

**Elucidando los patrones de variación genética y fenotípica de la Ardilla de Cola Roja,  
*Notosciurus Granatensis*, en Colombia.**

**Javier Enrique Colmenares Pinzón**

**Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Biología**

**Director**

**Víctor Hugo Serrano Cardozo**

**Ph.D en Ciencias Biológicas**

**Co-Director**

**Raúl Ernesto Sedano Cruz**

**Ph.D en Ecología y Biología evolutiva**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Escuela de Biología**

**Maestría en Biología**

**Bucaramanga**

**2019**

### **Dedicatoria**

A mi madre y mi hermana por haber sido mi compañía y apoyo incondicional durante este largo, pero fructífero proceso. Ellas son el tesoro más valioso que tengo, e indudablemente, esta tesis fue inspirada en ellas dos.

### **Agradecimientos**

El primer y más importante agradecimiento se lo quiero dar a mi madre, quien ha luchado durante 30 largos años en pro de mi crecimiento como persona. Solo ella es testigo del gran esfuerzo que he hecho para llegar hasta este punto de mi carrera, siempre inspirado en sus palabras y en su historia de vida. Le agradezco infinitamente por motivarme en todos los proyectos que he llevado a cabo durante mi desarrollo académico-profesional, por aguantarme, consolarme y alentarme en mis malos momentos, y por celebrar siempre mis triunfos con la misma alegría que yo los celebro.

A mi hermana, porque después de mi madre ha sido mi única familia durante muchos años. Le agradezco por su enorme contribución a mi crecimiento personal, y por apoyarme anímicamente y económicamente durante mi crecimiento académico-profesional.

Al Profesor Víctor Hugo Serrano Cardozo, quien ha sido como un padre para mí durante los años en la universidad. A él le agradezco por confiar tanto en mí y por ser el artífice principal de mi crecimiento académico-profesional, siempre brindándome las herramientas necesarias, orientándome en todas mis decisiones y respaldando cada proyecto que he llevado a cabo. Su carisma, humor, nobleza y gran profesionalismo como docente han sido una inspiración valiosa para mí, por lo que lo considero un gran ejemplo a seguir en lo que me queda de camino en esta bonita carrera. Gracias Profe por dar rienda suelta a mi imaginación durante esta tesis, nunca hubo un no de su parte ante cada decisión que tomé durante la ejecución de este largo proyecto, aunque eso implicara más tiempo, dinero o esfuerzo.

A la Profesora Martha Patricia Ramírez Pinilla, quien también me ha inspirado mucho en este proceso y me ha ofrecido valiosos consejos.

A todos los docentes de la escuela de biología de la Universidad Industrial de Santander, porque de una u otra forma han aportado aspectos fundamentales durante mi crecimiento académico-profesional

A la Universidad Industrial de Santander, porque ha sido mi alma máter durante 12 largos pero emocionantes años. Soy profesional gracias a la educación pública y de calidad que recibí en esta institución, y me siento orgulloso de ella en cada lugar que visito.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes he vivido experiencias muy gratificantes que me han ayudado en mi crecimiento, no solo académico-profesional, sino también personal. A Elson Meneses Pelayo por sacarme tantas risas con sus ocurrencias durante las salidas de campo, por ayudarme a obtener material importante para este proyecto, por tomar las fotografías de los especímenes para los anexos y por ser una buena contraparte en largos debates académicos que en últimas han fortalecido mis conocimientos. A Jefferson Sánchez, Laura Vargas, Angela Villamizar y Cristian Kakua por ser excelentes compañeros, siempre educados y dispuestos a aprender de mí y a brindarme sus conocimientos. A María Angélica Meza y Lineth Velázquez por su colaboración en la organización de buena parte del material resultante de este proyecto y por haber sido excelentes pupilas durante los dos últimos años.

Al Profesor Raúl Ernesto Sedano Cruz, por aceptar codirigir este proyecto desde la distancia y por sus valiosos aportes para la consolidación final del documento. Sus ideas, capacidad de análisis y sobre todo su capacidad de redacción han sido determinantes para lograr este proceso.

A Juan Fernando Diaz-Nieto, de la Universidad EAFIT, por ser uno de los pocos investigadores colombianos que me abrió las puertas al comienzo de este proceso, aportando

conocimientos que me facilitarían encaminar mi investigación. Gracias a él y a sus estudiantes pude tener claras muchas ideas de laboratorio a pesar de que toda esta experiencia era nueva para mí.

A Juan Flórez por la elaboración de las ilustraciones de especímenes incluidas en el trabajo.

A Andreas S. Chavez, de la Ohio State University, por sus observaciones sobre mi proyecto en una etapa temprana, por su orientación en la parte de calibración de las filogenias y por su disponibilidad para recibirme en su laboratorio y enseñarme aspectos importantes sobre genómica y evolución en ardillas. Espero algún día poder visitarlo y aprender mucho.

A Gislene Lopes Goncalves, de la Universidad Federal do Rio Grande do Sul, por sus observaciones y recomendaciones para completar con éxito el proceso de amplificación del marcador nuclear *MC1R*.

A la compañía Biomatters por la donación de una licencia completa de cuatro meses del programa Geneious Prime.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	20
1. Objetivos .....	35
1.1 Objetivo general .....	35
1.2 Objetivos específicos .....	36
2. Hipótesis .....	36
3. Materiales y Métodos.....	37
3.1 Recolecta de especímenes.....	37
3.2 Descripción fenotípica y asignación taxonómica de los especímenes recolectados.....	39
3.2.1 Subespecies propuesta taxonómica 1 (Nitikman, 1985; Thorington <i>et al.</i> , 2012).....	40
3.2.2 Subespecies propuesta taxonómica 2 (De Vivo y Carmignotto, 2015). .....	42
3.3 Trabajo de laboratorio (Extracción, amplificación y secuenciación de ADN).....	44
3.4 Análisis de información genética mitocondrial (neutral).....	48
3.4.1 Diversidad genética mitocondrial. ....	48
3.4.2 Filogenia mitocondrial. ....	49
3.4.3 Identificación de especies putativas dentro de <i>Notosciurus granatensis</i> . ....	52
3.4.4 Estructuración jerárquica de la variación genética mitocondrial. ....	53
3.4.5 Posibles causas de la variación genética mitocondrial. ....	54
3.5 Análisis filogenéticos combinados (Mitocondrial y Nuclear) .....	56
3.6 Análisis del contexto temporal de la diversificación de <i>Notosciurus granatensis</i> .....	58

3.7 Modelamiento biogeográfico: .....	60
3.8 Análisis de la Variación genética no neutral ( <i>MC1R</i> : gen candidato implicado en la coloración del pelaje) .....	61
3.8.1 Reconstrucción de la proteína (Receptor-1 de la Melanocortina). .....	61
3.8.2 Inspección visual de los polimorfismos. ....	61
3.8.3 Diversidad genética. ....	62
3.8.4 Estructuración jerárquica de la variación en el <i>MC1R</i> . ....	63
3.9 Análisis estadístico de la variación fenotípica .....	64
3.9.1 Selección de variables. ....	64
3.9.2 Patrones ambientales y fenotípicos. ....	69
3.9.3 Relación Ambiente-Fenotipo. ....	69
4. Resultados .....	70
4.1 Recolecta de especímenes .....	70
4.2 Descripción fenotípica y asignación taxonómica de los especímenes recolectados .....	74
4.3 Trabajo de laboratorio (Extracción, amplificación y secuenciación de ADN) .....	79
4.4 Análisis de la información genética mitocondrial .....	81
4.4.1 Diversidad genética mitocondrial. ....	81
4.4.2 Filogenia mitocondrial. ....	84
4.4.3. Identificación de especies putativas dentro de <i>Notosciurus granatensis</i> . ....	87
4.4.4 Estructuración jerárquica de la variación genética mitocondrial. ....	91
4.4.5 Posibles causas de la variación genética mitocondrial. ....	94
4.5 Análisis filogenéticos combinados (Mitocondrial y Nuclear) .....	94
4.6 Análisis del contexto temporal de la diversificación de <i>Notosciurus granatensis</i> .....	99

4.7 Modelamiento biogeográfico .....	102
4.8. Análisis de la variación genética no neutral ( <i>MC1R</i> : gen candidato implicado en la coloración del pelaje) .....	104
4.8.1 Reconstrucción de la proteína ( <i>Receptor-1 de la Melanocortina</i> ).....	104
4.8.2 Inspección visual de los polimorfismos. ....	104
4.8.3 Diversidad genética.....	109
4.8.4 Estructuración jerárquica de la variación en el <i>MC1R</i> .....	112
4.9. Análisis estadístico de la variación fenotípica .....	114
4.9.1 Selección de variables.....	114
4.9.2 Patrones medioambientales y fenotípicos. ....	115
4.9.3 Relación Ambiente-Fenotipo. ....	119
5. Discusión.....	120
6. Conclusiones .....	175
Referencias Bibliográficas .....	180
Apéndices.....	193

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Relación de los marcadores moleculares amplificados, incluyendo los cebadores empleados y las características químicas de las reacciones de PCR. ....	46
Tabla 2. Relación de los taxa incluidos en los análisis filogenéticos con marcadores mitocondriales. n. Número de secuencias; GB. GenBank; Etra. Este trabajo; In. Grupo Interno; Out. Grupo Externo.....	49
Tabla 3. Relación de los taxa incluidos en los análisis filogenéticos con los marcadores CytB e <i>IRBP</i> . n. Número de secuencias; GB. GenBank; Etra. Este trabajo. ....	57
Tabla 4. Listado de variables fenotípicas tomadas en especímenes de <i>N. granatensis</i> . ....	65
Tabla 5. Listado de variables ambientales medidas.....	66
Tabla 6. Subespecies encontradas en las localidades de recolecta, según las propuestas de Nitikman (1985), Thorington et al. (2012) y De Vivo y Carmignotto (2015).....	74
Tabla 7. Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir de los marcadores mitocondriales <i>Cytb</i> y <i>D-loop</i> .....	84
Tabla 8. Resumen de los estadísticos de delimitación de especies implementados en el programa Geneious R11 (Biomatters Limited), los cuales fueron calculados usando como base la topología Bayesiana del marcador <i>Cytb</i> .....	88
Tabla 9. Divergencia intra e inter-grupal (calculada como la distancia genética corregida según el modelo Kimura-2-parámetros X 100) para el marcador mitocondrial Citocromo B ( <i>Cytb</i> ). ...	90

Tabla 10. Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir del marcador mitocondrial <i>Cytb</i> para cada uno de los haplogrupos/clados/especies putativas dentro de <i>N. granatensis</i> .....	91
Tabla 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de acuerdo con 4 hipótesis de estructuración dentro de <i>N. granatensis</i> : .....	93
Tabla 12. Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir del alineamiento global del marcador nuclear <i>MC1R</i> , y en alineamientos individuales de cada uno de los haplogrupos/clados/especies putativas dentro de <i>N. granatensis</i> . .....	111
Tabla 13. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de acuerdo con 4 hipótesis de estructuración dentro de <i>N. granatensis</i> : .....	113
Tabla 14. Variables medioambientales con mayor contribución a los 3 primeros factores del Análisis de Componentes Principales.....	114

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1.</i> Subespecies de <i>Notosciurus granatensis</i> distribuidas en Colombia y países vecinos, según las hipótesis taxonómicas de Nitikman (1985), Thorington et al. (2012) y de Vivo y Carmignotto (2015).....	44
<i>Figura 2.</i> Variables de coloración del pelaje seleccionadas para análisis .....	68
<i>Figura 3.</i> Localidades de recolecta de la ardilla de cola roja, <i>Notosciurus granatensis</i> , en Colombia. No se incluyen las localidades dentro del departamento de Santander.....	73
<i>Figura 4.</i> Relación entre las localidades de recolecta, las localidades tipo de algunas de las subespecies reconocidas por Nitikman (1985), y los rangos aproximados de distribución de las subespecies reconocidas por de Vivo y Carmignotto (2015) para Colombia.....	76
<i>Figura 5.</i> Tendencias fenotípicas de <i>Notosciurus granatensis</i> en Colombia. Cada número representa una característica; los * resaltan las características más destacadas de cada población. Ver figura 2 como referencia visual de cada variable fenotípica.....	78
<i>Figura 6.</i> Localidades de origen de los individuos de <i>N. granatensis</i> caracterizados a nivel molecular.....	79
<i>Figura 7.</i> Red haplotípica de Median-joining mostrando las relaciones entre todos los haplotipos del marcador <i>Cytb</i> .....	83

- Figura 8.* Árbol filogenético Bayesiano del marcador mitocondrial Cytb en *Notosciurus granatensis*. Abajo se destacan las localidades de origen de los individuos incluidos en el análisis. Las flechas son las excepciones (posible tráfico de fauna o hibridación) ..... 86
- Figura 9.* Topología Bayesiana del marcador mitocondrial Cytb en *Notosciurus granatensis*. Todas las terminales (individuos) han sido etiquetadas y coloreadas de acuerdo con su identidad taxonómica: siguiendo la propuesta 1 (Nitikman, 1985) ..... 88
- Figura 10.* Topologías recuperadas en los análisis filogenéticos combinados: a. Inferencia Bayesiana; b. Máxima Verosimilitud. Los valores de soporte para cada nodo están dados en probabilidades posteriores (a) y Bootstrap (b)..... 97
- Figura 11.* Topología bayesiana combinada mostrando la propuesta taxonómica comúnmente adoptada para la tribu Sciurini (Thorington y Hoffmann, 2015) (a), y la propuesta taxonómica más reciente, (de Vivo y Carmignotto, 2015)..... 98
- Figura 12.* Filogenias escaladas en tiempo..... 101
- Figura 13.* Filogenia “inter-específica” escalada en tiempo mostrando el modelo biogeográfico obtenido para los esciúridos del Nuevo Mundo..... 103
- Figura 14.* Reconstrucción bidimensional de la proteína codificada por el gen MC1R en la tribu Sciurini..... 107
- Figura 15.* Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en un sector de la proteína codificada por el gen MC1R en ardillas. .... 108
- Figura 16.* Ilustraciones de los dos fenotipos más extremos observados en las poblaciones de *Notosciurus granatensis* en Colombia..... 109

- Figura 17.* Red haplotípica del MC1R. Cada color representa un haplotipo y el tamaño del círculo es equiparable a su frecuencia. Las líneas transversales constituyen pasos mutacionales, bien sea sinónimos o no sinónimos..... 110
- Figura 18.* Gráfico en 2 dimensiones del ACP de las variables ambientales medidas en 40 localidades a lo largo de la distribución de *N. granatensis*. Las localidades están coloreadas según las subespecies de la propuesta de Nitikman, (1985) o Thorington et al. (2012)..... 116
- Figura 19.* Gráfico en 2 dimensiones del ACP de las variables ambientales medidas en 40 localidades a lo largo de la distribución de *N. granatensis*. Las localidades están coloreadas según las subespecies de la propuesta de de Vivo y Carmignotto (2015)..... 117
- Figura 20.* Árbol jerárquico que representa las relaciones de similitud ambiental entre 40 localidades en las que se ha registrado *N. granatensis* en Colombia y países vecinos. Localidades coloreadas según propuesta de Nitikman (1985) o Thorington et al. (2012)..... 118
- Figura 21.* Gráfico en 2 dimensiones del CCA: se destacan las variables ambientales que más explican la matriz fenotípica completa, y aquellas que determinan algunas de las características de coloración del pelaje. .... 120
- Figura 22.* Distribución hipotética de la especie *Notosciurus granatensis* ..... 143
- Figura 23.* Individuos de *Notosciurus granatensis* de diferentes poblaciones y con diferentes fenotipos..... 143
- Figura 24.* Distribución hipotética de la especie *Notosciurus gerrardi* ..... 146
- Figura 25.* Individuos de *Notosciurus gerrardi* de diferentes poblaciones y con diferentes fenotipos..... 146
- Figura 26.* Distribución hipotética de la especie *Notosciurus chrysuros*. .... 149
- Figura 27.* Individuos de *Notosciurus chrysuros* de diferentes poblaciones..... 149

*Figura 28.* Distribución hipotética de la especie *Notosciurus variabilis*..... 152

*Figura 29.* Individuos de *Notosciurus variabilis* de diferentes poblaciones.. ..... 153

*Figura 30.* Refugios pleistocénicos hipotéticos que pudieron haber albergado las poblaciones  
ancestrales de las especies del “complejo granatensis” ..... 158

**Lista de Apéndies**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Consideraciones éticas para la recolecta de especímenes.....	193
Apéndice B. Marcadores moleculares amplificados, posición relativa de los cebadores y perfiles de termociclado empleados en las reacciones de PCR. ....	196
Apéndice C. Puntos de calibración fósil y secundaria utilizados para la construcción de las filogenias escaladas en tiempo.....	197
Apéndice D. Nodos calibrados en los análisis filogenéticos con estimación simultánea de tiempos de divergencia. ....	199
Apéndice E. Descripciones y fotografías de los individuos recolectados en las diferentes localidades.....	200
Apéndice F. Gráfico de transiciones y transversiones vs distancia genética GTR para el marcador <i>Cytb</i> .....	230

## Resumen

**TÍTULO:** ELUCIDANDO LOS PATRONES DE VARIACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LA ARDILLA DE COLA ROJA, *NOTOSCIURUS GRANATENSIS*, EN COLOMBIA\*.

**AUTOR:** JAVIER ENRIQUE COLMENARES PINZÓN\*\*

**PALABRAS CLAVE:** FENOTIPO, VARIACIÓN, SUBESPECIES, ESTRUCTURA, FILOGENIA, AMBIENTE, ADAPTACIÓN.

### DESCRIPCIÓN:

La ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, es un sistema interesante para estudiar la *variación fenotípica* en un complejo arreglo de subpoblaciones desde Costa Rica hasta Ecuador. Para *N. granatensis* se han propuesto entre seis y 32 subespecies, lo cual constituye un formidable reto para probar hipótesis sobre su sistemática y taxonomía. Se examinó la variación en la coloración del pelaje de *N. granatensis* en la geografía de Colombia y se contrastó con datos ambientales y con la estructura genética de marcadores mitocondriales, así como de un marcador nuclear clásico asociado a la coloración del pelaje en vertebrados. Se encontró evidencia de cuatro linajes que contribuyen a la organización sistemática del complejo *N. granatensis*, y que difiere dramáticamente con las actuales propuestas taxonómicas. En cuanto a la variación en la coloración del pelaje, se encontró que no está relacionada con el polimorfismo genético perfilado en este estudio. Los análisis sugieren que la variación geográfica en la precipitación, la temperatura y la radiación solar constituyen determinantes que pueden explicar mejor la variación en algunos rasgos fenotípicos de la ardilla de cola roja. Esto sugiere que la adaptación local juega un factor importante en el morfo-espacio del color del pelaje. Este estudio una de las pocas iniciativas por comprender la variación fenotípica de un mamífero en Colombia, combinando información genética y aspectos ambientales.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director: Víctor Hugo Serrano Cardozo, Ph.D. Codirector: Raúl Ernesto Sedano Cruz, Ph.D.

## Abstract

**TITLE:** ELUCIDATING THE PATTERNS OF GENETIC AND PHENOTYPIC VARIATION WITHIN THE RED-TAILED SQUIRREL, *NOTOSCIURUS GRANATENSIS*, IN COLOMBIA\*.

**AUTHOR:** JAVIER ENRIQUE COLMENARES PINZÓN\*\*

**KEY WORDS:** PHENOTYPE, VARIATION, SUBSPECIES, STRUCTURE, FILOGENY, ENVIRONMENT, ADAPTATION.

### DESCRIPTION:

The red-tailed squirrel, *Notosciurus granatensis*, is an interesting system to study the phenotypic variation in a complex arrange of subpopulations from Costa Rica to Ecuador. Between six and 32 subspecies have been described within *N. granatensis*, which means that the species is a formidable challenge for testing hypothesis about its systematics and taxonomy. Coat colour variation was examined in *N. granatensis* across the Colombian geography, and it was contrasted with environmental data and with the genetic structure in mitochondrial markers, as well as in a nuclear marker involved in vertebrates pigmentation. Four independent and well supported lineages were found within *N. granatensis*, which notably contrast with the currently accepted intraspecific taxonomic hypothesis. No relationship was found between coat colour variation and the molecular variation, neither in the mitochondrial markers nor in the nuclear one. Instead, the geographic variation in precipitation, temperature, and solar radiation act as good predictors of some phenotypic traits. Those findings suggest that adaptation is an important factor in the morpho-space of the coat colour variation. The present work constitutes one of the few initiatives to understand the phenotypic variation in a Colombian mammal, combining genetic and environmental information.

---

\* Degree work

\*\* Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director: Víctor Hugo Serrano Cardozo, Ph.D. Codirector: Raúl Ernesto Sedano Cruz, Ph.D.

## Introducción

### Generalidades de la familia Sciuridae y la tribu Sciurini

Las ardillas pertenecen a la familia Sciuridae y son descendientes de un ancestro común que vivió hace aproximadamente 30 o 40 millones de años (Thorington *et al.*, 2012). Se trata de una de las familias de mamíferos más grandes, con unas 292 especies pertenecientes a 60 géneros, y una de las pocas con distribución casi cosmopolita, ocurriendo prácticamente en todos los continentes, con excepción de la Antártida y Australia (Koprowski *et al.*, 2016). Actualmente se reconocen 5 grandes linajes dentro de Sciuridae, de los cuales la subfamilia Sciurinae constituye uno de los más diversos, acogiendo todas las ardillas voladoras (tribu Pteromyini) y las ardillas diurnas arbóreas (Tribu Sciurini) (Steppan *et al.*, 2004). Este último grupo es uno de los más ampliamente distribuidos, abarcando gran parte de Eurasia y Norteamérica, pero con un marcado pico de riqueza de especies en el Neotrópico. De acuerdo con análisis de datación molecular basados en múltiples marcadores, la tribu Sciurini se originó en el hemisferio norte hace aproximadamente 23 millones de años, desde donde colonizó primero la región de Centroamérica para después extenderse hacia Sudamérica, tras el cierre del Istmo de Panamá (Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015). Fue precisamente en esta región donde las oscilaciones climáticas, la intermitencia de refugios de vegetación y la gran diversidad ecológica de los bosques tropicales, en particular la disponibilidad de una gran cantidad de recursos alimenticios, promovieron una rápida especiación en el grupo. Esto se ve reflejado hoy en día por el número de taxa reconocidos, en comparación con los de otras regiones (Pecnerová *et al.*, 2015).

