

Sinergias en morfología y genética de *Microtus s.l.* del Cuaternario de la Península Ibérica

Sinergias na morfologia e genética de *Microtus s.l.* do Quaternário da Península Ibérica

Synergies in morphology and genetics of *Microtus s.l.* from the Quaternary of the Iberian Peninsula

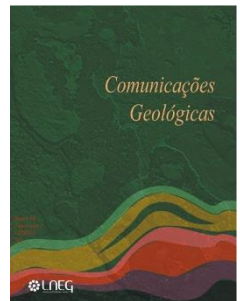
M. P. Alfaro-Ibañez^{1*}, P. Bover^{1,2}, G. Cuenca-Bescós¹

DOI: <https://doi.org/01>

Recebido em 16/05/2021 / Aceite em 19/08/2022

Publicado online em de 2021

© 2021 LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia IP



Artigo original
Original article

Resumen: Los géneros y subgéneros de *Microtus s.l.* (Arvicolinae, Rodentia) han sido ampliamente utilizados en dataciones bioestratigráficas del Cuaternario por su alta tasa evolutiva y distribución. Aún con la abundante bibliografía, existe controversia sobre la sistemática de algunos taxones, y sus relaciones filogenéticas siguen sin resolverse totalmente incluso usando grandes cantidades de datos genéticos. En este artículo se realiza un estudio preliminar combinando caracteres morfológicos (17 caracteres dentales) y genéticos (secuencias del gen mitocondrial *cytb*) de estos géneros/subgéneros de inicios del Holoceno de la Península Ibérica. Los datos obtenidos permiten afirmar que añadiendo los datos genéticos a la matriz de los caracteres morfológicos se incrementa el soporte de los nodos en los árboles filogenéticos, aunque muchas de las relaciones entre taxones siguen sin resolverse. Por tanto, esta primera aproximación sugiere que deberían incorporarse más datos morfológicos, moleculares, e información sobre taxones extintos para descifrar las relaciones filogenéticas de este grupo zoológico.

Palabras clave: Caracteres dentales, *cytb*, filogenia, Sistemática.

Resumo: Os géneros e subgéneros de *Microtus s.l.* (Arvicolinae, Rodentia) foram largamente utilizados em datações bioestratigráficas do Quaternário devido à sua elevada taxa evolutiva e distribuição. Apesar da extensa bibliografia, existe controvérsia sobre a sistemática de alguns táxons, e as suas relações filogenéticas continuam sem estar totalmente resolvidas mesmo com a existência de dados genéticos. Neste artigo realiza-se um estudo preliminar, combinando caracteres morfológicos (17 caracteres dentais) e genéticos (sequências do gene mitocondrial *cytb*) destes géneros/subgéneros do início do Holocénico da Península Ibérica. Os dados obtidos permitem afirmar que ao adicionar os dados genéticos à matriz de caracteres morfológicos, o suporte dos nodos nas árvores filogenéticas é incrementado, apesar de muitas das relações entre táxons continuarem por resolver. Portanto, esta primeira aproximação sugere que deveriam ser incorporados mais dados morfológicos, moleculares e informação sobre táxons extintos para decifrar as relações filogenéticas deste grupo zoológico.

Palavras-chave: Caracteres dentários, *cytb*, filogenia, Sistemática.

Abstract: The genera and subgenera of *Microtus s.l.* (Arvicolinae, Rodentia) have been widely used to infer Quaternary biostratigraphic chronology due to their high evolutionary rate and distribution. Despite the remarkable amount of bibliography, some controversy still exists regarding the systematics of some taxa, and their phylogenetic relationships remain unsolved even using extensive molecular datasets. In this paper we perform

a preliminary study combining morphological (17 tooth characters) and genetic (mitochondrial *cytb* sequences) characters of these taxa from the early Holocene of the Iberian Peninsula. Obtained data suggests that the introduction of molecular data to the morphological character dataset increases the support level of nodes of phylogenetic trees, although some of the relationships between different taxa are not fully resolved. Thus, this first combined approach suggests that more morphological and molecular data should be included in datasets, as well as more data from extinct taxa, to unravel the complex phylogeny of this animal group.

Keywords: *cytb*, dental characters, Systematics, phylogeny.

¹ Grupo Aragosaurus-IUCA Departamento de Ciencias de la Tierra, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain.

² Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID). Avenida Ranillas, 1D, 50018, Zaragoza, Spain.

* Autor correspondiente/Autor correspondente/Corresponding author: 740462@unizar.es

1. Introducción

Los topillos (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) actuales de los géneros/subgéneros de *Microtus*, *Iberomys* y *Terricola*, entre otros, son uno de los grupos zoológicos más utilizados en bioestratigrafía del Cuaternario (e.g. Cuenca-Bescós *et al.*, 2016; Fagoaga, 2020). Desde la aparición de su primer representante arizodonto, *Allophaiomys*, hace unos 2 Ma (e.g. van der Meulen, 1973), presentan una alta tasa evolutiva y distribución en el hemisferio norte.

