y *Myodes glareolus*.



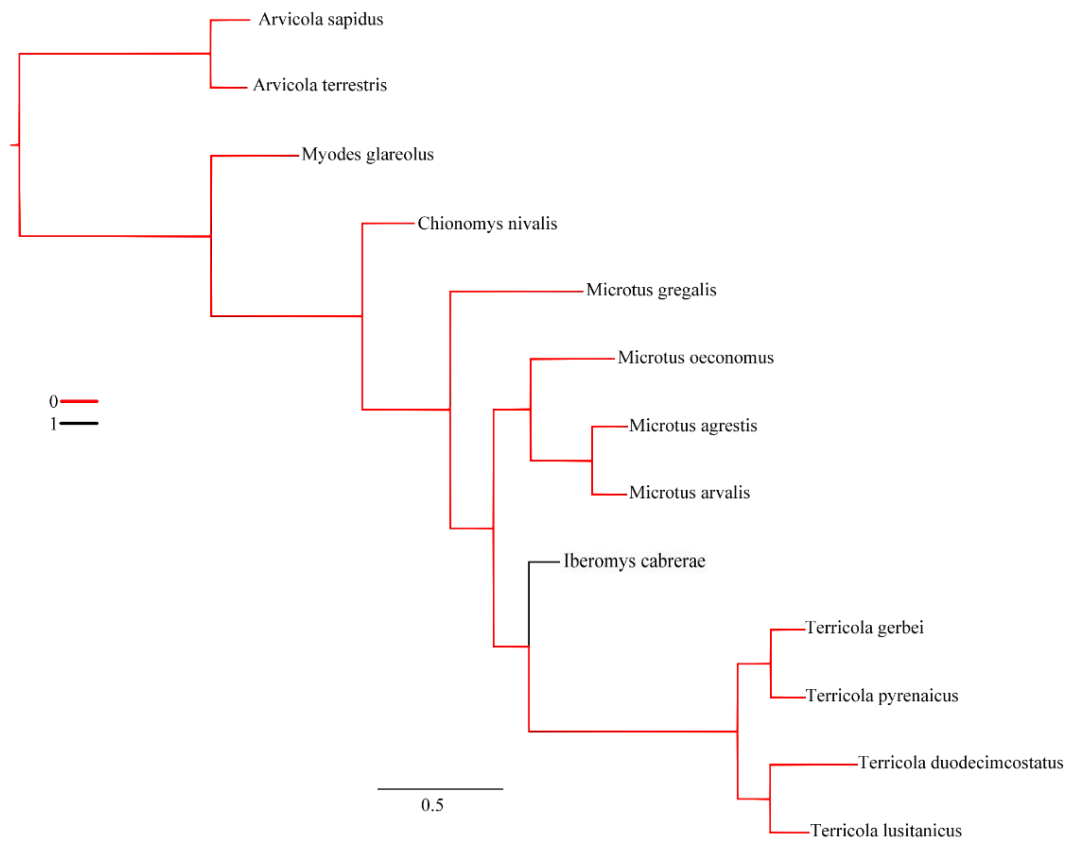
**Figura 15.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia de los caracteres 6(3T + CA) y 9 (T6 y T7: segundo rombo pitimiano), en las diferentes especies estudiadas. Se observa como en los *Arvicola* estos caracteres no están presentes.