### **Estudios con esciúridos Sudamericanos**

Pese a la gran diversidad de esciúridos en Sudamérica, numerosos aspectos de la historia de vida de casi todas las especies permanecen pobremente estudiados (de Vivo y Carmignotto, 2015). Por una parte, la taxonomía y la sistemática han sido abordadas básicamente desde la perspectiva morfológica por escasos autores, algunos de los cuales sintetizaron sus conclusiones en grandes compilaciones de principios y mediados del siglo XX (Allen, 1915; Moore, 1959; Black, 1963). Estos trabajos han prevalecido hasta hoy en día y han sido prácticamente la única base para las clasificaciones a nivel de género, especie e incluso subespecie. Quizás uno de los esfuerzos más destacados fue el de Allen (1915), quien realizó una revisión extensa de especímenes recolectados en Sudamérica, dando origen a la propuesta taxonómica mejor argumentada y probablemente la más ampliamente reconocida y discutida en los años subsiguientes. Allen (1915) describió una serie de caracteres morfológicos fundamentales para la circunscripción de un total de nueve géneros y 25 especies, sin embargo, estos números fueron reconsiderados en posteriores trabajos por diferentes investigadores, algunos de los cuales, sin muchos criterios válidos, propusieron hipótesis alternativas. Por ejemplo, según Ellerman (1940), los esciúridos Sudamericanos estaban representados por tres géneros (*Sciurus*, *Microsciurus*, *Sciurillus*); Moore (1959) consideró por su parte cuatro géneros (*Guerlinguetus*, *Microsciurus*, *Sciurillus*, *Syntheosciurus*); Cabrera (1961) reevaluó la existencia de tres géneros (*Microsciurus*, *Sciurillus* y *Sciurus*) y planteó un total de 13 especies; Emmons y Feer (1997) hablan en su libro de los mismos tres géneros y mapean la distribución de 11 especies, mientras que Thorington y Hoffman (2005) y Thorington *et al.* (2012), se apegan a las propuestas precedentes y se inclinan también por tres géneros, pero aumentan el número de especies a 15. Siguiendo este patrón de cambios en la visión taxonómica y sistemática del grupo, pero manteniendo una mayor afinidad a la propuesta original de Allen (1915),

recientemente de Vivo y Carmignotto (2015) concluyen que es posible diferenciar un total de seis géneros (*Guerlinguetus*, *Hadroskiurus*, *Microsciurus*, *Notosciurus*, *Simosciurus* y *Syntheosciurus*) y 16 especies de entre los esciúridos sudamericanos. Sin embargo, los argumentos de estos autores tienen prácticamente las mismas raíces morfológicas que han predominado en todos los tratamientos previos. En este sentido, ni la taxonomía y la sistemática, ni otros aspectos de este grupo, como los patrones de diversificación y las relaciones evolutivas, han sido abordados concisamente a la luz de otras alternativas metodológicas. Concretamente, aunque las técnicas moleculares basadas en el análisis de marcadores de ADN se han vuelto progresivamente populares en los últimos años y han permitido explorar aspectos relacionados en otros grupos de mamíferos neotropicales, sus bondades aún no han sido aplicadas a gran escala en el estudio de los esciúridos. De la escasa literatura existente al respecto, el trabajo de Oshida y Masuda (2000) fue quizás el primero en el que se incluyó una secuencia de ADN proveniente de una especie de ardilla sudamericana. En este, los autores secuenciaron 1040 pares de bases del gen mitocondrial *Cytb* de *Sciurus stramineus* (hoy en día *Simosciurus stramineus*) para un análisis filogenético y zoogeográfico en el que también incluyeron especies oriundas de Eurasia y Norteamérica. Posteriormente, Mercer y Roth (2003) estudiaron la influencia de algunos eventos históricos en la diversificación de la familia Sciuridae en general. Para esto emplearon técnicas de inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y reloj molecular en el análisis de secuencias de ADN mitocondrial y nuclear de numerosas especies de todo el planeta, entre las que destacan algunas de origen sudamericano pertenecientes al género *Sciurus* (Thorington y Hoffmann, 2005). Por su parte, en un intento por elucidar las relaciones entre los principales linajes de esciúridos, Steppan *et al.* (2004) reconstruyeron filogenias con diversas técnicas a partir de secuencias de los genes nucleares *c-myc* y *RAG1*. Al igual que Mercer y Roth (2003), estos autores incluyeron un muestreo

taxonómico relativamente extenso en su trabajo, del cual hacen parte las especies *Sciurillus pusillus*, *Microsciurus flaviventer*, *Sciurus ignitus* (hoy en día *Notosciurus pucheranii ignitus*) y *Sciurus stramineus* (hoy en día *Simosciurus stramineus*), todas de origen sudamericano. Un aspecto en común de todos estos trabajos es que no se enfocan en la resolución de hipótesis que estén relacionadas netamente con las ardillas neotropicales, por lo que aún no se han caracterizado marcadores moleculares para muchas de las especies de Sudamérica. Sin embargo, algunos intentos que destacan al respecto corresponden a las investigaciones de Villalobos y Cervantes-Reza (2007), Villalobos y Gutiérrez-Espeleta (2014), Pecnerová y Martinková (2012) y Pecnerová *et al.* (2015), en las que se abordaron tópicos como la evolución, diversificación y biogeografía de la tribu Sciurini, empleando diferentes técnicas y secuencias de ADN mitocondrial y nuclear de especies como *Sciurus granatensis* (hoy en día *Notosciurus granatensis*), *Microsciurus alfari*, *Microsciurus flaviventer*, *Sciurus aestuans* (*Guerlinguetus aestuans*), *Sciurus ignitus* (*Notosciurus pucheranii ignitus*), *Sciurus stramineus* (*Simosciurus stramineus*), *Sciurus spadiceus* (*Hadroskiurus spadiceus*) y *Sciurus pyrrhinus* (*Hadroskiurus pyrrhinus*) (Thorington y Hoffmann, 2005; de Vivo y Carmignotto, 2015). Aunque el objetivo general de estos autores no fue resolver la sistemática y la taxonomía del grupo, algunos aspectos que se pueden inferir a partir de sus análisis ponen en duda las propuestas morfológicas que se han hecho en estos campos, y que fueron mencionadas anteriormente. Particularmente, al parecer los caracteres moleculares empleados no soportan la monofilia de muchos de los géneros que se han propuesto para agrupar las ardillas sudamericanas, razón por la cual se necesita caracterizar secuencias de ADN de una mayor cantidad de especies en el contexto de estudios más detallados del grupo.

**Estudios de la variación fenotípica intraespecífica en esciúridos y otros mamíferos:**

Uno de los aspectos quizás más interesantes concernientes a los esciúridos de Sudamérica, y que de manera general se ha relegado a un segundo plano, tiene que ver con la extensa variación fenotípica exhibida por muchas de las especies que se han descrito hasta la fecha. Dicha variación tiene que ver principalmente con cambios en el color del pelaje en taxa ampliamente distribuidos, y ha propiciado discusiones meramente taxonómicas. Uno de los ejemplos más claros es el de la ardilla de cola roja, especie que ha sido considerada históricamente como miembro de los géneros *Mesosciurus*, *Guerlinguetus* y *Sciurus*, pero que hoy en día es tratada como *Notosciurus granatensis* (Nitikman, 1985; de Vivo y Carmignotto, 2015). Su distribución abarca desde Costa Rica, pasando por Panamá, Colombia y Venezuela, hasta llegar al centro de Ecuador, en un gradiente altitudinal que va desde los 0 hasta casi los 2500 m. La gran cantidad de variantes fenotípicas descritas para esta especie han sido casi que la única base para el planteamiento de diferentes hipótesis taxonómicas, muchas de ellas incongruentes entre sí, en las que se propone la existencia de gran cantidad de subespecies. Por ejemplo, Allen (1915) incluyó en su trabajo una clave dicotómica para facilitar la distinción entre 23 subespecies; Cabrera (1961) en su concepto de especie politípica afirmó que la variación en *N. granatensis* se corresponde con 28 subespecies; Nitikman (1985) y Thorington *et al.* (2012) elevaron este número hasta 32, mientras que recientemente de Vivo y Carmignotto (2015) listan y describen tan solo seis subespecies.

Uno de los investigadores que más colectó y revisó especímenes de *N. granatensis* fue P. Hershkovitz, particularmente en el norte de Colombia, lo que lo llevó a describir buena parte de las subespecies que se han reconocido en esta región de Sudamérica (Hershkovitz, 1947). Sin embargo, a diferencia de los demás autores, este mastozoólogo norteamericano fue prácticamente el único en plantear hipótesis sobre las posibles causas de la extrema variación fenotípica del taxón,

y en general de las ardillas. En este sentido, en las conclusiones de su trabajo Hershkovitz (1947) destacó la influencia de las barreras geográficas y ecológicas, así como de los gradientes de altitud en la diferenciación entre subespecies, dándole una mención especial al papel del río Magdalena y de las tres ramas de la Cordillera de los Andes. No obstante, el autor también enfatizó en la existencia de especímenes, que, aunque son fenotípicamente diferentes, provienen de localidades muy cercanas entre sí, entre las que no existe una separación geográfica ni ecológica aparente.

Pese al notable esfuerzo de todos los investigadores mencionados por organizar y explicar la variación en la ardilla de cola roja, ninguna de las descripciones de las tantas subespecies ha involucrado caracteres cuantitativos, lo cual se suma al hecho que muchos de las técnicas moleculares empleadas hoy en día no estaban disponibles en el tiempo de estos estudios. Por esta razón, cada uno de los planteamientos de las diferentes propuestas, en especial la de Hershkovitz (1947) dejan una enorme brecha en cuanto a la discusión de la variación intraespecífica en *N. granatensis*.

Con relación a esto, en el contexto investigativo actual, en el cual hay predominio en la implementación de análisis moleculares en el estudio de casos similares, bien sea en otros grupos de mamíferos o cualquier otro vertebrado, aún siguen sin presentarse avances significativos en la comprensión de la variación fenotípica, tanto en ardillas sudamericanas en general, como en el caso particular de *N. granatensis*. En uno de los pocos esfuerzos al respecto, Arango *et al.* (2007), mediante técnicas convencionales de bandeo cromosómico intentaron relacionar las diferencias en la coloración del pelaje en individuos de Colombia, con cambios a nivel del cariotipo. Sin embargo, a pesar de que sus resultados señalan la existencia de tres cariomorfos entre la muestra, los autores concluyen que ninguno de ellos está asociado con algún fenotipo en particular, por lo que es probable que la extensa variación intraespecífica sea causada por las condiciones ambientales.

Aparte de este trabajo, no existen investigaciones en las que se traten de asociar cambios moleculares con cambios en el fenotipo en ardillas sudamericanas. No obstante, la creciente disponibilidad de marcadores de ADN con diferentes niveles de resolución ha ido de la mano con el desarrollo de trabajos de este tipo en otros grupos de mamíferos, bien sean neotropicales o de otras regiones del planeta. Particularmente para la familia Sciuridae, uno de los casos más similares al de la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, es el de la ardilla roja, *Sciurus vulgaris*. Esta especie también hace parte de la tribu Sciurini (ardillas diurnas arbóreas) y es probablemente la más ampliamente distribuida del grupo, abarcando gran parte de Europa y Asia, así como numerosas islas circundantes. Al igual que en el caso de *N. granatensis*, la gran variación en la coloración del pelaje de *S. vulgaris* ha inspirado la descripción de hasta 40 subespecies, de las cuales hoy en día 17 se consideran como válidas. (Grill *et al.*, 2009). Por esta razón, bajo la premisa de que la disimilaridad morfológica no necesariamente refleja rupturas genéticas, diferentes autores se han dado a la tarea de evaluar los patrones de divergencia en marcadores de ADN mitocondrial y nuclear y su relación con la variación fenotípica en esta ardilla (Barrat *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2006; Lucas y Galián, 2009; Grill *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2014). En uno de estos intentos, Grill *et al.* (2009) realizaron diferentes análisis filogeográficos a partir de 8 loci microsatélites y secuencias de los genes mitocondriales *D-loop* y *cytb* provenientes de individuos asignados a siete de las subespecies euroasiáticas reconocidas. Los resultados de este trabajo señalan incongruencias entre la propuesta taxonómica basada en variación fenotípica y la variación molecular reflejada por los marcadores moleculares, pudiéndose escasamente diferenciar linajes que han sido el resultado de procesos muy marcados de aislamiento histórico. Este mismo patrón fue recuperado por Liu *et al.* (2014), quienes realizaron análisis similares con secuencias de *Cytb* y *D-loop* de individuos provenientes de diferentes poblaciones de la especie en China.

Por otra parte, en casos particulares del Neotrópico, con especies de otros grupos de mamíferos cuya distribución se solapa con la de *N. granatensis*, también se han presentado resultados interesantes en análisis similares. Por un lado, Harding *et al.* (2012) usaron ADN mitocondrial y técnicas de datación, filogenia y filogeografía para investigar la estructura molecular y geográfica de la comadreja de cola larga, *Mustela frenata*, una especie distribuida desde Estados Unidos hasta Chile y con una amplia variación fenotípica que ha derivado en la descripción de hasta 42 subespecies. Aunque los resultados de este trabajo si apuntan a una separación de las muestras en distintos clados, prácticamente ninguno de estos coincide con las subespecies morfológicamente circunscritas incluidas en la muestra. Por otro lado, a una escala geográfica más reducida, Link *et al.* (2015) realizaron un estudio en Colombia el que evaluaron la influencia del río Magdalena en la divergencia molecular entre dos subespecies fenotípicamente diferenciables de mono araña, *Ateles hybridus hybridus* y *A. h. brunneus*, ambas distribuidas en bancos opuestos de este afluente. Para este propósito los autores secuenciaron fragmentos de 2 genes mitocondriales (región *HVI* y el *COII*) en un total de 51 individuos de ambas subespecies y aplicaron análisis de genética poblacional, concluyendo que no existe evidencia de estructuración entre poblaciones de ambos bancos del río, lo que en últimas sugiere que este no actúa como una barrera al flujo génico y que probablemente las diferencias en las características del pelaje se deben a otros factores.

#### **Estudios de la variación en la coloración del pelaje con marcadores nucleares en mamíferos:**

La pigmentación es uno de los rasgos fenotípicos mejor estudiados a nivel molecular en los mamíferos (Nachman *et al.*, 2003). Gracias a esto muchos genes involucrados en la producción de la melanina han sido identificados, primariamente a partir de análisis con ratones de laboratorio, lo que en últimas ha permitido la caracterización de diferentes mutaciones que se relacionan

directamente con patrones de coloración específicos. Un ejemplo de avances en este tópico fue el descubrimiento del gen nuclear *Mc1r*, el cual comprende un solo exón de aproximadamente 1000 pares de bases. Dicho gen está involucrado en la expresión de la proteína transmembranal MC1R (Receptor-1 de la Melanocortina), la cual regula la producción y distribución de dos pigmentos en los melanocitos; la eumelanina y la feomelanina, los cuales confieren la coloración a los pelos (Nachman *et al.*, 2003; Hoekstra *et al.*, 2006).

A partir de este conocimiento, diversos autores (Nachman *et al.*, 2003; Mullen *et al.*, 2009; McRobie *et al.*, 2009 y 2014) se han preocupado por determinar la relación entre algunas mutaciones en el *Mc1r* y la expresión de diferentes patrones de coloración por parte de poblaciones de algunas especies de mamíferos silvestres. Por ejemplo, Nachman *et al.* (2003) demostraron que cuatro cambios en la secuencia de este gen eran responsables del melanismo en ratones de bolsillo de las rocas (*Chaetodipus intermedius*) que viven en hábitats oscuros, de manera que esta adaptación les permite camuflarse y minimizar el riesgo de ser depredados. Por su parte, los ratones que viven sobre sustratos claros no presentan dichos cambios. En otro trabajo, Mullen *et al.* (2009) evaluaron la relación entre fenotipo, genotipo y ambiente, en subespecies del ratón playero (*Peromyscus polionotus*) que difieren en sus patrones de coloración del pelaje. Para esto, los autores recolectaron información de marcadores mitocondriales, microsatélites y polimorfismos de nucleótidos simple (SNP's) del gen *Mc1r*, con los que efectuaron diferentes análisis de genética poblacional y filogenética. Sus resultados de manera general indican que, aunque no hay relación entre las distancias genéticas mitocondriales y la variación fenotípica, los cambios alélicos en el *Mc1r* si están influenciando variación adaptativa en el color del pelo entre las diferentes subespecies. Para el caso particular de las ardillas, McRobie, *et al.* (2009, 2014) y Madsen (2011) han sido pioneros en el estudio de la influencia de *Mc1r* en la variación fenotípica de especies

como *Sciurus vulgaris*, *Sciurus niger* y *Sciurus carolinenses*, la primera oriunda de Europa y Asia y las otras dos de Norteamérica. Aunque las conclusiones de estos trabajos evidencian diferencias interespecíficas entre las secuencias del gen, aparentemente las mutaciones en el mismo no tienen influencia en la variación intraespecífica en el color del pelaje en *S. vulgaris* y *S. niger*.

A pesar de la amplia gama de trabajos que se han generado en torno al entendimiento de la variación en los patrones de coloración del pelaje en poblaciones de mamíferos silvestres, ninguno de estos se ha aplicado en especies netamente neotropicales, incluidos los esciúridos. De igual forma, los objetivos de casi todos los estudios se han enfocado primordialmente en la explicación del melanismo y en los cambios concretos en la secuencia del *Mc1r*, más no en la relación de su historia filogenética y la divergencia fenotípica intraespecífica.

#### **Estudios de la diversidad intraespecífica con marcadores mitocondriales en mamíferos:**

El ADNmt constituye una herramienta muy apropiada para el estudio de la historia evolutiva reciente de los mamíferos debido a sus características estructurales y funcionales particulares, tales como su herencia maternal y haploide, su falta de recombinación y sus tasas mutacionales mayores a las del ADN nuclear (Allendorf y Luikart, 2007). Todo esto, sumado al hecho de que su extracción, amplificación y secuenciación es relativamente rápida, económica y eficiente, ha facilitado la caracterización de numerosos genes y su implementación en numerosos estudios filogenéticos, filogeográficos y de genética poblacional (Allendorf y Luikart, 2007).

En este sentido, existen numerosos estudios en los cuales se han empleado las bondades de este marcador para estudiar la variación intraespecífica en especies de mamíferos, algunos de los cuales ya se han mencionado anteriormente (Grill *et al.*, 2009; Mullen *et al.*, 2009; Madsen, 2011; Harding *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Link *et al.*, 2015).

**La ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, en Colombia.**

Gran parte de la distribución de la ardilla de cola roja atraviesa la topografía de Colombia en el norte de Sudamérica. Esta especie se distribuye aparentemente a lo largo de todo el territorio del país, exceptuando los Llanos orientales y la Amazonía, donde es común y abundante en casi todo tipo de hábitat, incluso zonas deforestadas, cultivos y centros urbanos (Solari *et al.*, 2014). Es por esta razón que el territorio nacional alberga la mayoría de las variantes fenotípicas conocidas de este taxón, las cuales se podrían asignar, según las diferentes propuestas taxonómicas, a 16 (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012) o a tres (de Vivo y Carmignotto, 2015) subespecies. De manera general, Hershkovitz (1947) mencionó cuatro patrones de coloración del pelaje predominantes entre las ardillas del norte de Colombia: 1. Patrón rojizo más o menos uniforme; 2. Patrón naranja más o menos uniforme; 3. Patrón agutí (pálido y oscuro); 4. Patrones contrastantes. Por su parte, Emmons y Feer (1997) describieron los que consideran son los tres fenotipos básicos a lo largo de todo el rango geográfico de la especie, todos aparentemente ocurriendo en Colombia: 1. Fenotipo oriental: dorso café oliváceo y vientre rojizo oscuro a naranja, típico de las ardillas de la Cordillera Oriental y sus piedemontes; 2. Fenotipo norte: Dorso naranja-rojizo brillante y vientre completamente blanco; típico de las ardillas de tierras bajas de la región Caribe y valles interandinos; 3. Fenotipo occidental: Dorso negro-oliváceo, extremidades de rojizas a naranja y cola frecuentemente negra en su base y punta; típico de las ardillas del Pacífico. La más reciente propuesta taxonómica hecha por de Vivo y Carmignotto (2015) guarda cierta similitud con estos patrones de variación en tanto que los autores describen seis subespecies de *N. granatensis*, tres de ellas presentes en Colombia: así, *N. granatensis chrysuros* sería el nombre adecuado para las poblaciones que habitan en la Cordillera Oriental, *N. granatensis granatensis* sería el nombre para las poblaciones de la Cordillera Occidental, Central, Sierra Nevada de Santa Marta, y tierras bajas

del Caribe, y *N. granatensis morulus*, sería el nombre para las poblaciones de toda la región Pacífica.

### **Planteamiento del problema**

Las ardillas diurnas arbóreas de la tribu Sciurini se distribuyen ampliamente por Eurasia y Norteamérica, sin embargo, su pico de diversidad se da en el Neotrópico (Thorington *et al.*, 2012). La mayoría de las especies poseen rangos de distribución amplios, son habitantes ubicuos de una gran cantidad de biomas, exhiben abundancias locales elevadas y ejercen roles ecológicos importantes (Thorington *et al.*, 2012; de Vivo y Carmignotto, 2015). No obstante, numerosos aspectos de sus historias de vida permanecen pobremente estudiados, en especial sus patrones de diversificación (de Vivo y Carmignotto, 2015).

La ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, pertenece a la tribu Sciurini y es uno de los miembros del grupo con distribución más amplia en el Neotrópico, ya que es abundante en casi todos los biomas presentes desde Costa Rica hasta Ecuador, en un gradiente altitudinal que va desde los 0 hasta los 2500 m (Nitikman, 1985; de Vivo y Carmignotto, 2015). Particularmente, esta ardilla exhibe una variación compleja en cuanto a la coloración del pelaje, por lo que históricamente numerosos autores han tratado de asociar las diferentes variantes fenotípicas presentes en su rango con unidades taxonómicas discretas. Como consecuencia, se han llegado a plantear gran cantidad de hipótesis basadas meramente en esta característica, en algunas de las cuales se propone incluso la existencia controversial de hasta 32 subespecies. Esto hace que *N. granatensis* sea uno de los taxa más politípicos dentro su grupo (Allen, 1915; Hershkovitz, 1947; Cabrera, 1961; Nitikman, 1985; Thorington y Hoffman, 2005; Thorington *et al.*, 2012; de Vivo y Carmignotto, 2015).

Sin embargo, aunque las propuestas taxonómicas de subespecies son a menudo utilizadas para organizar la variación existente en numerosos taxa, especialmente aquellos con distribuciones amplias, no necesariamente existe congruencia entre estas y la realidad evolutiva (Mathis *et al.*, 2014). Por tal razón, aunque las diferencias fenotípicas pueden ser indicativas de especiación incipiente, es muy probable que no coincidan con rupturas genéticas dentro de las especies, como ya se ha demostrado en numerosos trabajos (Tursi *et al.*, 2012). En el caso de la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, aunque la extensa variación, sobre todo en la coloración del pelaje, ha sido la base para la descripción de un gran número de subespecies, hasta el momento no se han explorado consistentemente los patrones genéticos de la misma (de Vivo y Carmignotto, 2015). En este sentido, la especie ofrece un excelente modelo para estudiar el comportamiento del fenotipo a la luz de la estructura genética intraespecífica y de los fenómenos históricos y ambientales que probablemente la han moldeado.