Esta rápida evolución se observa tanto en caracteres morfológicos como genéticos (e.g. Chaline *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2013), por lo que es interesante realizar estudios combinados usando ambos datos. Aunque se han realizado filogenias moleculares (e.g. Baca *et al.*, 2019, 2020), este tipo de análisis integrado es inédito hasta la fecha en esta subfamilia de roedores.

Incluso con la abundante bibliografía sobre taxonomía y filogenia de estos roedores, sigue la controversia con su clasificación sistemática y taxonómica, especialmente en la taxonomía de subgéneros actuales, considerados como géneros válidos por algunos investigadores (e.g. Abramson y Lissovsky, 2012; Cuenca-Bescós *et al.*, 2014).

En este trabajo pretendemos evaluar si la combinación de análisis filogenéticos con caracteres moleculares y morfológicos pueden aportar información en estudios taxonómicos y filogenéticos de la subfamilia Arvicolinae.

2. Marco geográfico y geológico

El Portalón y Galería de las Estatuas son dos yacimientos kársticos de la Sierra de Atapuerca, localizada a unos 15 km al este de Burgos, al noreste de la provincia de Castilla y León (España), delimitada por el río Arlanzón al sur y la Cordillera Cantábrica al norte, en el corredor de Bureba. Se localizan en materiales del Cretácico superior y son parte de un sistema multinivel, el sistema Cueva Mayor-Cueva del Silo, en el que ambos yacimientos se corresponden al nivel superior (Ortega *et al.*, 2014). La Cueva del Mirón, excavada en calizas cretácicas de las facies Urgon (Straus y González-Morales, 2012), se localiza en la Cordillera Cantábrica, en el denominado Monte Pando, al este de la provincia de Cantabria (España), a unos 2km al sureste de Ramales de la Victoria, en el valle del Río Asón (Fig. 1).



Figura 1. Localización geográfica de los sitios paleontológicos estudiados.

Figura 1. Localização geográfica das jazidas estudadas.

Figure 1. Geographic location of the studied paleontological sites.

3. Material y métodos

3.1 Materiales

En este estudio se han usado 373 ejemplares del primer molar inferior (m1), correspondientes a 13 especies de arvicolinos de la Península Ibérica de los niveles estratigráficos holocénicos de Galería de las Estatuas y Portalón de la Sierra de Atapuerca (Burgos) y Cueva del Mirón (Cantabria), todos ellos con una cronología aproximada de Pleistoceno superior-Holoceno (véase la Tabla 1 del Anexo). En este trabajo, aún con la controversia existente respecto a su sistemática, trataremos a los subgéneros como géneros por motivos descriptivos. De las 13 especies consideradas, nueve de ellas (*Microtus arvalis*, *M. agrestis*, *Lasiopodomys gregalis*, *Alexandromys oecionomus*, *Terricola gerbei*, *T. pyrenaeicus*, *T. duodecimcostatus*, *T. lusitanicus* e *Iberomys cabreriae*) estarán aquí referidas como *Microtus sensu lato* (*Microtus s.l.*) y, finalmente, se ha usado *Chionomys nivalis*, *Clethrionomys glareolus*, *Arvicola sapidus* y *A. amphibius* (= *terrestris*) (estas dos últimas, o bien solo *A. sapidus*, usadas como grupo externo en los análisis).

3.2 Metodología

Se ha construido una matriz de 17 caracteres morfológicos, analizando la morfología del m1 (Tabla 1), siguiendo los trabajos de van der Meulen (1973) y Cuenca-Bescós *et al.* (2014). Esta matriz, codificada en 0/1/2 según la presencia, ausencia, o estado intermedio del carácter, se ha analizado mediante búsqueda tradicional en TNT v.1.5 (Goloboff y Catalano, 2016) y un total de 100 réplicas, de las que se han guardado 100 árboles por réplica. En estos análisis se ha utilizado *A. sapidus* como grupo externo.

Una vez obtenido el cladograma se ha realizado el cálculo de los valores de soporte de ramas de tipo parsimonia como el soporte de Bremer o *decay index* (Bremer, 1994) y Bootstrap estándar (Felsenstein, 1985), considerándose poco soportados los nodos con valor inferior de 4-5 en Bremer y de 75 en Bootstrap.