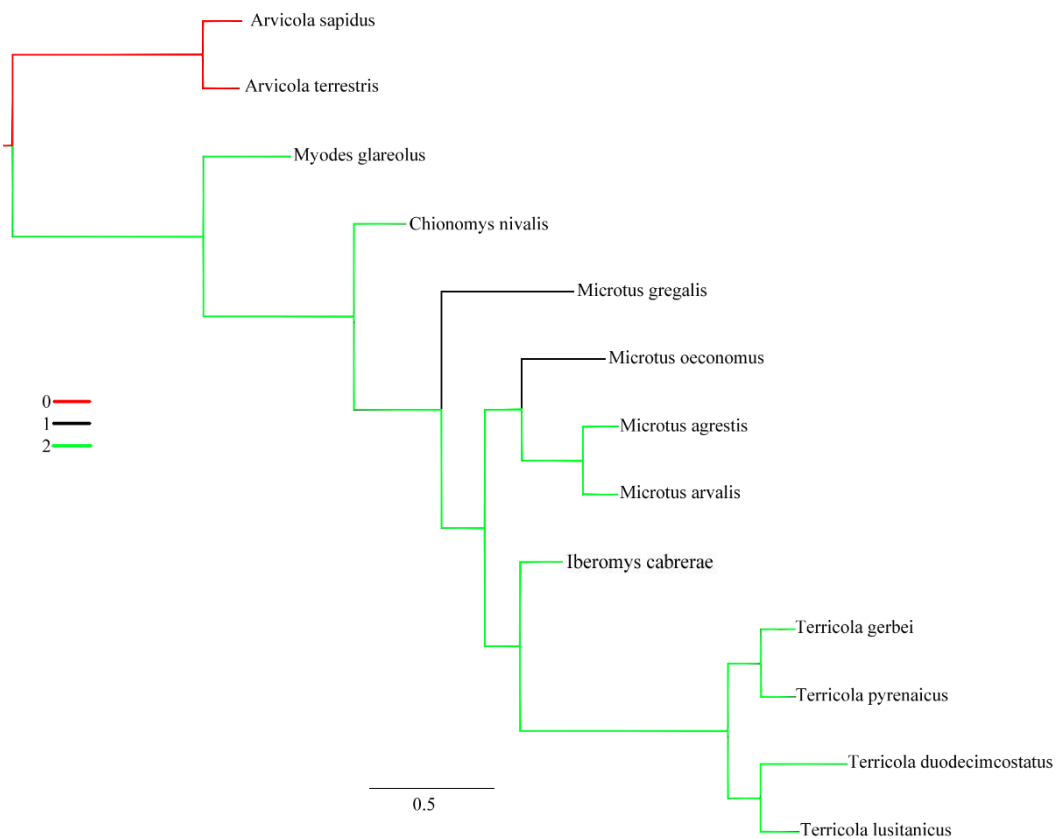
**Figura 16.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia de los caracteres 7 (5T cerrado) y 10 (ausencia primer rombo pitimiano), en las diferentes especies estudiadas. Se observa como dichos caracteres están ausentes en *Arvicola*, *M. glareolus* y *Terricola*.



**Figura 17.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 8 (T4 y T5 comunicados o no, con presencia de hasta T7) en las diferentes especies estudiadas. Se observa como no están presentes en *Arvicola*. *Terricola* y *Myodes glareolus* presentan T5 y T4 comunicados, mientras el resto de especies no.