Interesantemente, la mayor parte del rango distribucional de esta ardilla está contemplada en el norte de Sudamérica, sobre la topografía de Colombia, donde frecuente todo tipo de hábitats desde los 0 hasta los 2500 m aproximadamente (Solari *et al.*, 2014; de Vivo y Carmignotto, 2015). A su vez, es en esta porción del continente donde se encuentran la mayoría de las variantes fenotípicas que se han caracterizado para la especie, lo cual se ve reflejado en las propuestas taxonómicas clásicas en las que se habla de hasta 16 de 32 subespecies totales ocurriendo a lo largo del territorio del país (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012). En el marco de su trabajo con los mamíferos del norte de Colombia, Hershkovitz recolectó una gran cantidad de individuos de *N. granatensis*, lo que lo llevó a la descripción de buena parte de estas subespecies y a ser de los pocos autores en cuestionarse sobre los posibles factores causales de tan extrema variación (Hershkovitz, 1947). Sin embargo, a pesar de que trató de relacionar la incidencia de la geografía

y de las características climáticas de la región, sus conclusiones apuntan a la ausencia de límites claros entre las formas, existiendo incluso diferentes patrones de coloración entre individuos recolectados en localidades muy cercanas, que no se encuentran separadas por accidentes topográficos y que están expuestas incluso a las mismas condiciones ambientales (Hershkovitz, 1947). Pese al esfuerzo del autor por ofrecer explicaciones consistentes sobre la variación fenotípica en esta ardilla, las limitaciones metodológicas de su época y la ausencia de revisiones críticas posteriores al respecto hacen pensar en la necesidad de una exploración más detallada del problema, desde la perspectiva de técnicas contemporáneas robustas que permitan la evaluación conjunta de las causas genéticas e históricas. En este sentido, Colombia constituye el escenario perfecto para poner a prueba nuevas hipótesis, pues su topografía se ha visto influenciada por diversos eventos de la dinámica continental y oscilaciones climáticas, al mismo tiempo que alberga la mayor parte de las variantes fenotípicas de la especie. Por otra parte, actualmente existen al alcance numerosos marcadores de ADN cuya variación puede ser cuantificada, analizada y contrastada con cambios en otros niveles, como en el fenotipo, todo mediante acercamientos como la filogeografía, la genética poblacional o la filogenética molecular.

Bajo este panorama, uno de los marcadores mejor caracterizados y estudiados en los roedores ha sido el gen nuclear *MC1R* (Receptor-1 de la Melanocortina), el cual guarda precisamente relación directa con la coloración del pelaje. De manera general, su función radica en regular la acumulación y distribución de los pigmentos eumelanina y feomelanina en los melanocitos, lo que en últimas define el patrón de bandas y por ende la tonalidad en cada uno de los pelos (Hoekstra, 2006). El grado de conocimiento del papel de este marcador en ratones de laboratorio ha sido el punto de partida para el estudio de los cambios genéticos que subyacen las diferencias fenotípicas en la coloración del pelaje en poblaciones silvestres de mamíferos (Hoekstra, 2006). Por tal razón,

hasta la fecha, numerosos estudios han logrado relacionar ciertas mutaciones en el gen con polimorfismos específicos ligados a estas diferencias, en especies como el ratón de bolsillo de las rocas, *Chaetodipus intermedius* (Nachman *et al.*, 2003; Hoeckstra *et al.*, 2005), el ratón playero, *Peromyscus polionotus* (Mullen *et al.*, 2009), e incluso en algunos miembros de la familia Sciuridae, (McRobie, *et al.*, 2009; McRobie *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado trabajos similares con especies neotropicales. En cuanto a la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, el *MC1R* constituye por ende una herramienta ideal para relacionar la extensa variación intraespecífica, en cuanto a la coloración del pelaje, con cambios a nivel genético e historia filogenética. Así mismo, debido a su rol de regulación en esta característica fenotípica, la ausencia de cualquier relación podría dar sugerencias sobre otros mecanismos involucrados.

Por otra parte, existen también marcadores, que, aunque no tienen relación directa con la regulación de la coloración del pelaje, son bastante funcionales a la hora de resolver cuestiones de divergencia molecular a nivel intraespecífico. Como ejemplo están El Citocromo b (*Cytb*) y la Región Control (*D-loop*), genes de origen mitocondrial cuyo uso se ha popularizado, sobre todo en estudios filogenéticos y de genética poblacional, básicamente por las facilidades en su extracción y amplificación en vertebrados. (Patwardhan *et al.*, 2014). La tasa mutacional acelerada del *Cytb* hace que la divergencia entre secuencias se acumule más rápido en comparación con marcadores de origen nuclear, por lo que los análisis con este gen han demostrado ser útiles en la clarificación de relaciones entre taxa que se han diferenciado muy recientemente. (Patwardhan *et al.*, 2014). En el contexto de la problemática de la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, el *Cytb* y el *D-loop* serían marcadores ideales para determinar, al igual que con el *MC1R*, si existe correspondencia entre variación fenotípica y variación molecular e historia filogenética, al tiempo que constituyen herramientas imprescindible para cuantificar aspectos de la diversidad genética

que podrían a su vez facilitar inferencias sobre la diversificación e historia evolutiva de la especie con relación a procesos históricos, sobre todo los que han moldeado el paisaje, el clima y la vegetación en Colombia.

De esta forma, con base a la línea argumental expuesta, se plantea que la presente investigación gire en torno a las siguientes preguntas: ¿Cuál es el patrón de la variación genética en la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, con relación a la extensa variación fenotípica exhibida en Colombia? ¿Existe congruencia entre las diferencias fenotípicas de *N. granatensis* en Colombia y la variación en los genes *MC1R*, *Cytb* o *D-loop*? ¿Es posible que los procesos históricos que han moldeado el clima, la topografía y la vegetación en el rango de la especie en Colombia hayan influido en su diferenciación fenotípica y genética? ¿Existe un vínculo entre las características ambientales a lo largo del rango de la especie y su extensa variación fenotípica?

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Evaluar los patrones de variación molecular intraespecífica en la ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, con relación a la variación fenotípica exhibida a lo largo de su rango distribucional en Colombia.

## 1.2 Objetivos específicos

- Establecer las tendencias fenotípicas de la ardilla de cola roja con relación a la geografía de Colombia.
- Cuantificar el grado de diferenciación molecular intraespecífica de los genes *Mc1r* y *Cytb* en la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, a lo largo de su rango distribucional en Colombia.
- Dilucidar la posible relación entre el grado de diferenciación molecular en los genes *Mc1r* y *Cytb* y la variación fenotípica exhibida por la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, a lo largo de su rango distribucional en Colombia.
- Inferir las afinidades filogenéticas a nivel intraespecífico en la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, así como su relación con otras especies de la tribu Sciurini.
- Reconstruir la historia de diversificación de la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, en Colombia
- Determinar una posible relación de causalidad entre las características ambientales a lo largo del rango distribución de la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, y su extensa variación fenotípica

## 2. Hipótesis

- La variación fenotípica exhibida por la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, en Colombia está directamente relacionada con procesos de divergencia molecular.

- Existe correspondencia entre los patrones de variación fenotípica exhibidos por la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, en Colombia y los patrones de estructuración a nivel de los genes *Mc1r* y *Cytb*.
- Las entidades taxonómicas (subespecies) circunscritas con base en la coloración del pelaje en la ardilla de cola roja, *N. granatensis* (siguiendo las propuestas de Nitikman, 1985 y de Vivo y Carmignotto, 2015), son un reflejo de los patrones de estructuración a nivel de los genes *Mc1r* y *Cytb*.
- La divergencia molecular y las diferencias fenotípicas en la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, han sido moduladas por procesos históricos relacionados con la geología y el clima a lo largo de su distribución.
- Los patrones de variación fenotípica en la ardilla de cola roja, *N. granatensis*, son el resultado de respuestas adaptativas a diferentes entornos a lo largo de su distribución.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Recolecta de especímenes

El proceso de recolecta de especímenes se basó en los siguientes criterios:

1. **Amplitud geográfica:** se visitaron la mayor cantidad de localidades posibles dentro del rango distribucional de la especie en Colombia, esto con el fin de obtener una muestra

importante de la variación genética y fenotípica de las poblaciones del país y de comprender su relación con la geografía.

2. **Heterogeneidad ecológica:** con el propósito de establecer una posible relación entre el ambiente y la variación fenotípica y genética en la especie, se procuró que las localidades seleccionadas representaran unidades con características ecológicas heterogéneas, siguiendo la propuesta de (Olson *et al.*, 2001).
3. **Representatividad de los fenotipos:** Para obtener una amplia muestra de la variación fenotípica de la especie en Colombia, y comprender su relación con la variación genética, las colectas se realizaron teniendo en cuenta los rangos geográficos hipotéticos de las tres subespecies propuestas por de Vivo y Carmignotto (2015), así como las localidades tipo de todas las formas sinonimizadas y que fueron previamente reconocidas por otros autores para el país (Allen, 1915; Hershkovitz, 1947; Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012).
4. **Vacíos de conocimiento:** considerando el criterio anterior, y verificando la procedencia de especímenes de *N. granatensis* depositados en colecciones biológicas de Colombia y del exterior, se realizaron algunas recolectas adicionales en localidades no representadas y de las cuales no se conocían las tendencias fenotípicas para la especie.

Los individuos de *N. granatensis* fueron sacrificados en su entorno natural con una pistola neumática calibre 5.5 de referencia Crosman 2240. De acuerdo con los lineamientos de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres en investigación y educación, la recolecta con armas neumáticas garantiza la muerte inmediata de cada individuo, minimizando así el sufrimiento y estrés (Sikes *et al.*, 2016). Las consideraciones éticas a detalle se especifican en el **anexo 1**.

Sobre los individuos obtenidos se tomaron datos cualitativos, tales como patrón de coloración del pelaje, sexo y estado reproductivo, así como las respectivas medidas morfométricas estándar definidas para mamíferos [Longitud Cabeza Cuerpo (LCC); Longitud Cola (LC); Longitud Pata (LP); Longitud Oreja (LO), Peso (Pe)]. Paralelamente, se realizó la extracción de tejido fresco a partir del hígado, corazón y músculo esquelético, garantizando condiciones de esterilidad en el entorno; los fragmentos extraídos fueron debidamente almacenados en etanol al 96 %. Posteriormente se realizó el montaje en seco o en líquido de todos los especímenes resultantes, para su disposición final en la Colección de Mamíferos del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander. La preparación de especímenes, la extracción y la fijación de tejidos se realizaron siguiendo los procedimientos estándar para mamíferos definidos y consignados en el trabajo de Nagorsen y Peterson (1980).

### **3.2 Descripción fenotípica y asignación taxonómica de los especímenes recolectados**

Cada uno de los especímenes recolectados fue revisado antes y después de su montaje: se realizaron descripciones fenotípicas detalladas, con especial énfasis en los patrones de coloración del pelaje, utilizando como criterios de objetividad la terminología recurrente en la literatura (Allen, 1915; Hershkovitz, 1947) y una versión simplificada de la nomenclatura de Ridgway (1912) para los colores. El proceso se replicó con algunos especímenes depositados en las colecciones de mamíferos del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia (Colección de Mamíferos Alberto Cadena García), en Bogotá y la Universidad EAFIT, en Medellín.

Complementariamente, a partir de la literatura, especialmente los trabajos de Allen (1915) y Hershkovitz (1947), se compilaron descripciones fenotípicas completas de ejemplares provenientes de diversas localidades, incluidos los holotipos de la mayoría de las subespecies descritas para Colombia. Con base en este material, cada uno de los especímenes del presente trabajo, recolectados y revisados en colecciones biológicas, fue asignado a alguna de las subespecies de *Notosciurus granatensis* reconocidas para Colombia por Nitikman (1985) y Thorington *et al.* (2012), y a alguna de las tres subespecies propuestas por De Vivo y Carmignotto (2015) (**figura 1**).

**3.2.1 Subespecies propuesta taxonómica 1 (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012).** Se describen solo las localidades tipo de las 16 subespecies con distribución confirmada para Colombia:

- *Sciurus granatensis morulus* Bangs, 1900

**Localidad tipo:** Loma del León, Panamá, cerca de Gatún.

- *Sciurus granatensis granatensis* Humboldt, 1811

**Localidad tipo:** Cartagena, departamento de Bolívar, Colombia.

- *Sciurus granatensis bondae* Allen, 1899

**Localidad tipo:** Bonda, en la base de la esquina noroccidental de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia.

- *Sciurus granatensis saltuensis* Bangs, 1898

**Localidad tipo:** Pueblo Viejo, Río San Antonio, pendiente norte de la Sierra Nevada de Santa Marta, Magdalena, Colombia.

- *Sciurus granatensis agricolae* Hershkovitz, 1947

**Localidad tipo:** Colonia Agrícola de Caracolcito, Río Ariguaní, en las pendientes del sur de la Sierra Nevada de Santa Marta, departamento de Magdalena, Colombia; altitud 335 m.

- *Sciurus granatensis perijae* Hershkovitz, 1947

**Localidad tipo:** Sierra Negra, arriba de Villanueva, en la pendiente occidental de la Sierra de Perijá, Valledupar, departamento de Magdalena, Colombia; 1265 m de altitud.

- *Sciurus granatensis splendidus* Gray, 1842

**Localidad tipo:** Desconocida. Fijada por Hershkovitz (1947) a los márgenes del Río Cesar, cerca de su confluencia con el Magdalena.

- *Sciurus granatensis norosiensis* Hershkovitz, 1947

**Localidad tipo:** Norosí, Mompós, departamento de Bolívar, Colombia; 120 m de altitud.

- *Sciurus granatensis variabilis* Geoffroy, 1832

**Localidad tipo:** Confusa. Fijada por Hershkovitz, 1947 a La Gloria, margen derecho del Río Magdalena, unos 45 kilómetros arriba de la boca del Río Cesar; aproximadamente 45 m de altitud.

- *Sciurus granatensis tarrae* Hershkovitz, 1947

**Localidad tipo:** Río Tarra, un pequeño tributario del alto Catatumbo, San Calixto, departamento de Norte de Santander, Colombia; aproximadamente 200 m de altitud.

- *Sciurus granatensis zuliae* Osgood, 1910

**Localidad tipo:** Orope, una pequeña estación de ferrocarril en el Río Orope, un tributario del Zulia, cerca de la frontera con Colombia, Zulia, Venezuela.

- *Sciurus granatensis valdiviae* Allen, 1915

**Localidad tipo:** Puerto Valdivia, bajo Río Cauca, Antioquia, Colombia central.

- *Sciurus granatensis gerrardi* Gray, 1861

**Localidad tipo:** Río Frío, pendiente occidental de la Cordillera Central, en el margen oriental del Río Cauca, departamento del Valle del Cauca, Colombia central.

- *Sciurus granatensis chrysuros* Pucheran, 1845

**Localidad tipo:** Santa Fé de Bogotá, Colombia central.

- *Sciurus granatensis griseimembra* Allen, 1914

**Localidad tipo:** Buenavista, pendiente oriental de la Cordillera Oriental, al suroriente de Bogotá, Cundinamarca, Colombia central.

### 3.2.2 Subespecies propuesta taxonómica 2 (De Vivo y Carmignotto, 2015).

- *Notosciurus granatensis chrysuros* Pucheran, 1845

**Localidad tipo:** Santa Fé de Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

**Distribución hipotética:** este taxón aparentemente se distribuye a lo largo de la cordillera Oriental, alcanzando el piedemonte llanero por el flanco oriental y parte del Valle del Magdalena por el flanco occidental.

**Sinónimos según la propuesta 1:** *Sciurus granatensis griseimembra*, *S. g. tarrae*.

- *Notosciurus granatensis granatensis* Humboldt, 1811

**Localidad tipo:** Cartagena, Bolívar, Colombia

**Distribución hipotética:** esta subespecie probablemente se distribuye en las cordilleras Occidental y Central, Valle del Río Cauca, Sierra Nevada de Santa Marta, tierras bajas del caribe y la Serranía del Perijá.

**Sinónimos según la propuesta 1:** *S. g. variabilis*, *S. g. splendidus*, *S. g. gerrardi*, *S. g. saltuensis*, *S. g. bondae*, *S. g. zuliae*, *S. g. quindianus*, *S. g. valdiviae*, *S. g. agricolae*, *S. g. norosiensis*, *S. g. perijae*.

- *Notosciurus granatensis morulus* Bangs, 1900

**Localidad tipo:** Loma del León, Panamá

**Distribución hipotética:** este taxón estaría restringido a las tierras bajas del Pacífico colombiano y probablemente el flanco occidental de la cordillera Occidental.

**Sinónimos según propuesta 1:** Ninguno

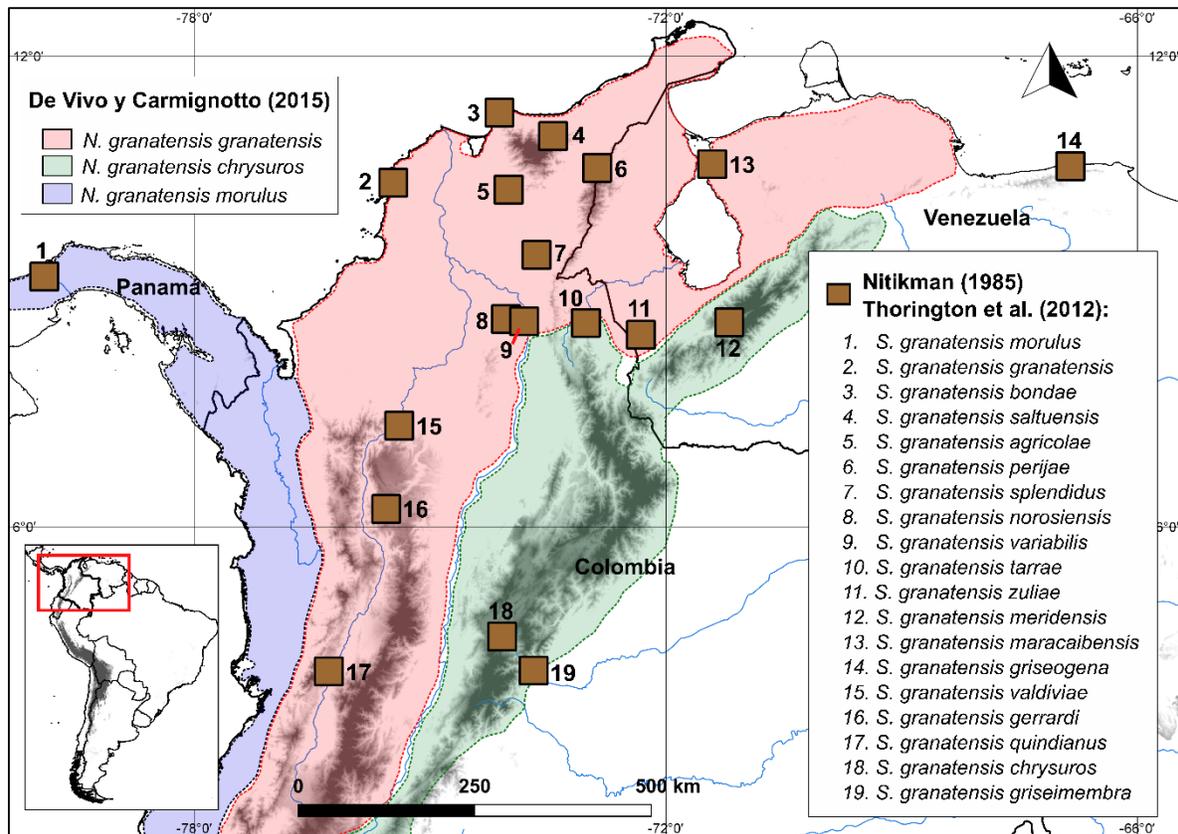


Figura 1. Subespecies de *Notosciurus granatensis* distribuidas en Colombia y países vecinos, según las hipótesis taxonómicas de Nitikman (1985), Thorington et al. (2012) y de Vivo y Carmignotto (2015).

### 3.3 Trabajo de laboratorio (Extracción, amplificación y secuenciación de ADN)

Se realizó la caracterización molecular de todos los individuos de *N. granatensis* recolectados. Complementariamente, se obtuvieron muestras de especímenes depositados en las colecciones de mamíferos de la Universidad de Caldas, la Universidad Eafit y la Universidad Nacional de Colombia, todos provenientes de localidades no visitadas durante la ejecución del presente trabajo.

Los protocolos de esta fase se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander, siguiendo en lo posible las recomendaciones del trabajo de Hajibabaei *et al.* (2005).

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de fragmentos de tejido fresco de aproximadamente 25 mg (hígado, corazón o músculo esquelético), utilizando el kit comercial “GeneJet Genomic DNA Purification Kit” (Thermo-Scientific) bajo las especificaciones del fabricante.

Se amplificaron un total de 2 marcadores mitocondriales y 1 marcador nuclear mediante reacciones de PCR estándar de 50 µl (volumen final). Para la amplificación de un segundo marcador nuclear, el MC1R, se implementó una PCR anidada, consistente de dos rondas: una ronda inicial a 25 µl, y una ronda final de reamplificación a 50 µl. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Multigene Thermal Cycler TC9600-G (Labnet International, Inc.) Los cebadores para cada marcador fueron recopilados a partir de la literatura (**tabla 1**). Para el caso particular de la Ronda 2 del MC1R, se diseñaron cebadores específicos en el programa Geneious R11 (Biomatters Limited): se descargaron del repositorio público GenBank secuencias del gen y sus regiones flanqueantes (upstream y downstream), pertenecientes a diferentes especies de roedores. Se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo de MUSCLE (parámetros por defecto) en Geneious R11, y a partir de este se extrajo una secuencia consenso. Dicha secuencia se utilizó como blanco y los cebadores fueron diseñados a partir de las regiones flanqueantes del intrón del MC1R, de manera tal que permitieran la amplificación de la región codificante completa (945 pb); este procedimiento se ejecutó con el algoritmo de Primer3 versión 2.3.7, también en el programa Geneious R11. Los volúmenes y concentraciones de cada componente se describen en la **tabla 1**. Los cebadores, su ubicación relativa y los perfiles de termociclado empleados se describen en el **anexo 2**.

Tabla 1.

Relación de los marcadores moleculares amplificados, incluyendo los cebadores empleados y las características químicas de las reacciones de PCR.