Para los análisis filogenéticos moleculares se han obtenido las secuencias disponibles en Genbank de citocromo b (*cytb*) y se han alineado con MUSCLE implementado en Mega v.10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018), el alineamiento final de secuencias constaba de una secuencia para cada una de las especies (véase la Tabla 2 del Anexo). La filogenia se ha realizado por Máxima Verosimilitud (Fisher, 1922), utilizando RAXML v.8.2.11 (Stamatakis, 2014), sin particiones y llevando a cabo un total de 100 Bootstraps. La separación de los nucleótidos por la posición en el codón se ha realizado con Dambe v.7.0.5 (Xia, 2017) y con PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2016) se ha inferido el mejor esquema de particiones y modelo evolutivo especies (véase la Tabla 3 del Anexo). A continuación, se ha inferido la filogenia usando RAXML, con la configuración anteriormente descrita, y un análisis de Inferencia Bayesiana con MrBayes v.3.2.3 (Ronquist *et al.*, 2012), mediante 10 millones de generaciones, registrándose cada 10.000, eliminando un 10% como *burn-in* y utilizando *A. sapidus* y *A. amphibius* como grupo externo. Todos los análisis se han realizado en la plataforma online CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010) y los resultados se han visualizado en Figtree v.1.4.3 (Rambaut, 2009). Se ha considerado que un nodo está soportado si los valores de Bootstrap y Probabilidad Posterior (PP) son superiores a 75 o 0,95 respectivamente.

Finalmente, los datos morfológicos y genéticos se han analizado conjuntamente con el criterio de parsimonia en TNT, con *A. sapidus* como grupo externo, realizándose el cálculo de valores soporte del tipo soporte de Bremer y Bootstrap estándar. También se ha realizado un análisis de Inferencia Bayesiana en MrBayes usando los datos con particiones y ambas especies de *Arvicola* como grupo externo. La partición de los datos morfológicos se analizó usando el modelo Mkv (Lewis, 2001) con la corrección para el sesgo de adquisición (*coding = informative*) y tasas iguales entre caracteres/sitios.

4. Resultados

4.1 Análisis morfológico

Mediante el análisis tradicional por TNT (véase la Fig. 1 del Anexo) de los caracteres morfológicos (Tabla 1) se observa que *Terricola* forma el grupo hermano de los demás *Microtus s.l.* + *Chionomys*. Aunque los valores bajos de soportes Bremer y Bootstrap no permiten realizar afirmaciones concluyentes, se aprecia un clado formado por *M. arvalis* y *M. agrestis*, así como un grupo formado por estos y *C. nivalis* e *I. cabreriae*. *A. oecionomus* y *L. gregalis* completan un clado formado por las otras especies de *Microtus* y *Chionomys* + *Iberomys*.

4.2 Análisis moleculares

Se han obtenido tres árboles filogenéticos correspondientes a los análisis de Máxima Verosimilitud (con y sin particiones) y por Inferencia Bayesiana con particiones (véase la Fig. 2 del Anexo). La topología obtenida en cada resultado es idéntica, a excepción del análisis de Máxima Verosimilitud sin particiones, en el que *L. gregalis*, junto a *A. oeconomus*, forman un clado hermano al de *M. arvalis* y *M. agrestis*. En las topologías de los otros análisis, *L. gregalis* se ubica como clado hermano a los demás *Microtus s.l.*. En general, los nodos presentan valores de soporte muy bajos, pero se aprecia que *I. cabreræ* forma un clado no soportado con *Terricola*, cuyas especies sí forman un clado soportado por Bootstrap y PP en los tres análisis, con los clados *T. gerbei-T. pyrenaicus* y *T. duodecimcostatus - T. lusitanicus*. El clado *Microtus s.l.* no está soportado, aunque sí por Inferencia Bayesiana el nodo de *Microtus s.l.* excluyendo *L. gregalis* (PP=0.98), mientras que *Chionomys* es el clado hermano a *Microtus s.l.* (82/84/1).

4.3 Análisis combinado molecular - morfológico

En el análisis combinado molecular - morfológico usando el criterio de parsimonia en TNT (Fig. 2a) se observa un incremento generalizado del soporte de los nodos comunes respecto al análisis de caracteres morfológicos (Anexo 4), además de presentar una topología diferente (*Chionomys* como clado hermano a *Microtus s.l.*) y una mejor resolución del clado *Terricola*, relaciones que también se observan en el árbol generado por Inferencia Bayesiana (Fig. 2b). La topología del árbol de ambos análisis combinados presenta una configuración similar a la del estudio exclusivamente molecular, aunque se observan ramas no soportadas por Bootstrap, en la mayoría de casos con valores menores de 50. Estos nodos sí se encuentran soportados por Bremer, con valores de entre 4 y 6,

pero no es así usando Inferencia Bayesiana. *Terricola* y sus especies son los únicos clados con suficiente soporte Bremer, Bootstrap y PP en ambos análisis.

La topología del árbol obtenido con Inferencia Bayesiana varía en la posición de *L. gregalis* respecto al obtenido con TNT, aunque se correspondería con la variación observada usando RAXML sin particiones (Anexo 5).