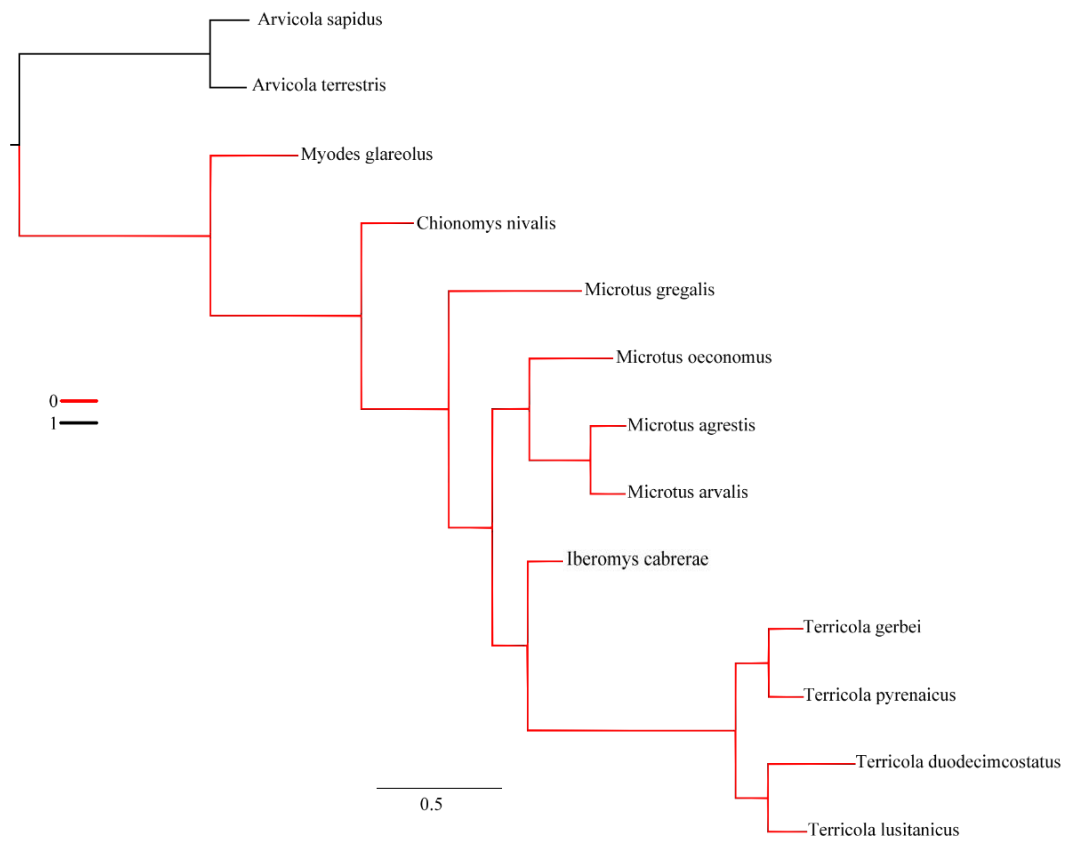


**Figura 18.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia de los caracteres 11 (4li (LRA) probergente), 14 (asimetría labio-lingual, LaLi) y 15 (gancho lingual proximal) en las diferentes especies estudiadas. Se observa que estos caracteres solo están presentes en *I. cabreræ*.

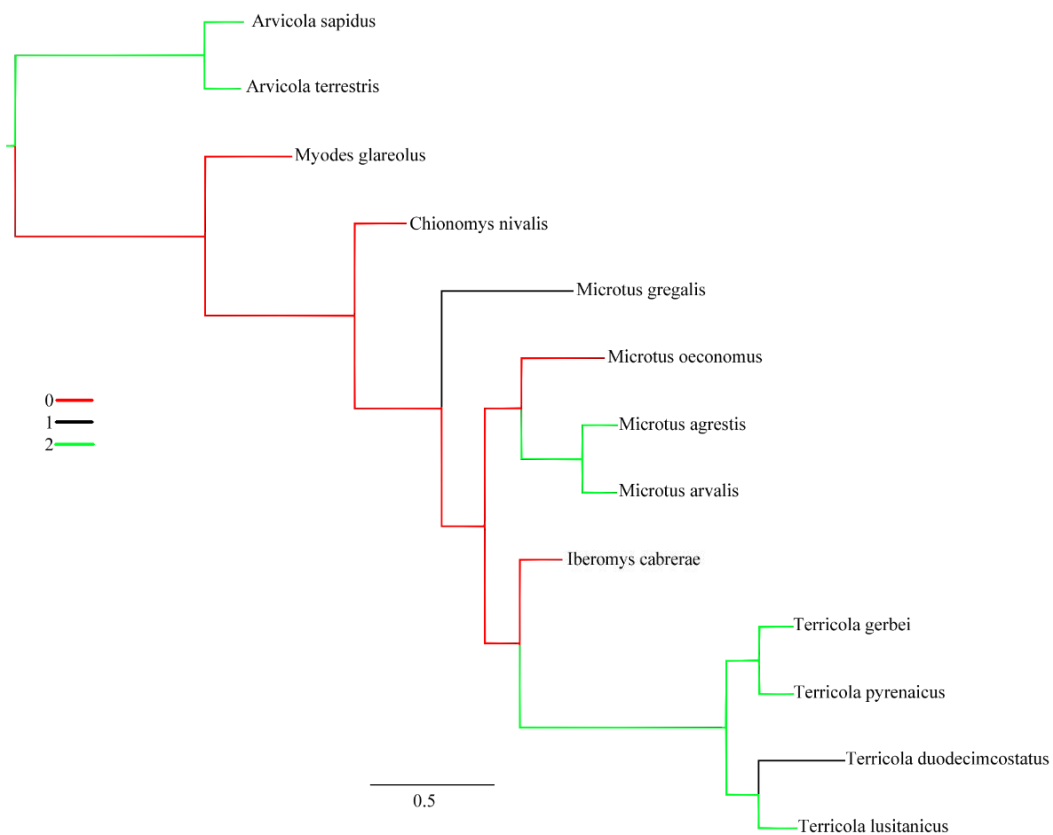


**Figura 19.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 12 (ausencia de T6) en las diferentes especies estudiadas. Se observa que los *Arvicola* no presentan ni T6 ni T7, mientras que *M. oeconomus* y *M. gregalis* no presentan T6.