Cebador	Secuencia del cebador	Concentraciones/Volúmenes		
<b>Citocromo B (Cytb) Fuente: Diaz-Nieto (No publicado)</b>				
<b>Tamaño: 1140 pb</b>				
SciCytbF	5'-CCATGACCAATGACATGAAAAATCATCG		<b>Con.</b>	<b>Vol.</b>
		<b>*Buffer</b>	1X	5 µL
		<b>dNTP's</b>	0.2 mM	5 µL
SciCytbR	5'-AGCTTTGGGAGTTGAAGGTGGAA	<b>Primers</b>	0.2 µM	1 µL
		<b>**Taq</b>	1.25 u/µL	0.25µL
		<b>ADN</b>	Variable	1 µL
<b>Región Control (D-loop) Fuente: Kocher et al. (1989)</b>				
<b>Tamaño: ±1232 pb</b>				
L15926	5'-TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC		<b>Con.</b>	<b>Vol.</b>
		<b>*Buffer</b>	1X	5 µL
		<b>dNTP's</b>	0.2 mM	5 µL
H00651	5'-TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT	<b>Primers</b>	0.2 µM	1 µL
		<b>**Taq</b>	1.25 u/µL	0.25µL
		<b>MgCl<sub>2</sub>+</b>	2.5 mM	1 µL
		<b>ADN</b>	Variable	1 µL
<b>Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein (IRBP) Fuente: Pecnerová et al. (2015)</b>				
<b>Tamaño: ±1276 pb</b>				
IRBP217	5'- GGCCAAGGTCCTCTTGGATAACTACTGCTT		<b>Con.</b>	<b>Vol.</b>
		<b>*Buffer</b>	1X	5 µL
		<b>dNTP's</b>	0.2 mM	5 µL
IRBP1531	5'- CAGGTCCATGATGAGGTGCTCCGTGTCCTG	<b>Primers</b>	0.2 µM	1 µL
		<b>**Taq</b>	1.25 u/µL	0.25µL
		<b>MgCl<sub>2</sub>+</b>	2.5 mM	1 µL
		<b>ADN</b>	Variable	1 µL
<b>Melacortin 1 Receptor (MC1R)</b>				
<b>Tamaño: 945 pb</b>				
<b>Ronda 1 Fuente: McRobie et al. (2009); McRobie et al. (2014)</b>				
<b>Tamaño: 1180 pb</b>				
MSHR4F	5'-TGCTTCCTGGACAGGACTATG		<b>Con.</b>	<b>Vol.</b>
		<b>*Buffer</b>	1X	2.5 µL
		<b>dNTP's</b>	0.2 mM	2.5 µL
MC1Rer6	5'-CTGGGCTTGAGACCAGA	<b>Primers</b>	0.4 µM	1 µL
		<b>**Taq</b>	1.25 u/µL	0.25µL
		<b>MgCl<sub>2</sub>+</b>	2.5 mM	0.5 µL
		<b>ADN</b>	Variable	0.5 µL
<b>Ronda 2 Fuente: este trabajo</b>				
<b>Tamaño: 945pb</b>				

Cebador	Secuencia del cebador	Concentraciones/Volúmenes		
		Con.	Vol.	
MC1RSciF	5'-CTGCTTCCTACTTCCTGGACA	*Buffer	1X	5 µL
		dNTP's	0.2 mM	5 µL
		Primers	0.4 µM	2 µL
MC1RSciR	5- ACCAAAAGCCACCTCTCTGC	**Taq	1.25 u/µL	0.25µL
		MgCl <sub>2</sub> +	2.5 mM	1 µL
		ADN	Variable	1 µL

*Nota:* \* El volumen de buffer incluye una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2 mM; \*\* La Taq polimerasa empleada fue la DreamTaq Polymerase (Thermoscientific).

El éxito y la calidad de las extracciones de ADN y de las reacciones de PCR fueron verificados mediante la visualización de los productos en geles de agarosa al 0.8%, utilizando el agente fluorescente EZ-VISION (AMRESCO, Inc.). El tamaño de los fragmentos se determinó por contraste frente a un marcador de peso molecular con un rango entre 250 y 10000 pb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo-Scientific). Los amplificados con mayor intensidad, y que representaran el tamaño de banda esperado, fueron enviados al “Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol)”, en la Universidad Nacional de Colombia, para su respectiva purificación y secuenciación. Con el fin de mejorar la exactitud en el llamado de bases, esta última etapa se llevó a cabo en ambas direcciones (forward y reverse), utilizando los cebadores de amplificación originales (*IRBP*, *D-loop*), o colas M13 adicionadas al extremo 5' de los mismos (*Cytb*, *MC1R*) (M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'); el proceso se completó en un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

La inspección de los electroferogramas se efectuó con el programa Geneious R11 (Biomatters Limited), así como la edición, ensamblado y obtención de consensos a partir de las secuencias recibidas (forward y reverse). Se utilizó el genoma mitocondrial completo de la especie *Sciurus vulgaris* (número de acceso GenBank AJ238588) como mapa de referencia para los marcadores

*Cytb* y *D-loop*, mientras que para el *IRBP* se utilizó la secuencia generada por Mercer y Roth (2013) a partir de “*Sciurus granatensis*” (número de acceso AY227613.1), y para el *MC1R* las secuencias generadas por McRobie *et al.* (2014) a partir de las especies *Sciurus carolinensis*, *Sciurus niger* y *Sciurus vulgaris* (EU604831, KF052119, KF188571, respectivamente). Para confirmar que el material generado representara ADN endógeno de ardillas, todos los consensos fueron sometidos a búsquedas con el algoritmo BLAST (Altschul, 1990).

Como control de calidad adicional se efectuaron dos procedimientos:

1. Todas las secuencias generadas fueron alineadas con secuencias de diferentes especies de la tribu Sciurini disponibles en el GenBank (ver **tabla 2**); se usó el algoritmo de MUSCLE versión 3.8.425 implementado en Geneious R11. Esto permitió realizar una búsqueda manual minuciosa de anomalías en los datos, tales como inserciones o deleciones improbables.
2. La información nucleotídica fue traducida en aminoácidos, también en el programa Geneious R11. Esto facilitó la detección de codones de parada prematuros, los cuales pueden ser evidencia de amplificación de pseudogenes.

### **3.4 Análisis de información genética mitocondrial (neutral)**

**3.4.1 Diversidad genética mitocondrial.** Debido a la utilidad de los marcadores mitocondriales en la detección de patrones intraespecíficos, la información del *Cytb* y *D-loop* se utilizó como punto de partida para explorar la variación molecular en *Notosciurus granatensis*.

Las matrices con las secuencias generadas a partir de este taxón fueron alineadas independientemente en el programa Geneious R11 (Biomatters Limited), usando el algoritmo de MUSCLE versión 3.8.425 (Edgar, 2004) y los parámetros por defecto.

La diversidad genética en cada conjunto de datos se determinó con el programa DnaSP versión 6 (Rozas et al., 2017), mediante los siguientes estadísticos: **a.** número de sitios polimórficos (S); **b.** número de haplotipos (H) (Nei, 1987); **c.** diversidad haplotípica ( $H_d$ ) (Nei, 1987); **d.** diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987); y **e.** número promedio de diferencias nucleotídicas (k) (Tajima, 1983).

Para examinar las relaciones entre los haplotipos y detectar posibles patrones de agrupamiento, se construyeron redes haplotípicas para cada marcador utilizando el método de Median-joining (MJ) (Bandelt et al., 1999) implementado en programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>).

**3.4.2 Filogenia mitocondrial.** Con el fin de establecer a priori si existía estructuración de las poblaciones de *N. granatensis* en Colombia, y de esclarecer aspectos sobre la diferenciación a nivel subespecífico y específico, se llevaron a cabo análisis filogenéticos separados para las matrices del *Cytb* y el *D-loop*, así como un análisis concatenado con ambos marcadores. Para ello, se crearon nuevos alineamientos con todas las secuencias de la especie (grupo interno), en conjunto con secuencias de otros miembros de la tribu Sciurini (grupo externo), incluidas las especies hermanas candidatas, *Microsciurus alfari* y *Sciurus variegatoides* (Pecnerová et al., 2015) (tabla 2).

Tabla 2.

Relación de los taxa incluidos en los análisis filogenéticos con marcadores mitocondriales. **n.** Número de secuencias; **GB.** GenBank; **Etra.** Este trabajo; **In.** Grupo Interno; **Out.** Grupo Externo.

Citocromo B ( <i>Cytb</i> )					
<sup>a</sup> Especie putativa	(n)	GB	Etra.	In	Out
* <i>Microsciurus alfari</i>	1				
* <i>Microsciurus flaviventer</i>	1				
** <i>Microsciurus otinus</i>	2				
** <i>Microsciurus santanderensis</i>	4				

Citocromo B ( <i>Cytb</i> )					
<sup>a</sup> Especie putativa	(n)	GB	ETra.	In	Out
** <i>Microsciurus sp.</i>	1				
** <i>Notosciurus granatensis</i>	69				
** <i>Notosciurus pucherani</i>	4				
* <i>Sciurus aestuans</i>	3				
* <i>Sciurus anomalus</i>	2				
* <i>Sciurus aberti</i>	2				
* <i>Sciurus carolinensis</i>	1				
* <i>Sciurus depei</i>	1				
* <i>Sciurus flammifer</i>	1				
* <i>Sciurus granatensis</i>	2				
* <i>Sciurus igniventris</i>	1				
* <i>Sciurus lis</i>	2				
* <i>Sciurus niger</i>	2				
* <i>Sciurus spadiceus</i>	1				
* <i>Sciurus stramineus</i>	1				
* <i>Sciurus variegatoides</i>	1				
* <i>Sciurus vulgaris</i>	2				
<b>Totales = 19</b>	104	24	80	71	33
Región Control ( <i>D-loop</i> )					
<sup>a</sup> Especie putativa	(n)	GB	ETra.	In	Out
** <i>Microsciurus otinus</i>	2				
** <i>Microsciurus santanderensis</i>	4				
** <i>Microsciurus sp.</i>	1				
** <i>Notosciurus granatensis</i>	62				
** <i>Notosciurus pucherani</i>	3				
* <i>Sciurus carolinensis</i>	1				
<b>Totales = 6</b>	73	1	72	62	11
Citocromo B ( <i>Cytb</i> ) + Región Control ( <i>D-loop</i> )					
<sup>a</sup> Especie putativa	(n)	GB	ETra.	In	Out
* <i>Microsciurus alfari</i>	1				
** <i>Notosciurus granatensis</i>	62				
<b>Totales = 2</b>	63	1	62	62	1

*Nota:* <sup>a</sup> El estatus específico se considera putativo debido a que se basa en propuestas taxonómicas incongruentes entre sí. \* La nomenclatura de las especies con secuencias disponibles en el GenBank se ajusta en la mayoría de los casos a los trabajos de Thorington y Hoffmann (2005) y Thorington *et al.* (2012). \*\* La nomenclatura del material colectado aquí se ajusta al trabajo de De Vivo y Carmignotto (2015), el cual está enfocado en ardillas sudamericanas.

Se evaluó el grado de saturación en los datos (múltiples sustituciones en un mismo sitio del ADN) graficando el número de transversiones y transiciones versus las distancias genéticas GTR corregidas entre todos los taxa. Este procedimiento se efectuó en el programa DAMBE versión 5.3 (Xia, 2013) con el objetivo de determinar la idoneidad de la señal contenida en los marcadores mitocondriales, especialmente el *Cytb*, para realizar inferencias filogenéticas.

Posteriormente se determinó el modelo de evolución nucleotídica con mejor ajuste para ambos conjuntos de datos, utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) implementado en el programa jModelTest versión 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). Con base en esto, las 3 matrices de datos mencionadas anteriormente (*Cytb*, *D-loop* y *Cytb/D-loop*) fueron sometidas a 2 análisis filogenéticos basados en modelos:

- 1. Análisis de Máxima Verosimilitud:** se llevó a cabo en el programa GARLI versión 2.01 (Zwickl, 2006), aplicando los parámetros por defecto recomendados para conjuntos de datos pequeños (Voss *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2017). Para asegurar que el algoritmo encontrara una topología y un valor de lnL estables, se ejecutaron un total de 5 búsquedas independientes. El soporte nodal se evaluó con un análisis de Bootstrap no paramétrico (Felsenstein, 1985) a partir de 1000 matrices pseudoreplicadas, siempre usando las mismas condiciones de la búsqueda original. Los resultados de este análisis fueron anexados a la topología con el programa SumTrees, el cual hace parte de DendroPy versión 3.12.0 (Sukumaran y Holder, 2010). Se consideró que un nodo tenía soporte alto cuando su valor de Bootstrap era mayor al 75%, soporte moderado cuando el valor era mayor al 50% pero menor al 75%, y soporte bajo cuando el valor era menor al 50% (Gutiérrez *et al.*, 2017).
- 2. Análisis Bayesiano:** se llevó a cabo en el programa MrBayes versión 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). Para garantizar la convergencia de las topologías se efectuaron dos corridas

simultáneas, cada una con 4 Cadenas de Markov, que iniciaron a partir de árboles creados al azar y se mantuvieron durante 20.000.000 de generaciones; los parámetros se muestrearon cada 1000. La fase estacionaria y la convergencia se monitorearon en el programa Tracer versión 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014), graficando los valores de  $-\ln L$  por generación. El 25% de los puntos de muestreo previos a la asíntota fueron descartados (burn-in), y los restantes árboles (15.000) se combinaron para calcular las probabilidades a posteriori de los clados en un árbol consenso de mayoría. Se consideró que un nodo tenía soporte alto o significativo cuando su probabilidad a posteriori era mayor a 0.95, y soporte bajo o no significativo cuando era menor a 0.95 (Gutiérrez *et al.*, 2017).

**3.4.3 Identificación de especies putativas dentro de *Notosciurus granatensis*.** La topología recuperada a partir del análisis filogenético del marcador *Cytb* se usó como referencia para testear la hipótesis de múltiples especies dentro de *N. granatensis*. Los grandes haplogrupos encontrados, y con alto soporte estadístico, se consideraron “especies putativas”, sobre las cuales se calcularon los estadísticos incluidos en el paquete “Species Delimitation” del programa Geneious R11 (Masters *et al.*, 2011).

En el programa MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2015) se estimaron las distancias genéticas promedio no corregidas (p) y las distancias corregidas según el modelo Kimura-2-parámetros (K2P) (Kimura, 1980) a partir de dos matrices de secuencias del marcador *Cytb*: **1.** En la primera se incluyeron secuencias de todos los miembros de la tribu Sciurini, exceptuando *N. granatensis*, con el fin de establecer una referencia de los valores de divergencia interespecífica e intraespecífica en el grupo. **2.** En la segunda matriz se adicionaron todas las secuencias de *N. granatensis*, lo que permitió cuantificar, además, las distancias genéticas dentro y entre cada uno de los haplogrupos

considerados “especies putativas”. Los valores obtenidos se contrastaron con los reportados por Bradley y Baker (2001) para diferentes especies de roedores, y por Wauters *et al.* (2017) para ardillas, específicamente.

Adicionalmente, se utilizó el programa DnaSP versión 6 (Rozas *et al.*, 2017) para cuantificar la variación genética dentro de cada una de estas “especies putativas” mediante los siguientes estadísticos: **a.** Número de haplotipos (H) (Nei, 1987); **b.** diversidad haplotípica ( $H_d$ ) (Nei, 1987); **c.** diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987).

**3.4.4 Estructuración jerárquica de la variación genética mitocondrial.** Con el fin de examinar a detalle la distribución de la variación genética mitocondrial de *N. granatensis* en diferentes niveles jerárquicos, se realizaron una serie de Análisis Moleculares de Varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) en el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), usando los datos del *Cytb*.

Se plantearon las siguientes hipótesis de estructuración:

- 1. Poblaciones:** los datos se estructuraron a priori con base en el número de poblaciones de *N. granatensis* caracterizadas. Se consideró cada localidad visitada como una población independiente de las demás.
- 2. Propuesta taxonómica 2 (De Vivo y Carmignotto, 2015):** haplotipos asignados a 4 grupos definidos a priori, de acuerdo con la propuesta de subespecies de estos autores
- 3. Propuesta taxonómica 1 (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012):** Según la identidad taxonómica de los individuos de origen, cada haplotipo se asignó a uno de 20 grupos definidos a priori, los cuales se basan en las subespecies de *N. granatensis* reconocidas por estos autores.

**4. Haplogrupos (especies putativas):** esta hipótesis se basó en los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos de los marcadores mitocondriales. Por tanto, la estructuración a priori se definió según el número de haplogrupos con alto soporte estadístico recuperados (especies putativas), tanto en Máxima Verosimilitud, como en Inferencia Bayesiana.

Se calcularon los índices de fijación de Wright (1951) para determinar la cantidad de variación genética total explicada por: **a.** la diferenciación entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ ); **b.** diferenciación entre grupos ( $\Phi_{CT}$ ); **c.** diferenciación entre individuos dentro de poblaciones ( $\Phi_{ST}$ ). La significancia de dichos índices se probó mediante 10000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992).

**3.4.5 Posibles causas de la variación genética mitocondrial.** Con el objetivo de dilucidar el posible vínculo entre factores extrínsecos y la variación genética neutral dentro de *N. granatensis*, se probaron las siguientes hipótesis de causalidad:

- 1. Aislamiento por distancia:** donde los patrones de diferenciación genética entre poblaciones son explicados meramente por la distancia geográfica entre estas.
- 2. Aislamiento ambiental:** donde los patrones de diferenciación genética entre poblaciones son mejor explicados por las condiciones ambientales heterogéneas que las rigen.

Para ello se utilizó la prueba parcial de Mantel implementada en el programa zt (Bonnet y Van de Peer, 2002), la cual a diferencia de una prueba convencional permite calcular la correlación entre dos matrices de distancia mientras controla la influencia de una tercera matriz. Las matrices utilizadas fueron las siguientes:

- a. **Matriz de distancias genéticas (Citocromo B):** En el programa MEGA versión 7 (Kumar *et al.*, 2015) se calcularon las distancias genéticas corregidas según el modelo Kimura-2-parámetros (K2P) (Kimura, 1980) entre todas las poblaciones de *N. granatensis* muestreadas.
- b. **Matriz de distancias geográficas:** Con el programa Google Earth Pro (<https://www.google.com/earth/download/gep/agree.html>) se estimó la distancia lineal en Kilómetros entre las localidades muestreadas. Cada localidad se consideró como una población independiente.
- c. **Matriz de distancias ambientales:** Para cada una de las localidades muestreadas se recopiló la información correspondiente a las 21 variables ambientales descritas en la **tabla 5**. Debido a la diferencia de unidades, se aplicó un procedimiento de estandarización a la matriz inicial en el programa STATISTICA versión 7 (StatSoft, Inc., 2004). Posteriormente, para reducir el número de variables se implementó un Análisis de Componentes Principales (ACP) sobre los datos transformados. Finalmente, en el programa PAST versión 3.20 (Hammer *et al.* 2001) se obtuvo una matriz de disimilitud ambiental entre las localidades muestreadas a partir del cálculo de las distancias euclidianas entre los tres primeros componentes del ACP.

Para probar la primera hipótesis se efectuó una prueba parcial de Mantel en la que se correlacionaron las matrices de distancias genéticas y geográficas, al tiempo que se controlaba el efecto de las distancias ambientales. En el caso de la segunda hipótesis, la correlación se llevó a cabo entre las matrices de distancias genéticas y ambientales, mientras que se controlaba el efecto de las distancias geográficas. En ambas pruebas se evaluó la significancia mediante 100.000 permutaciones.

### 3.5 Análisis filogenéticos combinados (Mitocondrial y Nuclear)

Con el propósito de elucidar las relaciones interespecíficas de *Notosciurus granatensis*, y de abordar conflictos históricos sobre la diferenciación a nivel específico y congénico en la tribu Sciurini, la información del gen mitocondrial *Cytb* se combinó con información del gen nuclear *IRBP* en un contexto filogenético más amplio.

Para estos análisis se consideró como grupo interno a toda la tribu Sciurini, y se incluyeron todas las especies con información disponible para ambos marcadores. Las secuencias fueron descargadas del repositorio público GenBank y generadas en el presente trabajo a partir de algunos miembros del género *Microsciurus* (sensu Thorington y Hoffman, 2012) y de la especie *Notosciurus granatensis*. Respecto a esta última, solo se incluyó una secuencia por cada haplogrupo o “especie putativa” recuperada en los análisis de los marcadores mitocondriales. Como grupo externo se designaron las especies *Pteromys volans* y *Glaucomyz volans*, ambas pertenecientes a Pteromyini, tribu hermana de Sciurini (**tabla 3**).

Los alineamientos de ambas matrices se realizaron independientemente en el programa Geneious R11 (Biomatters Limited), usando el algoritmo de MUSCLE versión 3.8.425 (Edgar, 2004) y los parámetros por defecto.

El modelo de evolución nucleotídica con mejor ajuste a cada conjunto de datos se determinó en el programa jModelTest versión 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2010), bajo el Criterio de Información de Akaike (AIC).

Posteriormente, las matrices fueron concatenadas en el programa Geneious R11 y analizadas bajo los mismos esquemas de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud implementados para los marcadores mitocondriales.

Tabla 3.

Relación de los taxa incluidos en los análisis filogenéticos con los marcadores *CytB* e *IRBP*. *n.* Número de secuencias; **GB.** GenBank; **Etra.** Este trabajo.