5. Discusión

La mejora de los estudios mediante ADN antiguo, el mayor entendimiento de los caracteres morfológicos y su evolución y el incremento paulatino del registro fósil ha hecho que vayan incorporándose análisis combinados de morfología - genética en estudios taxonómicos de taxones extintos o con representantes actuales y fósiles, lo que permite evaluar las relaciones filogenéticas de determinados grupos biológicos desde perspectivas diferentes (e.g. Bibi *et al.*, 2012; Bover *et al.*, 2018). Estos estudios pueden ser importantes en aquellos grupos en los que las filogenias moleculares no son totalmente resolutivas, como es *Microtus s.l.*, además de que permiten incorporar al análisis especies de las que no se puede obtener ADN.

En este estudio la principal diferencia observada entre los análisis radica en los valores de soporte de los nodos, obviamente por la realización de análisis de Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud (e.g. Douady *et al.*, 2003). Un ejemplo es el nodo del clado *Microtus s.l.* (Fig. 2 del Anexo) en el que mientras los valores de soporte Bootstrap para los datos con y sin particiones, no proporcionan suficiente soporte (31 y 36 respectivamente), el análisis bayesiano sí (PP=0.98).

Las diferencias en topología son compatibles con la falta de soporte de los nodos en determinadas zonas, por ejemplo, en los clados que conforman las especies de *Microtus*.

Tabla 1. Caracteres de las 13 especies de arvicolas estudiadas. 1. Ausencia de raíces, 2. Esmalte diferenciado, 3. Esmalte tipo Mimomys, 4. Esmalte tipo Microtus, 5. Zonas libres de esmalte, 6. Tercer triángulo (3T) + cúspide anterior (CA), 7. 5T cerrado, 8. 4T+5T abiertos o cerrados con 6T y 7T, 9. Segundo rombo pitimiano, 10. Primer rombo pitimiano, 11. Cuarto entrante lingual (4li) probergente, 12. Ausencia de 6T, 13. Islote de esmalte en la CA, 14. Asimetría labio-lingual (LaLi), 15. Gancho lingual proximal, 16. Cuello antes de CA, 17. 4 o 5 entrantes linguales.

Tabela 1. Caracteres das 13 espécies de arvicolas estudadas. 1. Ausência de raiz, 2. Esmalte diferenciado, 3. Esmalte tipo Mimomys, 4. Esmalte tipo Microtus, 5. Zonas livres de esmalte, 6. Terceiro triângulo (3T) + cúspide anterior (CA), 7. 5T fechado, 8. 4T+5T abertos ou fechados com 6T e 7T, 9. Segundo rombo pitimiano, 10. Primeiro rombo pitimiano, 11. Quatro ângulo reentrante (4li) proeminente, 12. Ausência de 6T, 13. Ilhéu de esmalte na CA, 14. Assimetria labio-lingual (LaLi), 15. Gancho lingual proximal, 16. Colo antes de CA, 17. 4 ou 5 ângulos reentrantes linguais.

Table 1. Observed characters of the 13 species of arvicolines studied. 1. Absence of roots, 2. Differentiated enamel, 3. Mimomys-type enamel, 4. Microtus-type enamel, 5. Enamel-free zones, 6. Third triangle (3T) + anterior cusp (CA), 7. 5T closed, 8. 4T + 5T open or closed with 6T and 7T, 9. Second pitimian rhombus, 10. First pitimian rhombus, 11. Probergent fourth lingual entrant (4li), 12. Absence of 6T, 13. Enamel islet in the CA, 14. Labial-lingual (LaLi) asymmetry, 15. Proximal lingual hook, 16. Neck before AC, 17. 4 or 5 lingual entrances.

Especies	Caracteres																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Arvicola sapidus</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
<i>Arvicola amphibius</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
<i>Clethrionomys 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>Lasiopodomys gregalis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1
<i>Alexandromys oeconomus</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	0	0	0	1
<i>Microtus agrestis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	0	2	1
<i>Microtus arvalis</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	0	2	1
<i>Iberomys cabreræ</i>	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	1	2	0	1	1	0	1
<i>Terricola lusitanus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1
<i>Terricola duodecimcostatus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1
<i>Terricola pyrenaicus</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1