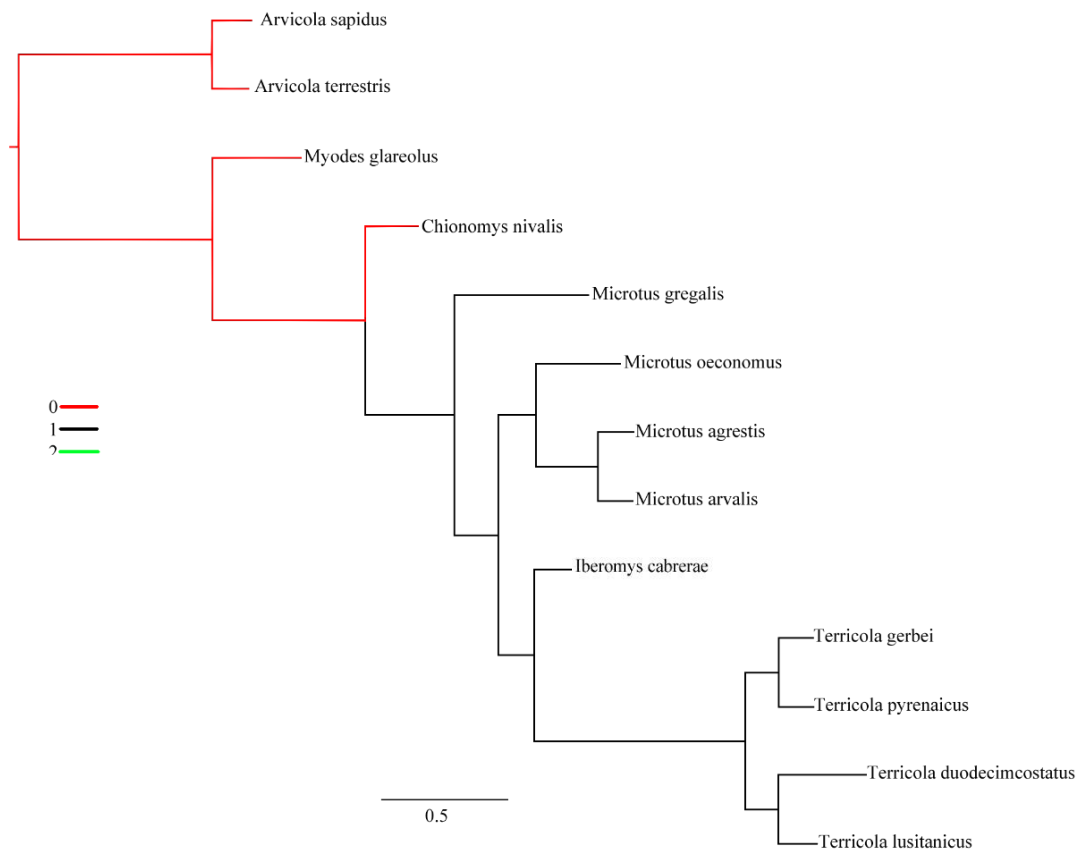




**Figura 20.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 13 (presencia de islote de esmalte) en las diferentes especies estudiadas. Se observa que este carácter solo se observa en *Arvicola*.



**Figura 21.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 16 (presencia de cuello), en las diferentes especies estudiadas. *Arvicola*, *M. agrestis*, *M. arvalis* y casi todas las especies de *Terricola* presentan cuello marcado.



**Figura 22.** Cladograma en el cual se muestra la presencia o ausencia del carácter 17 (4 o 5 entrantes linguales) en las diferentes especies estudiadas. Se observa que *Arvicola*, *Myodes glareolus* y *Chionomys nivalis* presentan 4 entrantes linguales.