<sup>a</sup> Especie putativa	Tribu	(n)	<i>CytB</i>	<i>IRBP</i>	GB.	Etra.
* <i>Microsciurus alfari</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Microsciurus flaviventer</i>	Sciurini	1	Si	Si		
** <i>Microsciurus otinus</i>	Sciurini	1	Si	Si		
** <i>Microsciurus santanderensis</i>	Sciurini	1	Si	Si		
** <i>Notosciurus granatensis</i>	Sciurini	<sup>b</sup> 4	Si	Si		
** <i>Notosciurus pucherani</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus aestuans</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus anomalus</i>	Sciurini	1	Si	No		
* <i>Sciurus aberti</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus carolinensis</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus granatensis</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus griseus</i>	Sciurini	1	No	Si		
* <i>Sciurus igniventris</i>	Sciurini	1	Si	No		
* <i>Sciurus ignitus</i>	Sciurini	1	No	Si		
* <i>Sciurus lis</i>	Sciurini	1	Si	No		
* <i>Sciurus niger</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus spadiceus</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus stramineus</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus variegatoides</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Sciurus vulgaris</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Rheithrosciurus macrotis</i>	Sciurini	1	No	Si		
* <i>Tamiasciurus douglassi</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	Sciurini	1	Si	Si		
* <i>Pteromys volans</i>	Pteromyini	1	Si	Si		
* <i>Glaucomys volans</i>	Pteromyini	1	Si	Si		
<b>Totales = 25</b>						

*Nota:* <sup>a</sup> El estatus específico se considera putativo debido a que se basa en propuestas taxonómicas incongruentes entre sí. \* La nomenclatura de las especies con secuencias disponibles en el GenBank se ajusta en la mayoría de los casos a los trabajos de Thorington y Hoffmann (2005) y Thorington *et al.* (2012). \*\* La nomenclatura del material colectado aquí se ajusta al trabajo de De Vivo y Carmignotto (2015), el cual está enfocado en ardillas sudamericanas. <sup>b</sup> Solo se incluyó una secuencia de cada marcador por haplogrupo de *N. granatensis* recuperado en los análisis con marcadores mitocondriales

### 3.6 Análisis del contexto temporal de la diversificación de *Notosciurus granatensis*

Para establecer la edad de los principales linajes de *Notosciurus granatensis* (especies putativas), se implementó un análisis filogenético con estimación simultánea de tiempos de divergencia. Este se llevó a cabo bajo un contexto bayesiano en el programa BEAST versión 2.4.5 (Bouckaert *et al.*, 2014), usando los marcadores *Cytb* e *IRBP*. Como fuente de información primaria para la calibración a tiempo absoluto se usó el registro fósil dentro de los órdenes Rodentia (roedores) y Lagomorpha (conejos), el cual se encuentra relativamente bien estudiado (Pierre-Henri *et al.*, 2012). No obstante, con el fin de evitar problemas relacionados a tasas mutacionales dependientes del tiempo, las cuales derivan de tener puntos de calibración a partir de taxa muy lejanamente emparentados con el grupo focal (*Notosciurus granatensis*) (Ho *et al.*, 2008), el análisis se dividió en dos etapas, siguiendo la metodología de Chavez *et al.* (2013):

1. **Etapla 1 “filogenia interespecífica”:** En esta etapa se construyó una primera filogenia escalada en tiempo a partir de los datos combinados de los marcadores moleculares *Cytb* e *IRBP*. Se utilizó una cobertura taxonómica amplia para acomodar la información de datación (registro fósil), incluyendo secuencias de diferentes lagomorfos y roedores (entre estos últimos varias ardillas de la tribu Sciurini y un representante de cada especie putativa de *N. granatensis*) (**anexos 3 y 4**). Se forzó la monofilia de 5 nodos a lo largo de toda la filogenia, y sobre ellos se impusieron los priores de calibración: **1.** Glires (Rodentia+Lagomorpha); **2.** Lagomorpha; **3.** Mus/Rattus; **4.** Sciuridae; **5.** Sciurini (**anexos 3 y 4**). Dichos priores fueron modelados con distribuciones paramétricas gamma o exponencial, de manera tal que los nodos tuviesen un límite inferior estricto (edad mínima del fósil en ese clado) y un límite superior suave (edad X en la que no existían aún

representantes del clado) (Ho y Phillips, 2009) (**anexo 4**). Este arreglo en teoría permite que la información molecular corrija la información fósil conflictiva (Yang y Rannala, 2005). Las particiones (*CytB* e *IRBP*) se trataron de manera independiente y a cada una de ellas se le asignó su propio modelo de evolución nucleotídica, previamente seleccionado en el programa jModelTest versión 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2010). Para estimar las tasas de sustitución, se adoptó un esquema de dos relojes moleculares relajados, uno para el marcador nuclear y otro para el mitocondrial. Se permitió que ambos genes compartieran la misma topología y sobre esta se modelaron los eventos de especiación en el tiempo a través de un prior de Yule. Para garantizar la convergencia se ejecutaron dos análisis independientes bajo la misma configuración; los archivos XML de entrada fueron creados en el programa BEAUTi, el cual hace parte de BEAST. Se corrieron un total de 300.000.000 de generaciones en cada análisis con un muestreo de parámetros cada 30.000, lo que dio una distribución posterior de 10.000 árboles; el 10% de estos fueron descartados como burn-in. Se utilizó el programa Tracer versión 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para monitorear la convergencia, la estacionariedad y un valor de ESS (tamaño efectivo de la muestra) superior a 200, este último indicando una adecuada mezcla de los parámetros. Finalmente, en el programa TreeAnnotator (parte de BEAST) se obtuvo un árbol de máxima credibilidad de clados a partir de los 9000 árboles post burn-in.

2. **Etapa 2 “filogenia intraespecífica”**: en esta etapa se construyó una filogenia escalada en tiempo exclusiva para *Notosciurus granatensis*. Se utilizaron solo los datos del marcador mitocondrial *Cytb*, incluyendo secuencias de cada uno de los grandes linajes (haplotipos/especies putativas) recuperados en los análisis anteriores, así como una secuencia de la especie hermana candidata, *Microsciurus alfari*. Se implementó una

estrategia de datación a partir de información secundaria obtenida en el análisis de la etapa 1: el intervalo de edades de divergencia entre ambas taxa se impuso como prior de calibración, el cual fue modelado con una distribución normal. De esta forma se aseguró que el nodo que los separa tuviese un límite inferior suave (edad mínima de divergencia), y un límite superior también suave (edad máxima de divergencia) (Ho y Phillips, 2009); la media se ajustó a 3.23 Ma. (millones de años) (**anexos 3 y 4**). A diferencia del análisis anterior, en este se adoptó un esquema de reloj molecular estricto para calcular las tasas de sustitución, en conjunto con un prior coalescente para modelar la especiación en el tiempo. Se corrieron 200.000.000 de generaciones con un muestreo cada 20.000, lo que dio una distribución posterior de 10.000 árboles; el 10% de estos fueron descartados como Burn-in. Se utilizó el programa Tracer versión 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para monitorear la convergencia, la estacionariedad y un valor de ESS (tamaño efectivo de la muestra) superior a 200, este último indicando una adecuada mezcla de los parámetros. Finalmente, en el programa TreeAnnotator (parte de BEAST) se obtuvo un árbol de máxima credibilidad de clados a partir de los 9000 árboles post burn-in.

### **3.7 Modelamiento biogeográfico:**

Para comprender detalles sobre la diversificación de la ardilla de cola roja, al contexto temporal se le sumó el contexto biogeográfico mediante un análisis de reconstrucción del área ancestral basado en Máxima Verosimilitud. Este se llevó a cabo con el algoritmo de LAGRANGE en el programa RASP versión 4.0 (Yu *et al.*, 2015), usando los siguientes archivos de entrada:

- 1. Filogenia escalada en tiempo:** se utilizó una versión reducida de la filogenia obtenida en la etapa 1 del análisis anterior, incluyendo solo los taxa pertenecientes a la tribu Sciurini con distribución en el Nuevo Mundo.
- 2. Esquema de áreas:** siguiendo la propuesta de Jansa *et al.* (2013), cada uno de los taxa de la filogenia fue asignado, según su distribución geográfica conocida, a una o dos grandes áreas: Norteamérica (incluida Centroamérica) y Sudamérica.

Se implementó un modelo de Dispersion-Extinción-Cladogénesis (DEC) permisivo, en el cual cada taxón o nodo podía ocurrir en ambas áreas, y en el que se permitía la dispersión bidireccional entre estas.

### **3.8 Análisis de la Variación genética no neutral (*MC1R*: gen candidato implicado en la coloración del pelaje)**

**3.8.1 Reconstrucción de la proteína (Receptor-1 de la Melanocortina).** Mediante el servidor en línea TMHMM versión 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) se predijo la topología transmembranal de la proteína producida por el gen *MC1R* en *Notosciurus granatensis*; se utilizaron como base solo aquellas secuencias nucleotídicas que representaran la región codificante completa del gen (945 pares de bases). A partir de esta información se reconstruyó la estructura bidimensional de dicha proteína, y en ella se mapeó la posición relativa de los cambios en los aminoácidos, tanto a nivel “intraespecífico”, como respecto de otras especies de ardillas (McRobie *et al.*, 2009, 2014).

**3.8.2 Inspección visual de los polimorfismos.** Con el fin de determinar una posible relación entre la variación fenotípica y la variación en el gen *MC1R*, se realizó una inspección visual de

todas las secuencias de este marcador generadas a partir de los individuos de *Notosciurus granatensis*. Se buscaron polimorfismos específicos relacionados con cambios en la coloración del pelaje, usando como referencia secuencias de varias especies de vertebrados en las que han sido previamente documentados: **a.** Ardillas: *Sciurus carolinensis*, (McRobie *et al.*, 2014); **b.** Otros grupos: *Mus musculus* (Robbins *et al.*, 1993), *Chaetodipus intermedius* (Nachman *et al.*, 2002), *Sus scrofa* (Kijas *et al.*, 1998), *Panthera onca* y *Puma yagouaroundi* (Eizirik *et al.*, 2003), *Coereba flaveola* (Theron *et al.*, 2001). Para la comparación se creó un alineamiento con todo el conjunto de datos en el programa Geneious R11, implementando los parámetros por defecto del algoritmo de MUSCLE versión 3.8.425 (Edgar, 2004). En este mismo programa, las cadenas de nucleótidos fueron traducidas a cadenas de aminoácidos, lo que permitió establecer la naturaleza sinónima o no sinónima de las mutaciones y por ende su posible implicación en cambios estructurales en la proteína codificada.

**3.8.3 Diversidad genética.** Se utilizó programa PHASE versión 2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens y Scheet, 2005) para hallar la fase haplotípica en algunas secuencias del *MC1R* con posiciones heterocigóticas. El procedimiento se aplicó preferencialmente en aquellos casos en los que se encontraron menos de tres de estas posiciones por secuencia. Se implementaron los parámetros por defecto para análisis con sitios bialélicos, manteniendo así los umbrales de probabilidad (-p y -q) en un 90%. Posteriormente, se creó un alineamiento en el que los individuos heterocigotos de la muestra estaban representados por las dos secuencias o haplotipos inferidos en el análisis anterior, es decir, una copia de cada alelo. Se cuantificó la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) de este alineamiento (conjunto total de datos) en el programa DnaSP versión 6 (Rozas *et al.*, 2017), mientras que para cada “especie putativa” de *N. granatensis* se determinó, en

conjunto con estos dos parámetros, el número total de haplotipos (**H**). Para examinar la posible existencia de presiones selectivas sobre el marcador *MCIR*, se efectuaron en este mismo programa las pruebas de neutralidad de Tajima (**D**) (Tajima, 1989) y McDonald-Kreitman (McDonald y Kreitman, 1991); para esta última se utilizaron como grupos externos las especies de ardillas *Sciurus carolinensis*, *Sciurus niger* y *Sciurus vulgaris*.

Con el propósito de visualizar la relación entre los haplotipos del *MCIR* en *N. granatensis*, se construyó una red haplotípica con el método de TCS (Clement *et al.*, 2000) implementado en el programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>).

**3.8.4 Estructuración jerárquica de la variación en el *MCIR*.** Finalmente, la distribución de la variación genética del marcador *MCIR* en diferentes niveles jerárquicos se evaluó mediante una serie de Análisis Moleculares de Varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) en el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Se probaron las mismas hipótesis de estructuración planteadas para los marcadores mitocondriales:

- 1. Ausencia de estructura:** los haplotipos no fueron asignados a grupos definidos a priori.
- 2. Propuesta taxonómica 1 (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012):** Según la identidad taxonómica de los individuos de origen, cada haplotipo se asignó a uno de 16 grupos definidos a priori, los cuales se basan en el número de subespecies de *N. granatensis* reconocidas por estos autores para Colombia.
- 3. Propuesta taxonómica 2 (De Vivo y Carmignotto, 2015):** haplotipos asignados a 3 grupos definidos a priori, de acuerdo con igual número de subespecies reconocidas por estos autores para el país.

4. **Poblaciones:** los datos se estructuraron a priori con base en el número de poblaciones de *N. granatensis* caracterizadas. Se consideró cada localidad visitada como una población independiente de las demás.
5. **Haplogrupos (especies putativas):** esta hipótesis se basó en los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos de los marcadores mitocondriales. Por tanto, la estructuración a priori se definió según el número de haplogrupos con alto soporte estadístico recuperados (especies putativas), tanto en Máxima Verosimilitud, como en Inferencia Bayesiana.

Se calcularon los índices de fijación de Wrigth (1951) para determinar la cantidad de variación genética total explicada por: **a.** la diferenciación entre poblaciones dentro de grupos ( $\Phi_{SC}$ ); **b.** diferenciación entre grupos ( $\Phi_{CT}$ ); **c.** diferenciación entre individuos dentro de poblaciones ( $\Phi_{ST}$ ). La significancia de dichos índices se probó mediante 10000 permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992).

### 3.9 Análisis estadístico de la variación fenotípica

Para evaluar la posible influencia de factores ambientales en los patrones de variación fenotípica de *Notosciurus granatensis*, se implementó la siguiente metodología:

#### 3.9.1 Selección de variables.

1. **Variables fenotípicas** Se definieron arbitrariamente un total de 20 variables fenotípicas, principalmente de aspecto y patrón de coloración del pelaje, teniendo en cuenta el material

colectado y revisado en colecciones biológicas, así como las descripciones detalladas compiladas de la literatura (**tabla 4**) (**figura 2**). La condición de dichas variables fue verificada en especímenes provenientes de 72 localidades a lo largo de toda Colombia (salvo escasas localidades de Panamá y Venezuela), y codificada como presencias y ausencias en cada uno de ellos (1 y 0, respectivamente):

Tabla 4.

*Listado de variables fenotípicas tomadas en especímenes de N. granatensis.*

<b>Variables fenotípicas destacadas en las poblaciones de <i>Notosciurus granatensis</i></b>	
<b>Aspecto general:</b>	
	<b>Largo del pelaje</b>
	1. Pelaje muy corto
	2. Pelaje intermedio
	3. Pelaje largo, laxo y lanoso
<b>Patrón de coloración:</b>	
	<b>Región dorsal:</b>
	4. Coloración muy oscura
	5. Coloración rojiza-naranja uniforme
	6. Coloración rojiza-café
	7. Coloración café oscura
	8. Coloración naranja-amarillenta
	9. Coloración café-olivácea
	10. Contraste fuerte en hombros y región escapular
	11. Contraste débil en hombros y región escapular
	12. Línea media-dorsal bien definida
	13. Región posterior del dorso con abundante negro
	<b>Región ventral:</b>
	14. Coloración blanca pura
	15. Coloración rojiza-naranja pura
	16. Coloración combinada

---

**VARIABLES FENOTÍPICAS DESTACADAS EN LAS POBLACIONES DE *Notosciurus granatensis***


---

**Cola:**

17. Cola con dos segmentos

18. Cola con tres segmentos

- 
2. **VARIABLES AMBIENTALES:** Se hizo una selección inicial de 21 variables bioclimáticas a partir de los conjuntos de datos de WorldClim 1 (Hijmans *et al.*, 2005) y WorldClim 2 (Fick y Hijmans, 2017), teniendo en cuenta su posible influencia en la pigmentación en mamíferos según lo reportado por trabajos previos (Nigenda-Morales *et al.*, 2018) (**tabla 5**). Para un total de 40 localidades con información fenotípica y geográfica disponible, se extrajeron los valores de cada variable mediante un proceso de interpolación en el complemento “point sampling tool” del programa QGIS versión 2.18.6 (QGIS Development Team, 2018).

Tabla 5.

*Listado de variables ambientales medidas*

<b>WorldClim 1</b>
1. Temperatura media anual
2. Rango diurno medio
3. Isotermalidad
4. Estacionalidad de la temperatura
5. Temperatura máxima del mes más caliente
6. Temperatura mínima del mes más frío
7. Rango anual de temperatura
8. Temperatura media del cuarto más húmedo
9. Temperatura media del cuarto más seco
10. Temperatura media del cuarto más caliente
11. Temperatura media del cuarto más frío
12. Precipitación anual
13. Precipitación del mes más húmedo
14. Precipitación del mes más seco

---

**WorldClim 1**

---

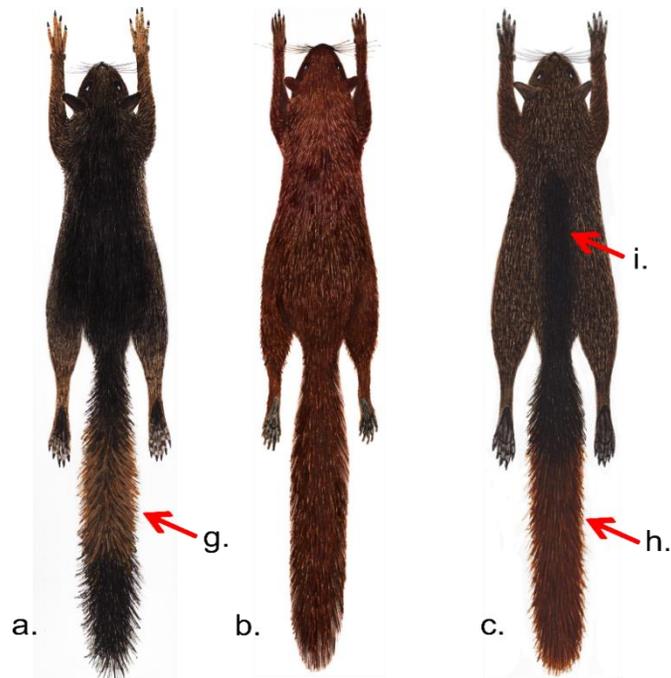
- 15. Estacionalidad de la precipitación
- 16. Precipitación del cuarto más húmedo
- 17. Precipitación del cuarto más seco
- 18. Precipitación del cuarto más caliente
- 19. Precipitación del cuarto más frío

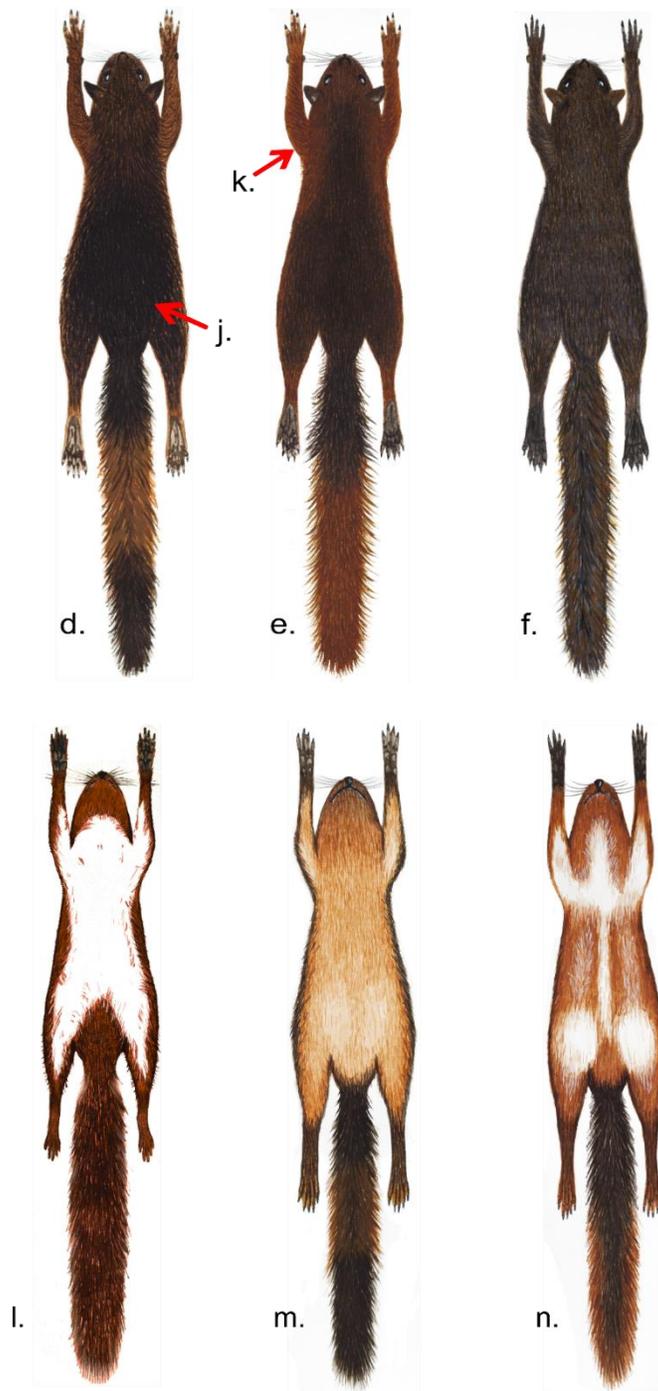
---

**WorldClim 2**

---

- 20. Radiación solar
  - 21. Presión del vapor de agua
- 





**a.** Coloración dorsal muy oscura; **b.** Coloración dorsal rojiza-naranja uniforme; **c.** C. d. rojiza-café; **d.** C. d. café oscura; **e.** C. d. naranja-amarillenta; **f.** C. d. café-olivácea; **g.** Cola con tres segmentos; **h.** Cola con dos segmentos; **i.** Línea media-dorsal bien definida; **j.** Región posterior del dorso con abundante negro; **k.** Contraste fuerte en hombros y región escapular. **l.** Coloración ventral blanca pura; **m.** Coloración ventral rojiza-naranja pura; **n.** Coloración ventral combinada.

**Ilustración:** Juan Flórez

*Figura 2.* Variables de coloración del pelaje seleccionadas para análisis

**3.9.2 Patrones ambientales y fenotípicos.** Debido a la diferencia de unidades entre las variables ambientales, se aplicó un procedimiento de estandarización a la matriz inicial en el programa STATISTICA versión 7 (StatSoft, Inc., 2004). Posteriormente, para reducir la dimensionalidad y detectar posibles patrones fenotípicos propiciados por el ambiente, se implementó un Análisis de Componentes Principales (ACP) sobre los datos transformados; para esto se tuvo en cuenta la identidad taxonómica de los especímenes de las 40 localidades (según las propuestas 1 y 2 mencionadas anteriormente). Adicionalmente, mediante un Análisis de Agrupamiento en el programa PAST versión 3.20 (Hammer *et al.* 2001), estas localidades fueron ordenadas a partir de la información ambiental resumida en los tres primeros componentes del ACP; en este análisis se utilizó el algoritmo de Ward y las distancias euclidianas como índice de similitud.

Partiendo de la premisa de que el ambiente puede estar actuando como agente modulador del fenotipo (Zamudio *et al.*, 2016; Nigenda-Morales *et al.*, 2018), en estos dos análisis se esperaría el agrupamiento de localidades con el mismo fenotipo o con fenotipos muy parecidos, es decir, el agrupamiento de las localidades de una misma subespecie o de subespecies muy parecidas.

**3.9.3 Relación Ambiente-Fenotipo.** Los patrones de asociación ambiente-fenotipo fueron explorados mediante un Análisis de Correspondencias Canónicas (ACC) en el programa PAST versión 3.20 (Hammer *et al.* 2001). Para este propósito se utilizaron los datos de presencia-ausencia de las características fenotípicas examinadas en los especímenes de las 40 localidades (variables de respuesta), en conjunto con dos matrices de datos ambientales: una con las 21 variables originales y otra con las variables con mayor aporte a los dos primeros componentes del ACP (variables explicativas).