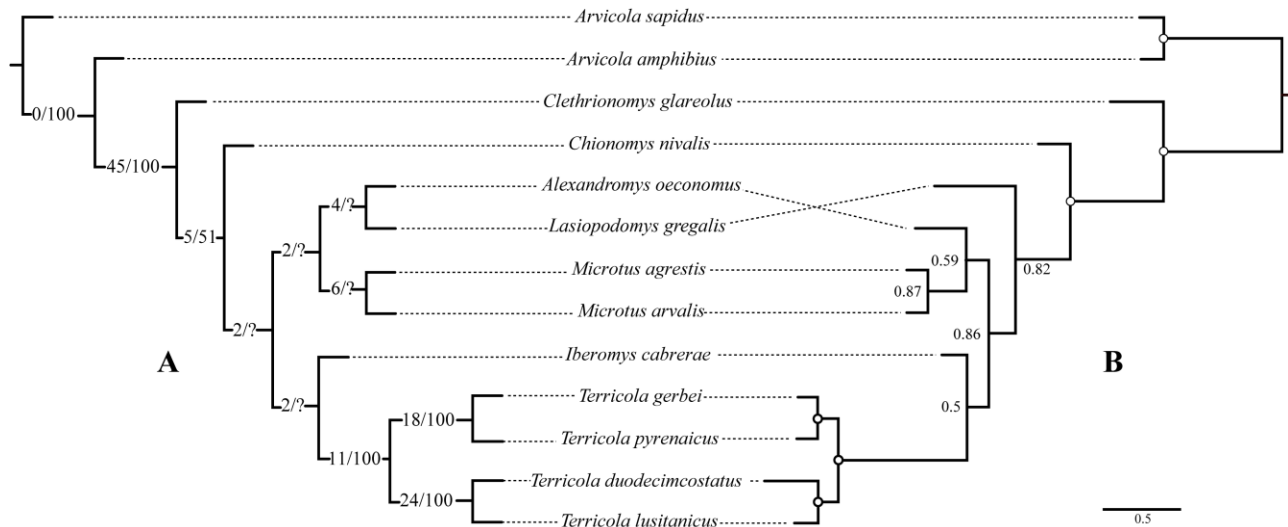


Figura 2. Filogenias combinadas utilizando los caracteres morfológicos y genéticos. (A) Análisis filogenético tradicional usando TNT; los números en los nodos indican los valores de soporte Bremer a la izquierda, y Bootstrap a la derecha. (B) Análisis filogenético mediante Inferencia Bayesiana por MrBayes. Los valores de soporte inferiores a 50 en Bootstrap se han representado por un interrogante, y el soporte total por Probabilidad Posterior (PP) en Inferencia Bayesiana por un círculo blanco.

Figura 2. Filogenias combinadas utilizando os caracteres morfológicos e genéticos. (A) Análise filogenética tradicional obtida com o uso de TNT; os números dos nodos indicam os valores de suporte Bremer (à esquerda) e Bootstrap (à direita). (B) Análise filogenética mediante a utilização de Inferência bayesiana por MrBayes. Os valores de suporte inferiores a 50 em Bootstrap estão representados por um ponto de interrogação, e os valores de suporte total por Probabilidade Posterior (PP) em Inferência bayesiana por um círculo branco.

Figure 2. Combined phylogenies using morphological and genetic characters. (A) Traditional phylogenetic analysis performed by TNT, Bremer support values to the left and Bootstrap to the right. (B) Phylogenetic analysis through Bayesian Inference by MrBayes, the support values lower than 50 in Bootstrap have been represented by a question mark and the total support by posterior probability (PP) in Bayesian Inference by a white circle.

Uno de los cambios más notables está en la posición de *Terricola* en la filogenia de caracteres morfológicos, siendo clado hermano de los demás *Microtus s.l.*, aunque poco soportado (Fig. 1 del Anexo), respecto a las moleculares y combinadas (Fig. 2 y Fig. 2 del Anexo). El análisis filogenético de caracteres morfológicos presenta mayores discrepancias con los árboles con caracteres moleculares. Es relevante, aun con la falta de soporte en los nodos, la posición de *C. nivalis*, formando un clado con *I. cabreræ*, así como con *A. oeconomus* y *L. gregalis*, mientras que en los demás análisis adquiere una posición como clado hermano de *Microtus s.l.*, observada en otros estudios basados en secuencias de *cytb* (e.g. Jaarola et al., 2004; Barbosa et al., 2013).

Destacar también que mientras los géneros aquí usados como *Microtus* y *Terricola* forman clados monofiléticos (con un soporte diferente y con la posición dudosa de *L. gregalis*) en los estudios combinados y moleculares, no lo serían usando datos morfológicos. A su vez, se ha propuesto elevar el subgénero *Iberomys* a la categoría taxonómica de género (Cuenca-Bescós et al., 2014), pero con los resultados aquí obtenidos no se puede verificar ni desmentir esta atribución taxonómica, tal como pasa con la atribución de *L. gregalis* a un género diferente a *Microtus* (Abramson y Lissovsky, 2012).

Respecto a *L. gregalis*, se observa un mayor valor de soporte de Bremer de su relación con *A. oeconomus* en el análisis combinado (Fig. 2a), aunque puede deberse a que este análisis suele sobreestimar los valores de soporte (Müller, 2005). Siendo así, las ramas de *Microtus* soportadas con valores de 4 y 6 se corresponden a los clados *L. gregalis* - *A. oeconomus* y *M. arvalis* - *M. agrestis*. Se aprecia que la adición de los caracteres genéticos incrementa el nivel de soporte en relación al observado en el análisis morfológico (Fig. 1 del Anexo), tanto en los valores de soporte Bremer como en los de Bootstrap.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos corroboran el efecto que la alta tasa evolutiva y especiación de estos arvicolininos tiene sobre la dificultad de obtener filogenias resueltas. En este artículo se corrobora la complejidad de la sistemática de *Microtus s.l.* y que la capacidad resolutoria de los datos morfológicos y moleculares usados en esta aproximación preliminar combinada es insuficiente para establecer de forma clara las relaciones entre los diferentes géneros de *Microtus s.l.*

Todo ello sugiere que será necesaria la integración de una mayor cantidad de caracteres morfológicos y genes mitocondriales y nucleares en los estudios filogenéticos para alcanzar resultados viables, así como la incorporación de taxones extintos que permitan aportar una visión más amplia de la diversidad morfológica y molecular pasadas.

Agradecimientos

Este estudio se incluye en los proyectos de investigación Aragossaurus: recursos geológicos y medioambientales (E18_20R, Gobierno de Aragón) y MICINN (PGC2018-093925-B-C33). Por último, agradecer a los revisores de este artículo, Juan Manuel López-García y Adriana Oliver-Pérez.

Referencias

- Abramson, N. I., Lissovsky, A. A., 2012. Subfamily arvicolininae. In: Pavlinov, I. Y., Lissovsky, A. A., (Eds.), *The Mammals of Russia: a Taxonomic and Geographic Reference*. Archive of the Zoological Museum of MSU, KMK Scientific Press, Moscow, **52**: 220-276.
- Baca, M., Popovic, D., Lemanik, A., Baca, K., Horacek, I., Nadachowski, A., 2019. Highly divergent lineage of narrow-headed vole from the Late

- Pleistocene Europe. *Scientific Reports*, **9**: 17799. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53937-1>.
- Baca, M., Popović, D., Baca, K., Lemanič, A., Karolina, D., Horáček, I., López-García, J. M., Bañuls-Cardona, S., Pazonyi, P., Desclaux, E., Crégut-Bonnoure, E., Berto, C., Mauch Lenardić, J., Miękina, B., Murelaga, X., Cuenca-Bescós, G., Krajcarz, M., Marković, Z., Petculescu, A., Wilczyński, J., Knul, V. M., Stewart, J. R., Nadachowski, A., 2020. Diverse responses of common vole (*Microtus arvalis*) populations to Late Glacial and Early Holocene climate changes – evidence from ancient DNA. *Quaternary Science Reviews*, **233**: 106239. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2020.106239>.
- Barbosa, S., Pauperio, J., Searle, J. B., Alves, P. C., 2013. Genetic identification of Iberian rodent species using both mitochondrial and nuclear loci: application to noninvasive sampling. *Molecular Ecology Resources*, **13**(1): 43-56. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12024>.
- Bibi, F., Vrba, E., Fack, F., 2012. A new African fossil caprin and a combined molecular and morphological bayesian phylogenetic analysis of caprini (Mammalia: Bovidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **25**(9): 1843-1854. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02572.x>.
- Bover, P., Mitchell, K. J., Llamas, B., Rofes, J., Thomson, V. A., Cuenca-Bescós, G., Alcover, J.A., Cooper, A., Pons, J., 2018. Molecular phylogenetics supports the origin of an endemic Balearic shrew lineage (Nesiotites) coincident with the Messinian Salinity Crisis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **125**: 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.028>.
- Bremer, K., 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, **10**: 295-304. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1994.tb00179.x>.
- Chaline, J., Brunet-Lacomte, P., Montuire, S., Viriot, L., Courant, F., 1999. Anatomy of arvicoline radiation (Rodentia): paleogeographical, paleoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici*, **36**(4): 239-267.
- 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**(4): 481-497. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12053>.
- Cuenca-Bescós, G., Blain, H. A., Rofes, J., López-García, J. M., Lozano-Fernández, I., Galán, J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2015.09.006>.
- 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**(2): 248-254. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg042>.
- 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)*. Unpublished PhD thesis. University of Valencia, 259 p.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**(4): 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Fisher, R. A., 1922. On the mathematical foundations of the theoretical statistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A*, **222**(594-604): 309-368. <https://doi.org/10.1098/rsta.1922.0009>.
- Goloboff, P. A., Catalano, S. A., 2016. TNT versión 1.5, including a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics*, **32**(3): 1-18. <https://doi.org/10.1111/cla.12160>.
- Jaarola, M., Martinková, N., Gündüz, I., Brunhoff, C., Zima, J., Nadachowski, A., Amori, G., Bulatova, N. S., Chondropoulos, B., Fragedakis-Tsolis, S., González-Esteban, J., López-Fuster, M. J., Kandaurov, A. S., Kefelioglu, H., Mathias, M. L., Villate, I., Searle, J. B., 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**(3): 647-663. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.015>.
- 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**(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- 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**(3): 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- Lewis, P. O., 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, **50**(6): 913-925. <https://doi.org/10.1080/106351501753462876>.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*. IEEE, New Orleans, 45-52.
- Müller, K. F., 2005. The efficiency of different search strategies in estimating parsimony jackknife, Bootstrap, and Bremer support. *BMC Evolutionary Biology*, **5**: 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-58>.
- 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. In: Gutiérrez, F., Gutiérrez, M. (Eds.), *Landscapes and Landforms of Spain*. World Geomorphological Landscapes. Springer: Dordrecht, 101-110.
- Rambaut, A., 2009. Figtree versión 1.4.3, programa distribuido por el autor en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- 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**(3): 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**(9): 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- Straus, L. G., González Morales M. R., 2012. *El Mirón Cave Cantabrian Spain*. University of New Mexico Press: New Mexico, 472.
- 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.
- Xia, X., 2017. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. *Journal of Heredity*, **108**(4): 431-437. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx033>.