## 4. Resultados

### 4.1 Recolección de especímenes

Se recolectaron un total de 62 individuos de *Notosciurus granatensis*, principalmente en el norte de Colombia, a lo largo de un área que comprende aproximadamente 230.641 km<sup>2</sup> (Polígono Mínimo Convexo de las localidades de muestreo) y que representa más o menos el 23,1% del rango geográfico total de la especie (IUCN, 2019) y el 48,8% de su rango en el país. Se abarcaron 23 localidades ecológicamente heterogéneas (Olson *et al.*, 2001) (**figura 3**), en un intervalo altitudinal que va desde los 25 m (El Valle, Bahía Solano, Chocó - localidad 11 en **figura 3**) hasta los 2.144 m (Santa Bárbara, Santander – localidad 21 en **figura 3**).

Localidades señaladas en el mapa (**figura 3**):

1. Bolívar, Cartagena (10.382, -75.477; 13 m); Matorral seco de La Guajira-Barranquilla.  
Localidad tipo de la especie.
2. Atlántico, Piojó (10.749, -75.107; 304 m); Matorral seco de La Guajira-Barranquilla.
3. Magdalena, Santa Marta, corregimiento de Minca (11.142, -74.117; 630 m); Matorral seco de La Guajira-Barranquilla.
4. Cesar, Pueblo Bello (10.440, -73.573; 1216 m); Bosque Montano de Santa Marta.
5. Cesar, El Paso (9.666, -73.734; 41 m); Bosque Seco del Valle del Sinú.
6. Cesar, Curumaní, (9.176, -73.460; 348 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.

7. Cesar, La Gloria, corregimiento de Ayacucho (8.601, -73.585; 141 m); Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.
8. Norte de Santander, Ocaña, corregimiento de Otaré (8.401, - 73.423; 1526 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
9. Norte de Santander, Puerto Santander (8.336, -72.507; 87 m); Bosque Húmedo del Catatumbo.
10. Bolívar, Santa Rosa del Sur (7.974, -74.059; 615 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
11. Córdoba, Montelíbano (7.907, -75.498; 48 m); Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.
12. Chocó, Bahía Solano, corregimiento de El Valle (6.076, -77.388; 25 m); Bosque Húmedo del Chocó-Darién.
13. Cundinamarca, Choachí (4.525, -73.912; 1720 m); Bosque Montano de la Cordillera Oriental.
14. Santander, Puerto Wilches, corregimiento de Campo Duro, en inmediaciones de la Ciénaga de Paredes (7.405, 73.798, 66 m); Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.
15. Santander, Barrancabermeja (7.061, -73.852; 84 m); Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.
16. Santander, Sabana de Torres (7.394, -73.500; 128 m); Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.
17. Santander, Lebrija, corregimiento de Uribe Uribe (7.266, -73.357; 192 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
18. Santander, El Playón (7.471, -73.196; 552 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.

19. Santander, Bucaramanga, Campus de la Universidad Industrial de Santander (7.140, -73.118; 996 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
20. Santander, Floridablanca (7.080, -73.109; 895 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
21. Santander, Piedecuesta (6.982, -73.059; 1069 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
22. Santander, Santa Bárbara (7.005, -72.909; 2144 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
23. Santander, Zapatoca (6.843, -73.288; 1809 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.
24. Santander, San Vicente de Chucurí, vereda La Colorada (6.792, -73.477; 1269 m); Bosque Montano del Valle del Magdalena.

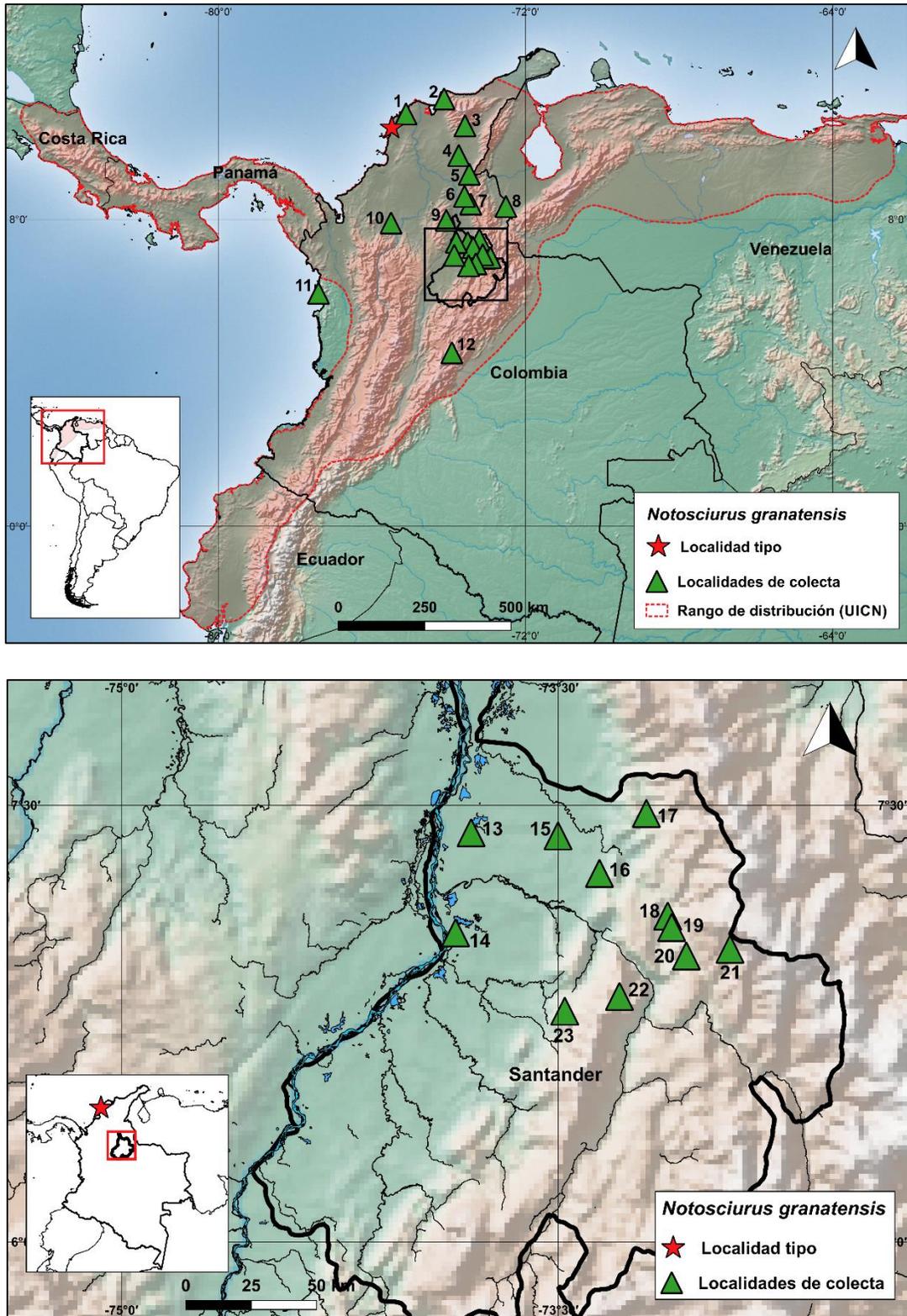


Figura 3. Localidades de recolecta de la ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, en Colombia. No se incluyen las localidades dentro del departamento de Santander.

Pese a que no se efectuaron recolectas en la localidad tipo, si se obtuvieron algunos topotipos en una localidad cercana (57,12 Km al norte en línea recta) y con condiciones ecológicas similares. El patrón de coloración del pelaje en estos especímenes, y en los de las restantes localidades, se describen a detalle en el **anexo 5**.

#### 4.2 Descripción fenotípica y asignación taxonómica de los especímenes recolectados

El total de la muestra incluye especímenes asignables a las tres subespecies reconocidas para Colombia por de Vivo y Carmignotto (2015), a 13 de las 17 subespecies reconocidas por Nitikman (1985) y Thorington *et al.* (2012) para el país, y a una subespecie reconocida también por estos últimos autores, pero supuestamente restringida a Venezuela. Especímenes provenientes de las localidades 14, 22 y 23 (**figura 4**), localizadas en el Valle Medio del Magdalena y hacia el flanco occidental de la cordillera Oriental, exhiben características particulares que no encajan con las descripciones de las subespecies reconocidas; por tal razón, aquí se mantienen como indeterminados.

Tabla 6.

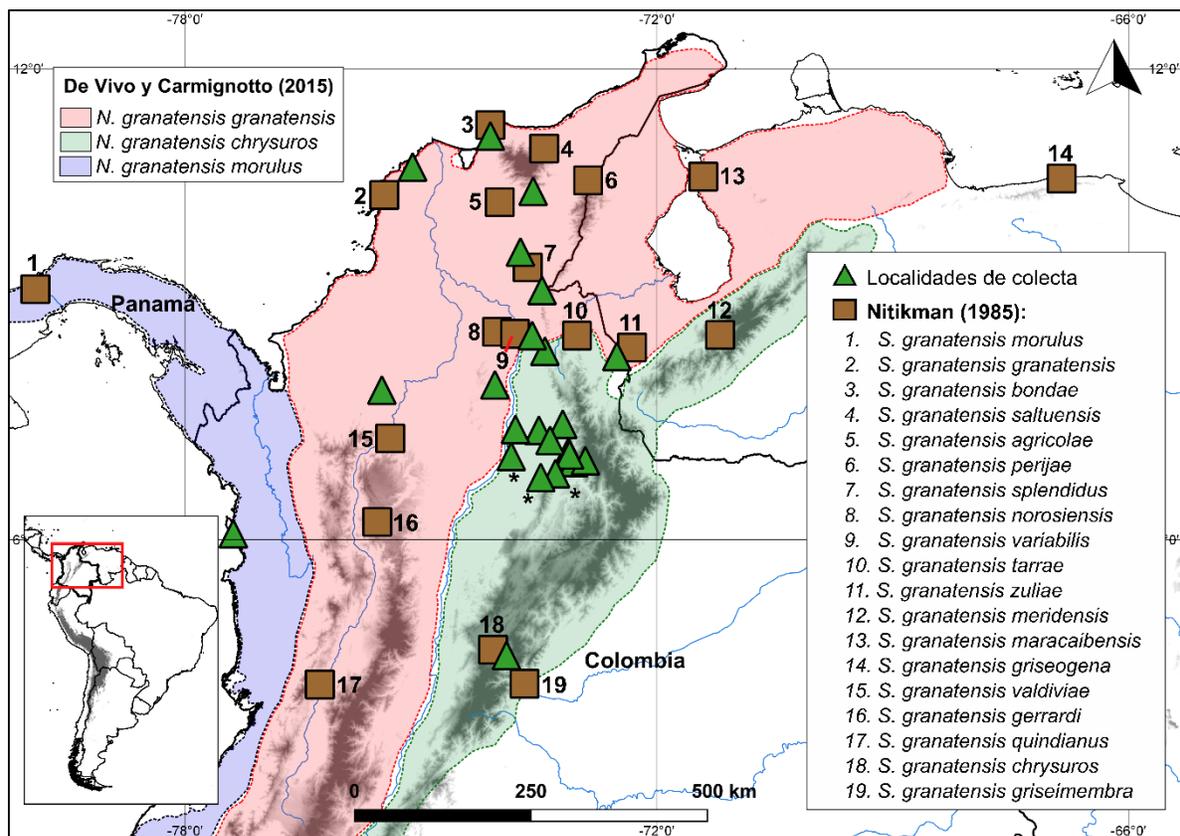
**Subespecies encontradas en las localidades de recolecta, según las propuestas de Nitikman (1985), Thorington et al. (2012) y De Vivo y Carmignotto (2015).**

Localidad de recolecta	Subespecie (Nitikman, 1985)	Subespecie (De Vivo y Carmignotto, 2015)
1. Piojó, Atlántico	<i>Sciurus granatensis granatensis</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
2. Minca, Santa Marta, Magdalena	<i>Sciurus granatensis bondae</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
3. Pueblo Bello, Cesar	<i>Sciurus granatensis saltuensis</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>

<b>Localidad de recolecta</b>	<b>Subespecie (Nitikman, 1985)</b>	<b>Subespecie (De Vivo y Carmignotto, 2015)</b>
4. El Paso, Cesar	<i>Sciurus granatensis splendidus</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
5. Curumaní, Cesar	<i>Sciurus granatensis variabilis</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
6. Ayacucho, La Gloria, Cesar	<i>Sciurus granatensis variabilis</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
7. Otaré, Ocaña, Norte de Santander	<i>Sciurus granatensis maracaibensis*</i> y <i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
8. Puerto Santander, Norte de Santander	<i>Sciurus granatensis tarrae</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
9. Santa Rosa del Sur, Bolívar	<i>Sciurus granatensis norosiensis</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
10. Montelíbano, Córdoba	<i>Sciurus granatensis gerrardi</i>	<i>Notosciurus granatensis granatensis</i>
11. El Valle, Bahía Solano, Chocó	<i>Sciurus granatensis morulus</i>	<i>Notosciurus granatensis morulus</i>
12. Choachí, Cundinamarca	<i>Sciurus granatensis chrysuros</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
13. Campo Duro, Puerto Wilches, Santander	<i>Sciurus granatensis norosiensis</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
14. Barrancabermeja, Santander	Indeterminado	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
15. Sabana de Torres, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
16. Uribe Uribe, Lebrija, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
17. El Playón, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
18. Bucaramanga, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
19. Floridablanca, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
20. Piedecuesta, Santander	<i>Sciurus granatensis zuliae</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>
21. Santa Bárbara, Santander	<i>Sciurus granatensis meridensis</i>	<i>Notosciurus granatensis chrysuros</i>

Localidad de recolecta	Subespecie (Nitikman, 1985)	Subespecie (De Vivo y Carmignotto, 2015)
22. Zapatoca, Santander	Indeterminado	<i>Notosciurus granatensis chrysueros</i>
23. San Vicente De Chucurí, Santander	Indeterminado	<i>Notosciurus granatensis chrysueros</i>

Nota: \* denota una subespecie reconocida solo para Venezuela



\*\* corresponden a localidades en las cuáles no se pudo realizar la asignación de los especímenes a las subespecies descritas.

Figura 4. Relación entre las localidades de recolecta, las localidades tipo de algunas de las subespecies reconocidas por Nitikman (1985), y los rangos aproximados de distribución de las subespecies reconocidas por de Vivo y Carmignotto (2015) para Colombia.

A partir de la información recopilada de los especímenes recolectados, de especímenes depositados en colecciones biológicas de Colombia, y de descripciones precisas de la literatura,

los patrones más destacados de variación fenotípica de *Notosciurus granatensis* en el país se pueden sintetizar de la siguiente forma: **a.** Los fenotipos más claros (menos melánicos) y uniformes se observan en poblaciones localizadas en tierras bajas del norte de Colombia y que corresponden a las subespecies *Notosciurus granatensis granatensis*, según De Vivo y Carmignotto (2015) y *Sciurus granatensis granatensis*, *Sciurus granatensis splendidus* y *Sciurus granatensis agricolae*, según Nitikman, (1985) y Thorington *et al.*, (2012). Los especímenes de dichas localidades exhiben un pelaje dorsal entre rojizo y naranja claro y un pelaje ventral siempre blanco; **b.** En contraste, los fenotipos más oscuros (más melánicos) son típicos de poblaciones localizadas en el norte de la cordillera Oriental, en la región del alto Catatumbo, y hacia las tierras bajas del alto Zulia, en la frontera entre Colombia y Venezuela. Los especímenes de dichas poblaciones presentan una coloración dorsal entre café oscura y negruzca, con contraste débil o fuerte en los hombros y región escapular, así como la región ventral naranja brillante, con o sin manchas o líneas blancas. Estas características son típicas de las subespecies *N. g. granatensis* y *N. g. chrysueros*, según de Vivo y Carmignotto (2015), y *S. g. maracaibensis* y *S. g. tarrae*, según Nitikman (1985) y Thorington *et al.* (2012).

Las restantes poblaciones del país de las que se tiene información exhiben fenotipos intermedios, con un amplio rango de variación: **c.** La mayoría de las poblaciones localizadas sobre la cordillera Oriental mantienen en la región dorsal un patrón agutí casi uniforme, de tono café-oliváceo, un pelaje ventral anaranjado, con o sin manchas o líneas blancas, y el  $\frac{1}{4}$  terminal de la cola teñido de negro. Cabe destacar que en las poblaciones a mayor altitud se encuentran especímenes con un pelaje muy largo, laxo y lanoso que no se aprecia en poblaciones de las cordilleras Central y Occidental; **d.** Hacia las tierras bajas del Magdalena Medio se localizan poblaciones con un pelaje dorsal naranja-amarillento, fuerte contraste anaranjado en la región

escapular y los hombros, vientre anaranjado con o sin manchas y líneas blancas y los <sup>2/3</sup> terminales de la cola teñidos de un color entre naranja-rojizo y naranja intenso; e. En algunas de las poblaciones de las cordilleras Central y Occidental se mantiene un patrón general de coloración similar al de las poblaciones de la cordillera Oriental, sin embargo, destaca la presencia de una banda media-dorsal negra muy marcada que confiere un aspecto general más oscuro; f. En las tierras húmedas del Pacífico Colombiano prevalece esta distintiva banda media-dorsal, sin embargo, los especímenes de esta región tienen mayor contraste en los hombros y extremidades con respecto a los de las cordilleras Central y Occidental.

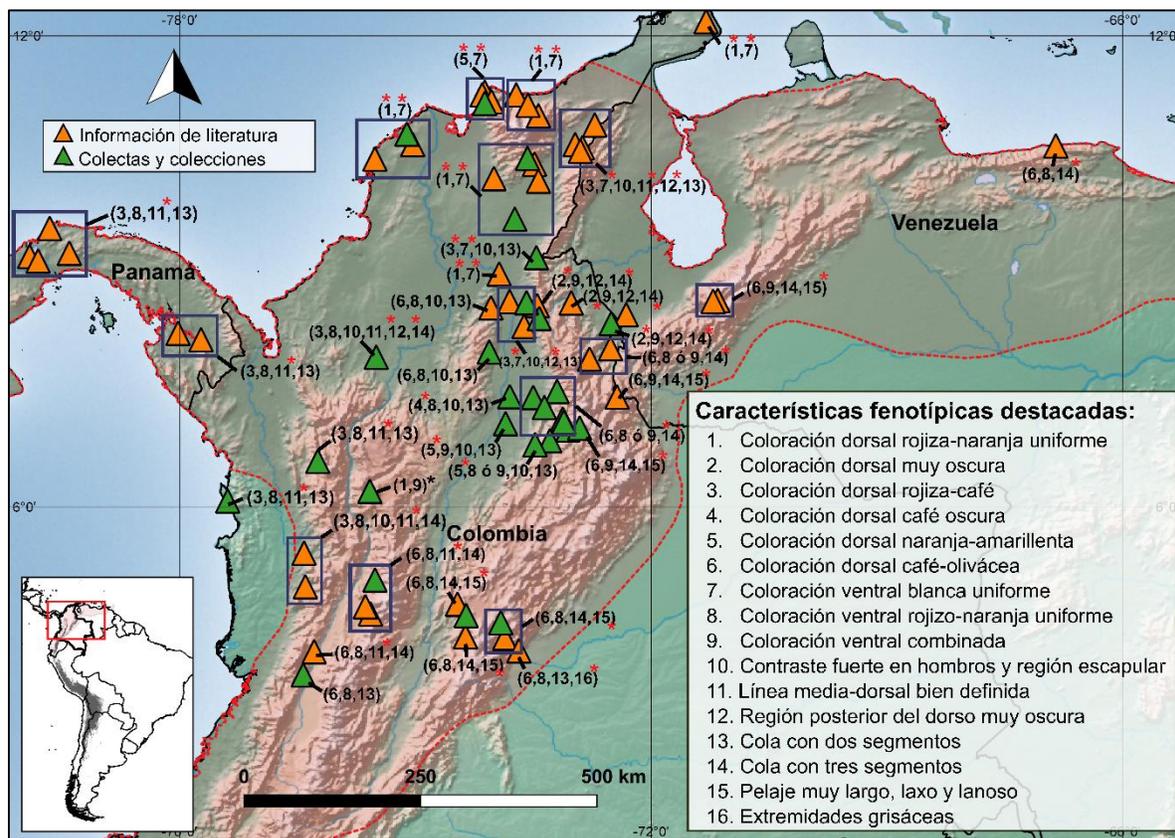


Figura 5. Tendencias fenotípicas de *Notosciurus granatensis* en Colombia. Cada número representa una característica; los \* resaltan las características más destacadas de cada población. Ver figura 2 como referencia visual de cada variable fenotípica.

### 4.3 Trabajo de laboratorio (Extracción, amplificación y secuenciación de ADN)

Se logró la caracterización molecular de 69 individuos de *N. granatensis* de Colombia, de los cuales 62 fueron recolectados en el marco del presente trabajo y cinco se encuentran depositados en diferentes colecciones biológicas del país. Se obtuvo información adicional del repositorio público GenBank correspondiente a dos individuos de origen centroamericano depositados en colecciones del exterior (**figura 6**). Con los análisis del conjunto de datos general se abarcó la variación genética de 30 poblaciones diferentes, en un área aproximada de 597.556 km<sup>2</sup> (Polígono Mínimo Convexo de las localidades) que representa casi el 60 % del rango geográfico conocido para la especie (**figura 6**).

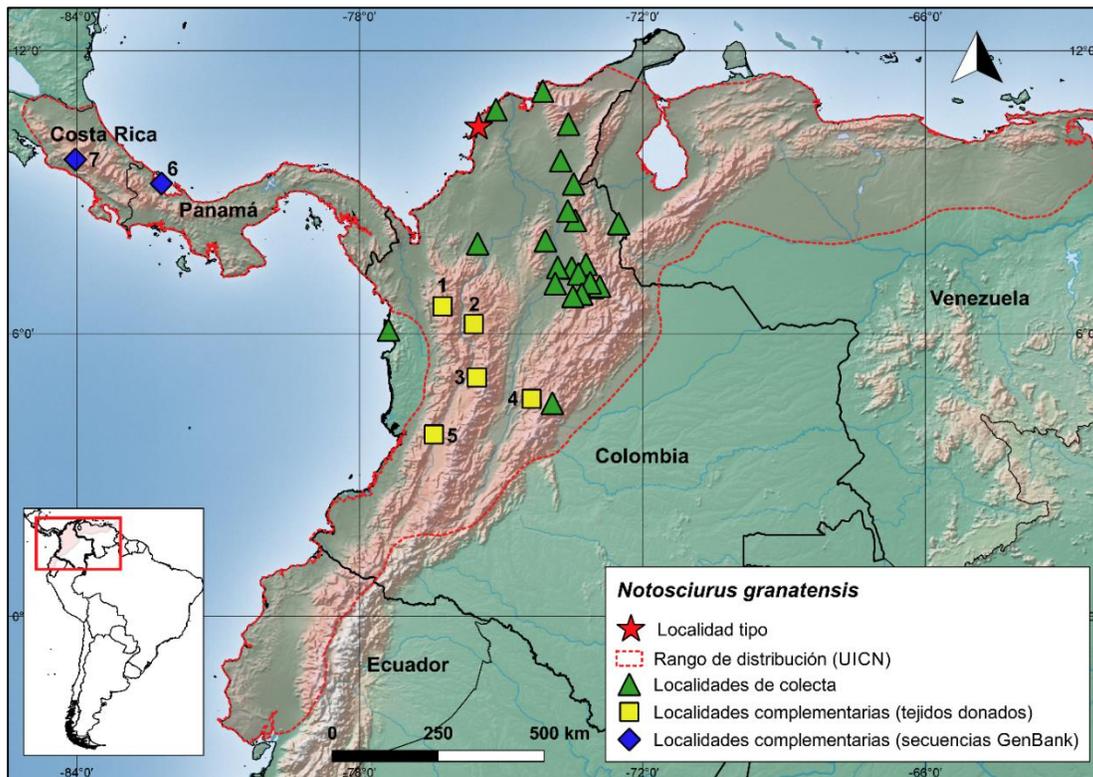


Figura 6. Localidades de origen de los individuos de *N. granatensis* caracterizados a nivel molecular.

A continuación, se describen las localidades complementarias:

1. Antioquia, Parque Nacional Natural Las Orquídeas (6.579, -76.242; 2001 m); Bosque andino montano del noroccidente. Subespecie (Nitikman, 1985): *Sciurus granatensis morulus*; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis granatensis*.
2. Antioquia, Medellín (6.200, -75.579; 1510 m); Bosque montano del Valle del Magdalena. Subespecie (Nitikman, 1985): indeterminada; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis granatensis*.
3. Caldas, Manizales (5.070, -75.514; 2109 m); Bosque montano del Valle del Cauca. Subespecie (Nitikman, 1985): *Sciurus granatensis quindianus*; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis granatensis*.
4. Cundinamarca, San Antonio del Tequendama (4.616, -74.353; 1439 m); Bosque montano del Valle del Magdalena. Subespecie (Nitikman, 1985): indeterminada; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis chrysuros*.
5. Valle del Cauca, Yotoco (3.860, -76.426; 1500 m); Bosque montano del Valle del Cauca. Subespecie (Nitikman, 1985): *Sciurus granatensis hoffmanni*; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis granatensis*.
6. Panamá, Bocas del Toro (9.184, -82.205; 36 m); Bosque húmedo Istmio-Atlántico. Subespecie (Nitikman, 1985): *Sciurus granatensis chiriquensis*; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis morulus*.
7. Costa Rica, San José (9.693, -84.033; 1855 m); Bosque montano de Talamanca. Subespecie (Nitikman, 1985): *Sciurus granatensis hoffmanni*; Subespecie (de Vivo y Carmignotto, 2015): *Notosciurus granatensis hoffmanni*.

La amplificación de todos los marcadores moleculares fue exitosa, lo que permitió generar un total de 198 secuencias de la especie: 69 del gen *Cytb*, 62 del *D-loop*, cuatro del *IRBP* y 63 del *MCIR*.

#### 4.4 Análisis de la información genética mitocondrial

**4.4.1 Diversidad genética mitocondrial.** Los marcadores mitocondriales constituyeron la mayor fuente de información molecular del presente trabajo, sumando en total 131 secuencias que representan el 66 % de todas las generadas.

En la ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, el gen Citocromo b (*Cytb*) consta de 1.140 pares de bases; para la mayoría de los individuos caracterizados se logró la amplificación del fragmento completo, no obstante, el conjunto de datos en general estuvo conformado por secuencias con una longitud entre 841 y 1.140 pb. El alineamiento evidenció 606 sitios invariables y 156 sitios polimórficos. Se detectó prácticamente un haplotipo por cada individuo, lo cual se refleja en un valor de diversidad haplotípica considerablemente elevado (**Hd** = 0,99) (**tabla 7**). Se contaron un total de 50 haplotipos ocurriendo entre una y tres veces a lo largo de toda la muestra, de los cuales 15 (30%) fueron compartidos entre dos o más individuos, y 35 (70 %) fueron únicos. Respecto a las poblaciones estudiadas, 17 de ellas (56.6 %) albergan haplotipos exclusivos, mientras que el resto comparte entre uno y dos; el número mínimo de haplotipos encontrados en una sola población fue de uno y el máximo de 7, esto dependiendo en parte del número de individuos en cada una de estas.

La red haplotípica de Median-joining reveló un patrón de agrupamiento o estructuración en el *Cytb* que no es consistente con las actuales hipótesis taxonómicas para la especie, lo cual en cierta

medida sugiere que estas no son una representación fiel de su historia evolutiva (**figura 7**). Por el contrario, los haplotipos de la muestra se distribuyen en cuatro grandes grupos que divergen entre sí hasta por 45 pasos mutacionales, y que muestran una tendencia geográfica: el grupo 1 lo conforman haplotipos de individuos provenientes de Centroamérica y el occidente de Colombia (Pacífico, cordillera Occidental y cordillera Central); el grupo 2 contiene principalmente haplotipos de individuos recolectados en el norte de Colombia (región Caribe); del grupo 3 hacen parte haplotipos de individuos del Valle del Magdalena y en el grupo 4 se encuentran los haplotipos de individuos de la cordillera Oriental.

Por otra parte, la Región Control (*D-loop*) de *N. granatensis* (de aproximadamente 1.050 pares de bases) también pudo amplificarse en casi la totalidad de los individuos, obteniéndose un conjunto de secuencias de entre 798 y 1.196 pb. (incluyendo en algunos casos parte de los genes flanqueantes). El alineamiento evidenció 523 sitios invariables y 141 sitios polimórficos. Según los parámetros medidos, la huella de variación genética de este marcador fue muy similar a la del Citocromo b (*Cytb*), no obstante, el número de individuos caracterizados fue ligeramente inferior (62 vs. 69). Se detectó prácticamente un haplotipo por cada uno de estos individuos, lo que representó una diversidad haplotípica bastante elevada (**Hd = 0,99**) (**tabla 7**). El conteo general fue de 50 haplotipos ocurriendo entre una y tres veces a lo largo de toda la muestra, de los cuales 10 (5 %) fueron compartidos por dos o más individuos y 40 (95 %) fueron únicos.

Con la red haplotípica del *D-loop* se logró recuperar el mismo patrón de estructuración que con el *Cytb*. (**datos no presentados**).

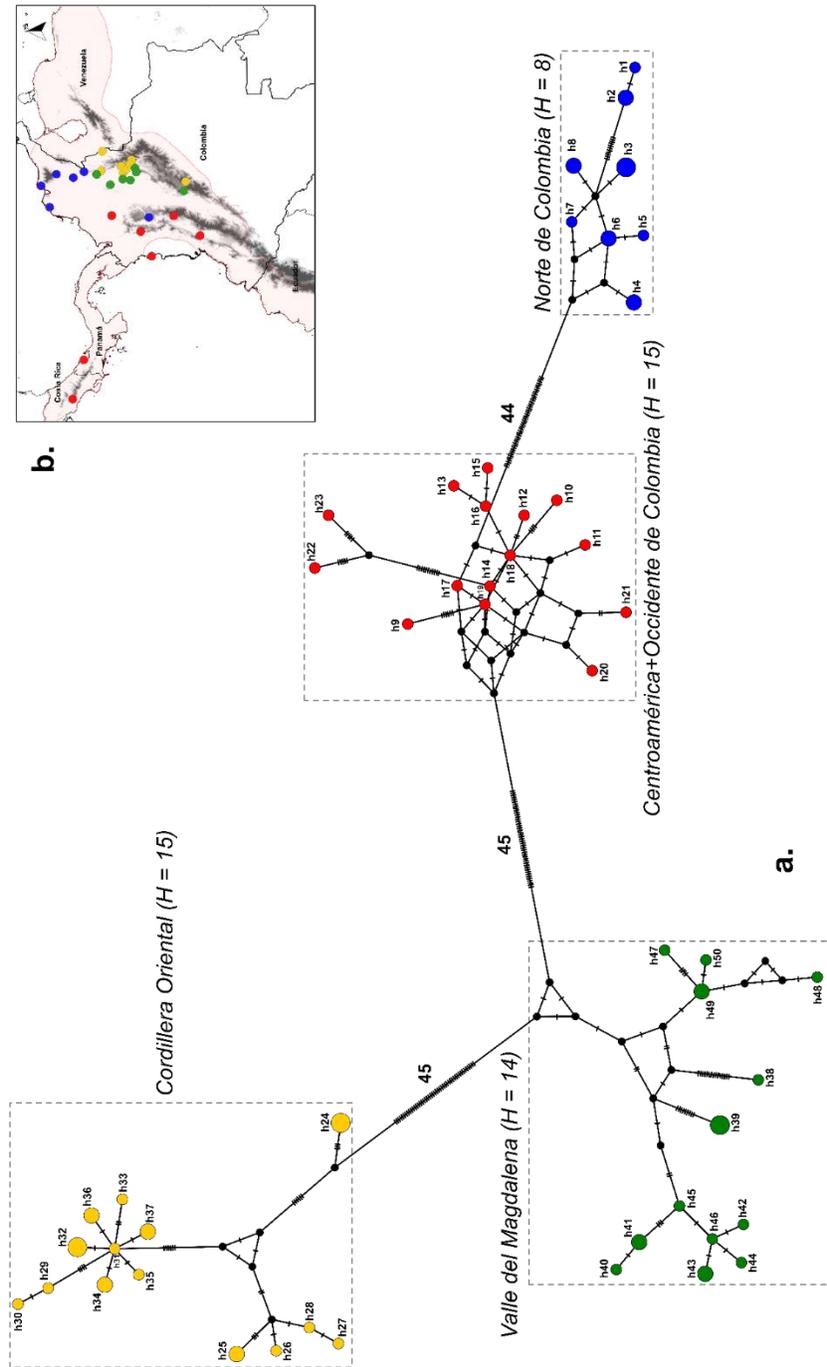


Figura 7. Red haplotípica de Median-joining mostrando las relaciones entre todos los haplotipos del marcador Cytb

Cada círculo coloreado en la red representa un haplotipo y su tamaño es proporcional a su frecuencia; **b.** Localidades de origen de los diferentes haplotipos coloreadas según los patrones de agrupamiento de la red; se muestra la distribución hipotética de *Notosciurus granatensis* (IUCN, 2019).

Tabla 7.

*Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir de los marcadores mitocondriales Cytb y D-loop.*

<b>Marcador</b>	<b>S</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>K</b>	<b>H</b>	<b>H<sub>d</sub></b>
Citocromo b (Cytb)	156	0,064	49,004	50	0,990
Región Control (D-loop)	141	0,066	43,083	50	0,993

*Nota: Número de sitios polimórficos (S); diversidad nucleotídica ( $\pi$ ); número promedio de diferencias nucleotídicas (k); número de haplotipos (H); diversidad haplotípica (H<sub>d</sub>).*

**4.4.2 Filogenia mitocondrial.** El conjunto de datos más completo para los análisis filogenéticos con marcadores mitocondriales fue el del *Cytb*, en el cual se incluyó información de varios miembros de la tribu Sciurini, además de la información generada a partir de todos los individuos de *N. granatensis* recolectados. La matriz final se conformó con 19 taxa y un total de 104 secuencias, las cuales equivalen a 445 sitios informativos. El modelo de evolución nucleotídica con mejor ajuste fue el GTR (Generalized time-reversible) con heterogeneidad en la tasa de sustitución y una proporción de sitios invariables (GTR +  $\Gamma$  + I).

El gráfico de sustituciones vs distancias genéticas GTR reveló una divergencia inicial casi continua de las transiciones y transversiones, no obstante, a un valor aproximado de 0,22 las primeras tienden a alcanzar una asíntota (**anexo 6**). Este mismo análisis, pero a nivel del tercer codón, da cuenta de una asíntota mucho más marcada para ambos tipos de mutaciones, lo cual sugiere que el Citocromo b sufre de saturación a este nivel y por ende podría tener una señal pobre para resolver relaciones filogenéticas profundas, más no recientes (como las intraespecíficas) (**anexo 6**).

Los análisis filogenéticos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud arrojaron topologías idénticas, tanto para las matrices independientes de los marcadores mitocondriales, como para la matriz concatenada. Todas las secuencias de la ardilla de cola roja se asocian en un

grupo monofilético soportado estadísticamente por valores altos de probabilidad posterior (**pp** = 0,99 *Cytb*; **pp** = 1 *Cyt+D-loop*) y valores moderados de Bootstrap (**BS** = 73,4 % *Cytb*) (**figura 8**). Esto sustenta en cierta medida la validez de la especie, de acuerdo con la propuesta taxonómica actual (de Vivo y Carmignotto, 2015) y la propuesta taxonómica más recurrente en la literatura (Nitikman, 1985). Sin embargo, se evidencia una marcada estructuración intraespecífica que es acorde a lo revelado por el análisis haplotípico, con cuatro clados bien definidos que exhiben cierta tendencia geográfica (**figura 8**): **Clado A (pp = 1; BS = 99 %)**: conformado por secuencias de individuos recolectados principalmente en zonas bajas del norte de Colombia, exceptuando la secuencia de un individuo originario de Medellín, en la cordillera Central, que se presume puede haber sido introducido como consecuencia del tráfico de fauna, y una secuencia proveniente de Ayacucho, Cesar, en el Valle medio del Magdalena; **Clado B. (pp = 1; BS = 99 %)**: conformado por secuencias de individuos originarios de Centroamérica (Costa Rica y Panamá), las tierras bajas del Chocó colombiano, la cordillera Occidental y la esquina noroccidental del país; **Clado C. (pp = 1; BS = 91 %)**: conformado por secuencias de individuos provenientes de la cordillera Oriental y las tierras bajas del Valle del Río Zulia; **Clado D. (pp = 1; BS = 98,9 %)**: conformado por individuos del Valle medio del Magdalena y el flanco occidental de la cordillera Oriental. A su vez, estos cuatro “grupos geográficos” están contenidos en dos grupos aún más grandes que dan cuenta de una dicotomía más antigua durante el proceso de diversificación de la ardilla de cola roja. En este sentido, los análisis indican relación de hermandad entre los clados A y B (**pp** = 0,98; **BS** = 87,9 %), y entre los clados C y D (**pp** = 0,98; **BS** = 70,8 %) (**figura 8**).

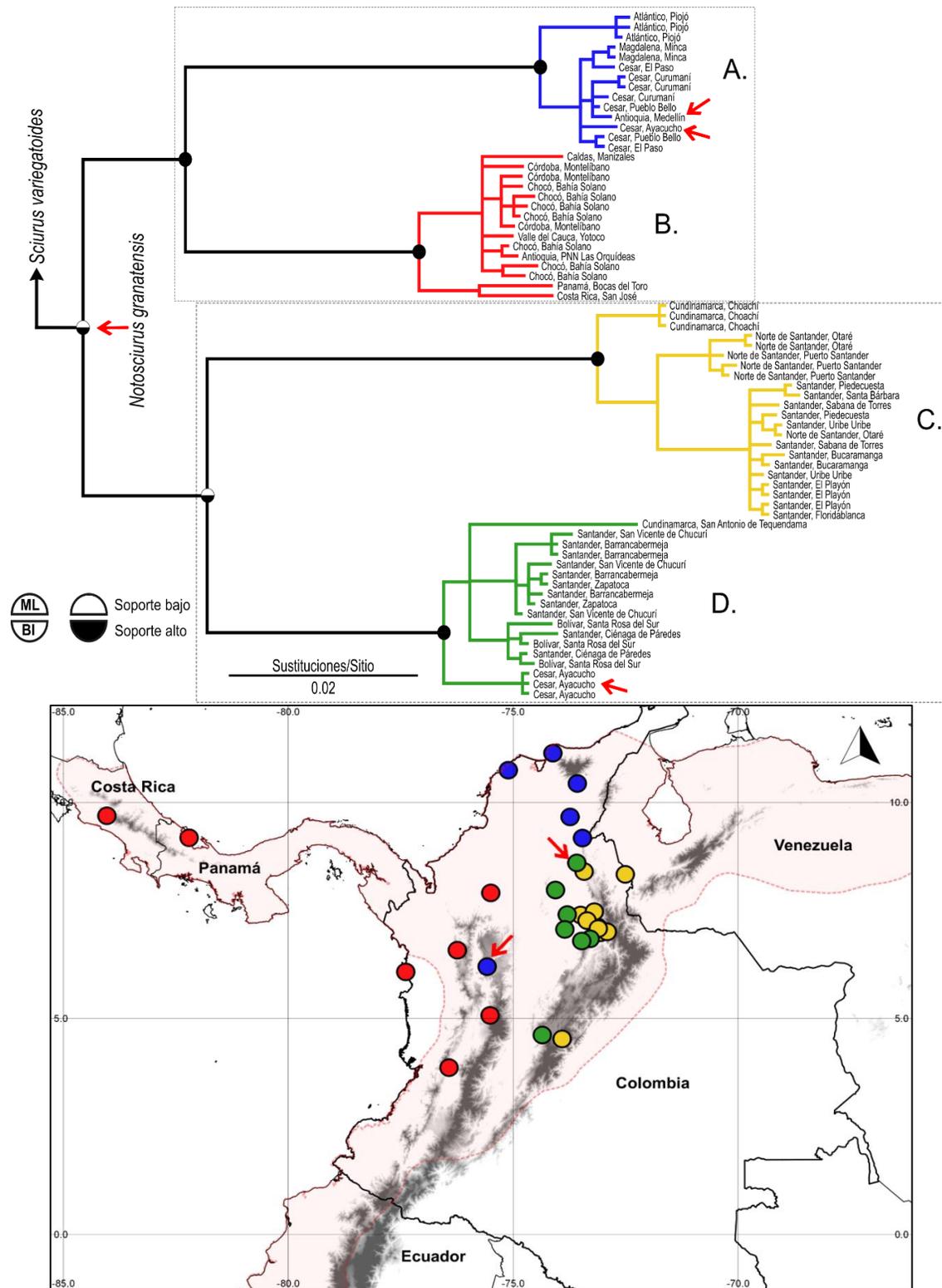


Figura 8. Árbol filogenético Bayesiano del marcador mitocondrial Cytb en *Notosciurus granatensis*. Abajo se destacan las localidades de origen de los individuos incluidos en el análisis. Las flechas son las excepciones (posible tráfico de fauna o hibridación)

Desde el punto de vista taxonómico, los cuatro grandes grupos geográficos recuperados en los anteriores análisis pueden contener más de una subespecie según las propuestas 1 (Nitikman, 1985) y 2 (de Vivo y Carmignotto, 2015) abordadas en el presente trabajo. De acuerdo con esto, la estructuración genética observada en *N. granatensis* no refleja fielmente dichas hipótesis, salvo algunas excepciones en las que poblaciones localizadas parecen haberse diferenciado ligeramente (p.ej. *Sciurus g. granatenis*, *Sciurus g. chrysueros*) (**figura 9**). Teniendo en cuenta que la taxonomía intraespecífica en la ardilla de cola roja se ha basado principalmente en la coloración del pelaje, estos resultados señalan que las diferentes variantes fenotípicas no constituyen unidades evolutivas independientes, es decir, que la amplia variación fenotípica a lo largo del rango distribucional de la especie no necesariamente está influenciada por la variación genética neutral.

**4.4.3. Identificación de especies putativas dentro de *Notosciurus granatensis*.** Los estadísticos de delimitación de especies calculados para cada uno de los “grupos geográficos” recuperados en los análisis precedentes, sugieren la existencia de diversidad críptica en lo que actualmente se conoce como *Notosciurus granatensis*. Teniendo en cuenta la topología bayesiana del marcador *Cytb*, la “distancia de árbol” promedio (*Intra Dist*) dentro de todos estos grupos fue de 0.012, con un rango desde 0.008 (en el clado A – norte) a 0.014 (en el clado C – cordillera Oriental) (**figura 8**) (**tabla 8**). Estos valores considerablemente bajos pueden implicar en cierta medida que cada grupo comprenda una especie separada. Por otra parte, la “distancia de árbol” promedio entre los grupos (*Inter Dist*) fue de 0.099, siendo 0.093 la más baja (entre el clado A y el clado B) y 0.108 la más alta (entre el clado C y el clado D), lo cual también soporta la idea de que los 4 grupos geográficos no sean conespecíficos. Los valores elevados de los parámetros *P ID*

(Strict) y *P ID* (Liberal), así como los valores bajos en el parámetro *Av* (MRCA), suman evidencia a las consideraciones anteriores (Gutiérrez *et al.*, 2017) (tabla 8).

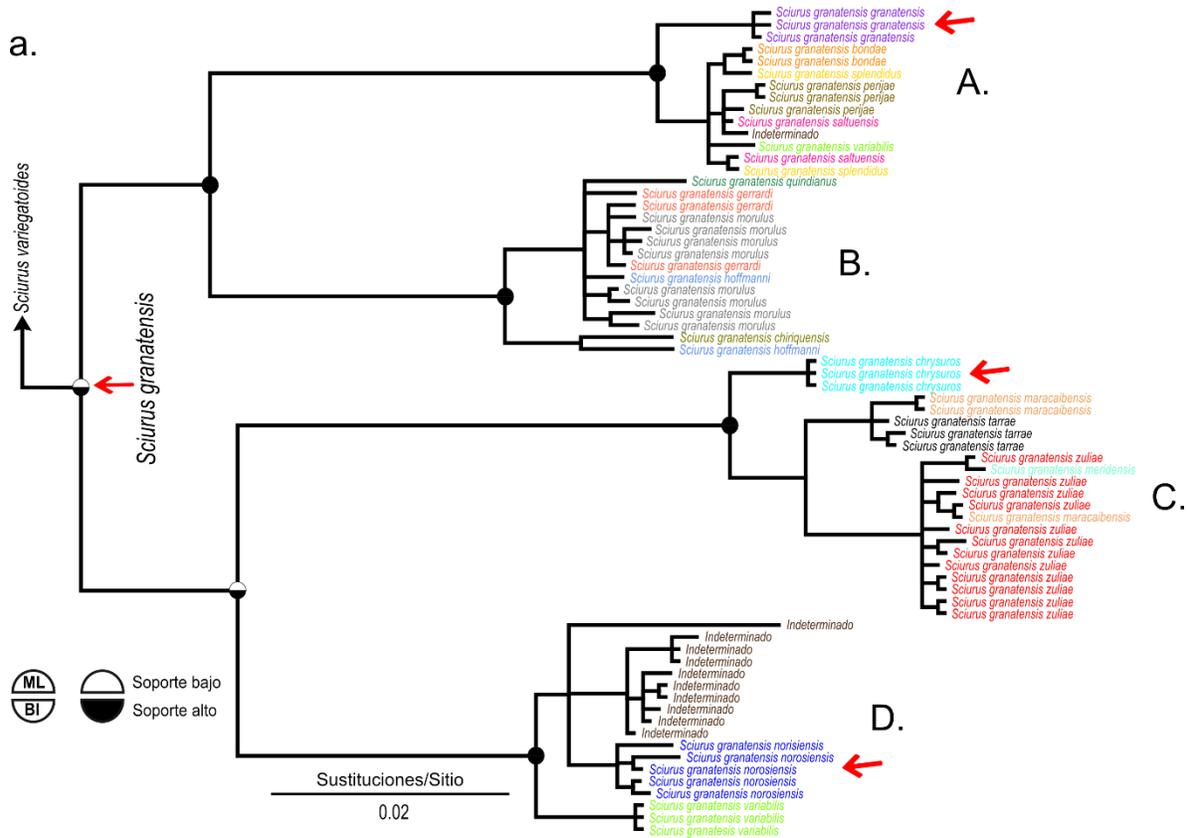


Figura 9. Topología Bayesiana del marcador mitocondrial Cytb en *Notosciurus granatensis*. Todas las terminales (individuos) han sido etiquetadas y coloreadas de acuerdo con su identidad taxonómica: siguiendo la propuesta 1 (Nitikman, 1985)

Tabla 8.