Anexo

Anexo

Appendix

Tabla 1. Lista de las muestras fósiles utilizadas en este trabajo, así como su distribución en los yacimientos estudiados.

Tabela 1. Lista das amostras fósseis utilizadas neste trabalho, assim como a sua distribuição nas jazidas estudadas.

Table 1. List and number of the fossil samples used in this work, and their distribution in the studied paleontological sites.

Especies	Yacimientos			Total
	Galería de las Estatuas	Portalón	Cueva del Mirón	
<i>Arvicola sapidus</i>	8	1	0	9
<i>Arvicola amphibius</i>	0	1	0	1
<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	0	2	2
<i>Iberomys cabreræ</i>	0	2	0	2
<i>Terricola pyrenaicus-gerbei</i>	0	0	12	12
<i>Terricola duodecimcostatus</i>	6	1	0	7
<i>Terricola lusitanicus</i>	19	0	15	34
<i>Microtus arvalis</i>	129	2	17	148
<i>Microtus agrestis</i>	97	2	13	112
<i>Alexandromys oeconomus</i>	0	4	17	21
<i>Lasiopodomys gregalis</i>	0	0	3	3
<i>Chionomys nivalis</i>	0	2	20	22
Total	259	15	99	373

Tabla 2. Números de identificación (*Accession Numbers*) en Genbank de las diferentes secuencias de *cytb* de Arvicolinos para los estudios filogenéticos aquí realizados.

Tabela 2. Números de identificação (*Accession Numbers*) no Genbank das diferentes sequências de *cytb* de Arvicolinos para os estudos filogenéticos aqui realizados.

Table 2. Genbank accession numbers of the Arvicolinae *cytb* sequences for phylogenetic inferences performed in this study.

Especies	ID GenBank
<i>Arvicola sapidus</i>	FJ539341
<i>Arvicola amphibius</i>	AF159400
<i>Chionomys nivalis</i>	AY513845
<i>Clethrionomys glareolus</i>	AF119272
<i>Iberomys cabreræ</i>	KY380573
<i>Microtus agrestis</i>	AY167166
<i>Microtus arvalis</i>	KX380002
<i>Lasiopodomys gregalis</i>	KP190243
<i>Alexandromys oeconomus</i>	AY219981
<i>Terricola duodecimcostatus</i>	JX424124
<i>Terricola gerbei</i>	AY513800
<i>Terricola lusitanicus</i>	JX424133
<i>Terricola pyrenaicus</i>	AJ717748

Tabla 3. Particiones óptimas inferidas por PartitionFinder para un total de 1140 pb en las 13 especies de Arvicolinae usadas en este estudio. Ver Tabla 2 de este anexo para los detalles de las secuencias. El esquema de particiones se ha inferido usando los modelos de sustitución nucleotídica implementados en cada software usado (RAxML y MrBayes).

Tabela 3. Partição ótima inferida com PartitionFinder para um total de 1,140 bp nas 13 espécies de Arvicolinae utilizadas neste estudo. Ver Anexo 2 para os detalhes das sequências. O esquema de particionamento foi inferido a partir da aplicação dos modelos de substituição de nucleótidos implementados em cada um dos softwares utilizados (RAxML e MrBayes).

Table 3. Optimal partitioning scheme inferred with PartitionFinder for a total alignment of 1,140 bp in the 13 Arvicolinae species used in this study. See Appendix 2 for accession number details. Partitioning scheme inferred selecting the nucleotide substitution models implemented in each software (RAxML and MrBayes).

Partición	Modelo Substitución RAxML	Modelo Substitución MrBayes	Posición
1	GTR+G	K80+G	cytb_1
2	GTR+G	HKY+Y	cytb_3
3	GTR+G	GTR+G	cytb_2

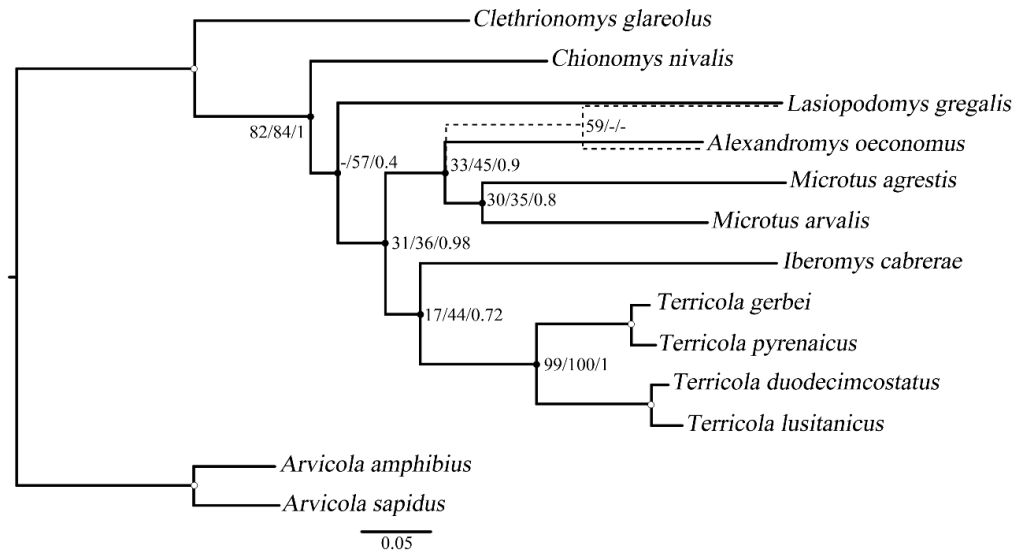


Figura 1. Cladograma por búsqueda tradicional realizado por TNT con los caracteres morfológicos. Los números en los nodos indican los valores de soporte obtenidos por Bremer (izquierda) y Bootstrap (derecha). Los interrogantes indican valores de Bootstrap < 50.

Figura 1. Cladograma obtido através de tradicional search por TNT com os caracteres morfológicos. Os números presentes nos nodos indicam os valores de suporte obtidos por Bremer (esquerda) e Bootstrap (direita). Os pontos de interrogação correspondem a valores de Bootstrap < 50.

Figure 1. Cladogram obtained by traditional search using TNT with the morphological characters. Numbers in nodes correspond to Bremer (left) and Bootstrap (right) support values. Question marks indicate Bootstrap values < 50.

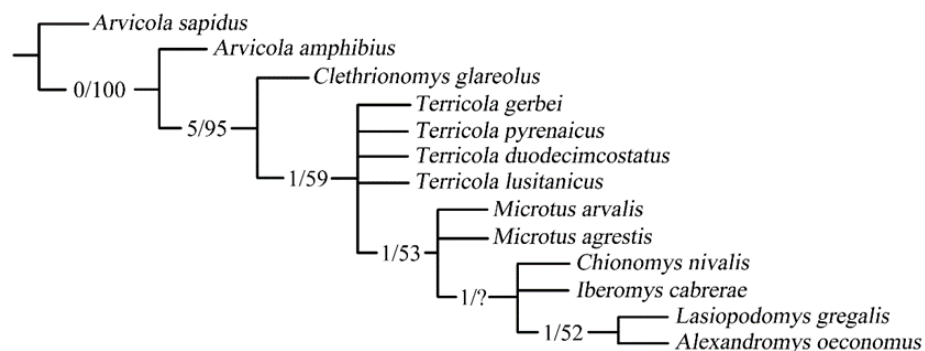


Figura 2. Árbol filogenético de los análisis moleculares de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana realizados por RAxML y MrBayes (con y sin particiones). Los valores en los nodos indican los valores de Bootstrap en Máxima Verosimilitud sin particiones/Máxima verosimilitud con particiones/Probabilidad Posterior Bayesiana, respectivamente. En línea discontinua se ha indicado la variación en la topología del árbol en los análisis por RAxML sin particiones. Los nodos con soporte total (Bootstrap=100, Probabilidad Posterior=1) se han representado con un círculo blanco.

Figura 2. Árvore filogenética obtida nas análises moleculares de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana realizadas em RAxML e MrBayes (com e sem partições). Os valores presentes nos nodos indicam os valores de Bootstrap na Máxima Verossimilhança sem partições/Máxima Verossimilhança com partições/Probabilidade Posterior Bayesiana, respectivamente. Na linha descontínua é indicada a variação na topologia da árvore nas análises realizadas por RAxML sem partições. Os nodos com suporte total (Bootstrap=100, Probabilidade Posterior=1) estão representados por um círculo branco.

Figure 2. Maximum Likelihood and Bayesian molecular phylogenetic trees inferred using RAxML and MrBayes. Values in nodes indicate support using Bootstrap in Maximum Likelihood without partitions/Maximum Likelihood with partitions/Bayesian Posterior Probability, respectively. Dashed lines indicate the change in the topology observed in the tree inferred using Maximum Likelihood in the unpartitioned dataset. Nodes with full support (Bootstrap = 100, Posterior Probability = 1) have been indicated with a white circle.