Resumen de los estadísticos de delimitación de especies implementados en el programa Geneious R11 (Biomatters Limited), los cuales fueron calculados usando como base la topología Bayesiana del marcador Cytb.

Clado	Clado más cercano	Soporte	Intra Dist	Inter Dist	Intra /Inter	<i>P ID</i> (Strict)	<i>P ID</i> (Liberal)	<i>Av</i> (MRCA)
A	B	1	0.008	0.093	0.08	0.95 (0.89, 1.0)	0.99 (0.95, 1.0)	0.0072
B	A	1	0.012	0.093	0.13	0.94	0.98	0.0110

Clado	Clado más cercano	Soporte	Intra Dist	Inter Dist	Intra /Inter	P ID (Strict)	P ID (Liberal)	Av (MRCA)
						(0.87, 1.0)	(0.94, 1.0)	
C	D	1	0.014	0.108	0.13	0.95 (0.90, 1.0)	0.98 (0.95, 1.0)	0.0167
D	C	1	0.013	0.105	0.13	0.95 (0.90, 1.0)	0.98 (0.95, 1.0)	0.0097

**Nota:** **Soporte:** probabilidades posteriores; **Intra Dist:** distancia de árbol entre los miembros del clado focal; **Inter Dist:** distancia de árbol promedio entre el clado focal y el clado más cercano; **Intra/Inter:** la proporción entre Intra Dist e Inter Dist; **P ID (Strict):** La probabilidad media (intervalo del 95% de confianza) de identificar correctamente un miembro desconocido de la especie putativa (clado), usando el criterio de que debe caer dentro, y no hermano de, el clado de dicha especie; **P ID (Liberal):** La probabilidad media (intervalo del 95% de confianza) de identificar correctamente un miembro desconocido de la especie putativa (clado), usando el criterio de que debe caer dentro, o hermano de, el clado de dicha especie; **Av MRCA:** La distancia promedio entre el ancestro común más reciente de una especie putativa (clado) y sus miembros.

Considerando la matriz de secuencias del marcador *Cytb* de todos los miembros de la tribu Sciurini, exceptuando *N. granatensis*, se pudo establecer que la divergencia genética (medida como distancias genéticas corregidas o no corregidas x 100) entre especies hermanas puede ir desde el 2.1 % (*Tamiasciurus douglassi* vs *T. hudsonicus*), hasta el 7.5 % (*Sciurus flammifer* vs *S. igniventris*), mientras que la divergencia intraespecífica oscila entre 0.0 % (dentro de *Sciurus aberti* o *Tamiasciurus mearnsi*) y 2.4 % (dentro de *Tamiasciurus hudsonicus*). En ambos casos los valores se ajustan al rango de variación reportado por Bradley y Baker (2001) para otros roedores. Al incluir *N. granatensis* en los análisis, se encontró que la divergencia promedio respecto de sus especies hermanas putativas (Pecnerová *et al.*, 2015) va desde el 12.4 % con *Microsciurus alfari*, hasta el 13 % con *Sciurus variegatoides*, valores que también se encuentran dentro del rango reportado para otros roedores (Bradley y Baker, 2001) (**tabla 9**). Por otra parte, al analizar únicamente las 69 secuencias de *N. granatensis*, se hallaron valores de divergencia entre pares de individuos que van desde el 0.0 % hasta el 10 %. Respecto a la divergencia promedio dentro de

los grupos o “especies putativas”, el valor más pequeño encontrado corresponde al Clado A (0.8 %), mientras que el valor más alto corresponde a los clados C y D (ambos con 1.3 %). Por otro lado, la divergencia promedio entre los grupos fue desde el 7.3 % entre los clados A y B (Norte y Occidente), hasta el 10.1 % entre los clados C y D (Andes y Valle del Magdalena). Estos últimos valores están por encima de la variación típica intraespecífica reportada por Bradley y Baker (2001) para el orden Rodentia (0.00 a 6.29 %), e incluso superan los valores de divergencia entre algunas especies hermanas de ardillas encontrados al analizar la matriz completa de la tribu Sciurini. Todo lo anterior constituye evidencia adicional a la consideración hipotética de que los 4 grupos geográficos dentro de *N. granatensis* constituyen especies independientes, las cuales además están bien diferenciadas genéticamente de otras especies de la tribu Sciurini.

Tabla 9.

Divergencia intra e inter-grupal (calculada como la distancia genética corregida según el modelo Kimura-2-parámetros X 100) para el marcador mitocondrial Citocromo B (Cytb).

Divergencia Intra-grupo		Divergencia Inter-grupo							
Grupo	Divergencia (%)	Grupo	<i>S. variegatoides</i>	<i>M. alfari</i>	<i>N. granatensis</i>	Clado A	Clado B	Clado C	Clado D
<i>T. mearnsi</i>	0%	<i>S. variegatoides</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. niger</i>	2%	<i>M. alfari</i>	13.8%	-	-	-	-	-	-
<i>S. aestuans</i>	2.4%	<i>N. granatensis</i>	13%	12.4%	-	-	-	-	-
<i>N. granatensis</i>	<b>6.8%</b>	Clado A	13.3%	13.1%	-	-	-	-	-
Clado A	0.8%	Clado B	13.2%	12.4%	-	<b>7.3%</b>	-	-	-
Clado B	1.1%	Clado C	13.4%	12.2%	-	<b>10.1%</b>	<b>10%</b>	-	-
Clado C	1.3%	Clado D	12.3%	12%	-	<b>8.4%</b>	<b>7.7%</b>	<b>8.1%</b>	-
Clado D	1.3%								

**Nota:** El análisis se ejecutó considerando todas las secuencias de *N. granatensis* dentro de un mismo grupo (de acuerdo con las propuestas taxonómicas vigentes), o dentro de cuatro grupos independientes (especies putativas en el presente trabajo).

De las cuatro “especies putativas”, la que corresponde al clado B (occidente de Colombia y Centroamérica), exhibe una mayor diversidad genética mitocondrial ( $Hd = 1$ ;  $\pi = 0.012$ ), mientras que la que corresponde al clado A (norte de Colombia) exhibe la menor ( $Hd = 0.923$ ;  $\pi = 0.0079$ ) (tabla 10).

Tabla 10.

*Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir del marcador mitocondrial Cytb para cada uno de los haplogrupos/clados/especies putativas dentro de N. granatensis.*

Clado “especie putativa”	n	S	$\pi$	k	H	$H_d$
Clado A “Norte”	14	20	0.0079	6.429	8	0,923
Clado B “Occidente”	15	53	0.0120	10.533	15	1
Clado C “Andes”	22	51	0.0127	13.554	15	0.965
Clado D “Magdalena”	18	52	0.0140	12.204	14	0.967

*Nota:* Número de individuos caracterizados en el clado ( $n$ ); Número de sitios polimórficos ( $S$ ); diversidad nucleotídica ( $\pi$ ); número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ); número de haplotipos ( $H$ ); diversidad haplotípica ( $H_d$ ).

**4.4.4 Estructuración jerárquica de la variación genética mitocondrial.** Los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) efectuados ofrecen detalles sobre la distribución de la variación genética mitocondrial de *N. granatensis* en diferentes niveles jerárquicos, a la vez que ratifican una marcada estructuración en concordancia con los análisis anteriores (tabla 11):

- 1. Sin definición de grupos a priori:** el primer AMOVA revela de manera general la existencia de diferencias genéticas significativas entre las poblaciones caracterizadas ( $\Phi_{ST} = 0.697$ ;  $P < 0.0001$ ).

2. **4 grupos = 4 subespecies, según propuesta taxonómica 2:** este segundo análisis muestra que tan solo el 27.13 % de la variación total se debe a diferencias entre los tres grupos ( $\Phi_{CT} = 0.271$ ;  $P < 0.0001$ ), mientras que un mayor porcentaje (45.60 %) es explicado por las diferencias entre las poblaciones que los conforman ( $\Phi_{SC} = 0.626$ ;  $P < 0.0001$ ). Este resultado concuerda con los hallazgos de los análisis precedentes, en los cuales ninguna de las subespecies según de Vivo y Carmignotto (2015) se recupera como grupo genéticamente discreto (**figuras 7 y 8**).
3. **20 grupos = 20 subespecies, según propuesta taxonómica 1:** contrario al anterior, el tercer análisis indica que la mayor proporción (60.47 %) de la variación total parece ser consecuencia de las diferencias entre los 20 grupos ( $\Phi_{CT} = 0.605$ ;  $P < 0.0001$ ), mientras que un menor porcentaje (10.05 %) deriva de las diferencias entre las poblaciones que los conforman ( $\Phi_{SC} = 0.254$ ;  $P = 0.034$ ). Este resultado implicaría que este patrón de estructuración fuese el que mejor se ajusta a la realidad evolutiva de la especie, sin embargo, la idea carece de sustento adicional ya que en los análisis previos las subespecies según Nitikman (1985) no se recuperan como grupos genéticamente discretos, salvo algunas excepciones (**figuras 7 y 8**). Se presume entonces que este panorama de estructuración sea un reflejo del obtenido en el primer análisis, ya que prácticamente cada población caracterizada representa una subespecie diferente según la propuesta de este autor.
4. **4 grupos = 4 haplogrupos/clados, según análisis precedentes:** este último AMOVA señala que la mayor parte de la variación genética total (58.41 %) es explicada por las diferencias entre los cuatro grupos definidos a priori ( $\Phi_{CT} = 0.584$ ;  $P < 0.0001$ ) y no por las diferencias a otros niveles jerárquicos. Teniendo en cuenta la evidencia adicional de

los análisis haplotípicos y filogenéticos, se podría afirmar que este patrón refleja fielmente la manera como se estructura la variación genética dentro de *N. granatensis*, sustentando, además, la existencia de cuatro posibles especies en lugar de una. No obstante, el hecho de que exista aún un 41.59 % de la variación total que es explicada por diferencias en otros niveles jerárquicos, quiere decir que dentro de estas cuatro “especies putativas” hay estructuración genética adicional, posiblemente no tan marcada como la que muestran los análisis previos.

Tabla 11.  
*Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de acuerdo con 4 hipótesis de estructuración dentro de N. granatensis:*

	<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b>Estadísticos</b>	<b>P</b>
1	Entre poblaciones	29	2975.953	69.72%	$\Phi_{ST} = 0.697$	0
	Dentro de poblaciones	39	641.250	30.28%		
2	Entre grupos	3	993.582	27.13%	$\Phi_{CT} = 0.271$	0
	Entre poblaciones dentro de grupos	26	1982.371	45.60%	$\Phi_{SC} = 0.626$	0
	Dentro de poblaciones	39	641.250	27.27%	$\Phi_{ST} = 0.727$	0
3	Entre grupos	19	2695.192	60.47%	$\Phi_{CT} = 0.605$	0.034
	Entre poblaciones dentro de grupos	10	280.761	10.05%	$\Phi_{SC} = 0.254$	0
	Dentro de poblaciones	39	641.250	29.48%	$\Phi_{ST} = 0.705$	0
4	Entre grupos	3	2003.332	<b>58.41%</b>	<b><math>\Phi_{CT} = 0.584</math></b>	0
	Entre poblaciones dentro de grupos	26	972.621	15.32%	$\Phi_{SC} = 0.368$	0
	Dentro de poblaciones	39	641.250	26.26%	$\Phi_{ST} = 0.737$	0

**Nota:** 1. Sin grupos definidos a priori; 2. 4 grupos definidos con base en la propuesta de subespecies de De Vivo y Carmignotto (2015); 3. 20 grupos definidos a priori con base en las propuestas de subespecies de Nitikman (1985) y Thorington et al. (2012); 4. 4 grupos definidos a priori de acuerdo con igual número de haplogrupos/clados recuperados en análisis previos. En rojo se resaltan los valores que respaldan la posible existencia de 4 especies en lugar de 1. g.l. grados de libertad.

**4.4.5 Posibles causas de la variación genética mitocondrial.** Las pruebas parciales de Mantel efectuadas revelan que la matriz de distancias genéticas (*Cytb*) entre las poblaciones de *N. granatensis* caracterizadas tiene una asociación estadística significativa con la matriz de distancias geográficas ( $r = 0.284$ ;  $p < 0.0001$ ), más no con la de distancias ambientales. Esto implica la existencia de un patrón de estructuración espacial a lo largo del rango de distribución de la especie, en el cual el aislamiento entre poblaciones influye en la distribución de la variación genética mitocondrial observada (a mayor distancia geográfica, mayor la distancia genética entre poblaciones). Contrario a esto, las diferencias en las condiciones ambientales que rigen dichas poblaciones (por lo menos en cuanto a las variables medidas) parecen no jugar un papel determinante.

#### **4.5 Análisis filogenéticos combinados (Mitocondrial y Nuclear)**

La matriz de datos concatenados se conformó con un total de 25 secuencias del marcador mitocondrial *Cytb* y 25 del marcador nuclear *IRBP*, las cuales en conjunto suman un total de 2431 pares de bases y corresponden a 26 taxa de la tribu Sciurini y 2 de la tribu hermana, Pteromyini. Los modelos de evolución nucleotídica con mejor ajuste para las matrices independientes fueron GTR +  $\Gamma$  + I (*Cytb*) y GTR +  $\Gamma$  (*IRBP*).

Los análisis filogenéticos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud arrojaron topologías muy similares, existiendo solo ligeras diferencias a nivel del soporte estadístico de algunos nodos (**figura 10**). Los patrones de relaciones fueron en general consistentes con los recuperados por Pecnerová *et al.* (2015), quienes usaron una mayor cantidad de marcadores moleculares. En este sentido, Sciurini se muestra como un clado bien soportado (**pp** = 1; **BS** = 100

%), dentro del cual *Tamiasciurus* constituye la divergencia más temprana y el único género que al ser monofilético (**pp** = 1; **BS** = 100 %) se ajusta al esquema taxonómico usualmente adoptado para la tribu (Thorington y Hoffmann, 2005). El caso contrario ocurre con los demás géneros, ya que *Sciurus* se recupera como parafiletico, *Microsciurus* como polifilético y *Rheithrosciurus* sin un estatus claro, esto también en concordancia con los hallazgos de otros autores (Mercer y Roth, 2003; Herron *et al.*, 2004; Steppan *et al.*, 2004; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014); no se incluyeron secuencias del género *Syntheosciurus* en el análisis, por lo que su estatus no pudo ser evaluado (**figura 11**).

La propuesta planteada recientemente por De Vivo y Carmignotto (2015) para reestructurar la taxonomía de las ardillas sudamericanas tampoco se ve reflejada en los resultados de los análisis efectuados. Aunque el número de especies es limitado, las topologías Bayesiana y de Máxima verosimilitud muestran que bajo la visión de estos autores los géneros *Hadrosociurus* y *Sciurus* son paráfileticos, mientras que *Notosciurus* y *Microsciurus* vendrían siendo polifiléticos; el estatus de *Simosciurus* y de *Guerlinguetus* permanece incierto (**figura 11**).

Las topologías obtenidas también revelan que después de la divergencia inicial del género *Tamiasciurus*, la diversificación de los demás miembros de la tribu Sciurini parece haber sido gradual y bajo un patrón biogeográfico, empezando por las especies Paleárticas (Eurasia), luego las especies Neárticas (Norteamérica) y finalmente las especies neotropicales (**figura 10**). Estas últimas fueron recuperadas en su totalidad dentro de un gran grupo monofilético (**pp** = 0.98; **BS** = 36 %), el cual a su vez se subdivide en dos clados más pequeños, uno de ellos albergando especies netamente sudamericanas (**pp** = 0.99; **BS** = 45 %) y el otro, especies principalmente Centroamericanas (**pp** = 0.99; **BS** = 64 %). En el primero de ellos, aunque la mayoría de las relaciones carecen de soporte estadístico significativo, la inclusión de nuevos taxa, en comparación

con trabajos previos, permitió dilucidar la existencia de una divergencia entre las ardillas con distribución Cis-Andina y aquellas con distribución Trans-Andina (**pp** = 0.99; **BS** = 45.4 %).

La ardilla de cola roja, como actualmente se encuentra definida (Thorington *et al.*, 2012; De Vivo y Carmignotto, 2015), hace parte del “subclado” Centroamericano, siendo la única especie que extiende su distribución hasta Sudamérica (**figura 10**). Los análisis filogenéticos combinados sustentan, además, que representa un grupo monofilético con soporte estadístico significativo (**pp** = 0.99; **BS** = 89 %), no obstante, contrario a lo demostrado por los análisis mitocondriales, como su especie hermana aparece *Microsciurus alfari* y no *Sciurus variegatoides*. Aunque la estructuración dentro de *N. granatensis* está claramente definida en las topologías, la relación entre clados geográficos o “especies putativas” que se infiere al analizar en conjunto el *Cytb* y el *IRBP* no es clara. De acuerdo con esto, el clado A (norte de Colombia) es hermano del clado B (Centroamérica y occidente de Colombia), y estos a su vez son grupos hermanos de los clados C (cordillera Oriental de Colombia) y D (Valle del Magdalena); estos últimos se recuperan como grupos hermanos en los análisis filogenéticos mitocondriales, mientras que en los análisis combinados no (**figuras 10 y 11**).

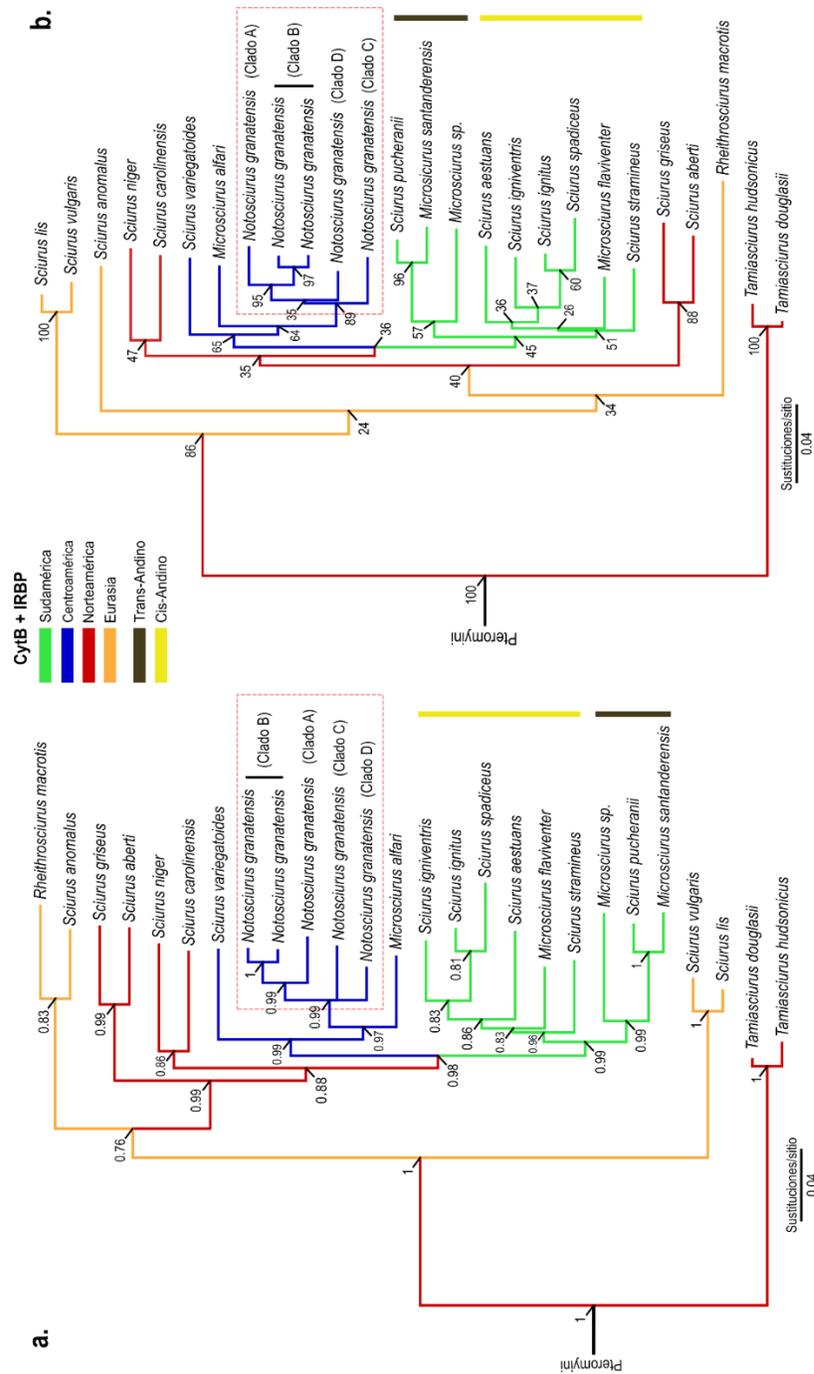


Figura 10. Topologías recuperadas en los análisis filogenéticos combinados: a. Inferencia Bayesiana; b. Máxima Verosimilitud. Los valores de soporte para cada nodo están dados en probabilidades posteriores (a) y Bootstrap (b).

La taxonomía de los terminales se basa en la propuesta de Thorington y Hoffmann (2005), a excepción de la ardilla de cola roja, la cual se trata de acuerdo con el trabajo de de Vivo y Carmignotto (2015). Las ramas se han coloreado de acuerdo con el origen geográfico de los linajes, siguiendo el trabajo de Pecnerová et al. (2015)

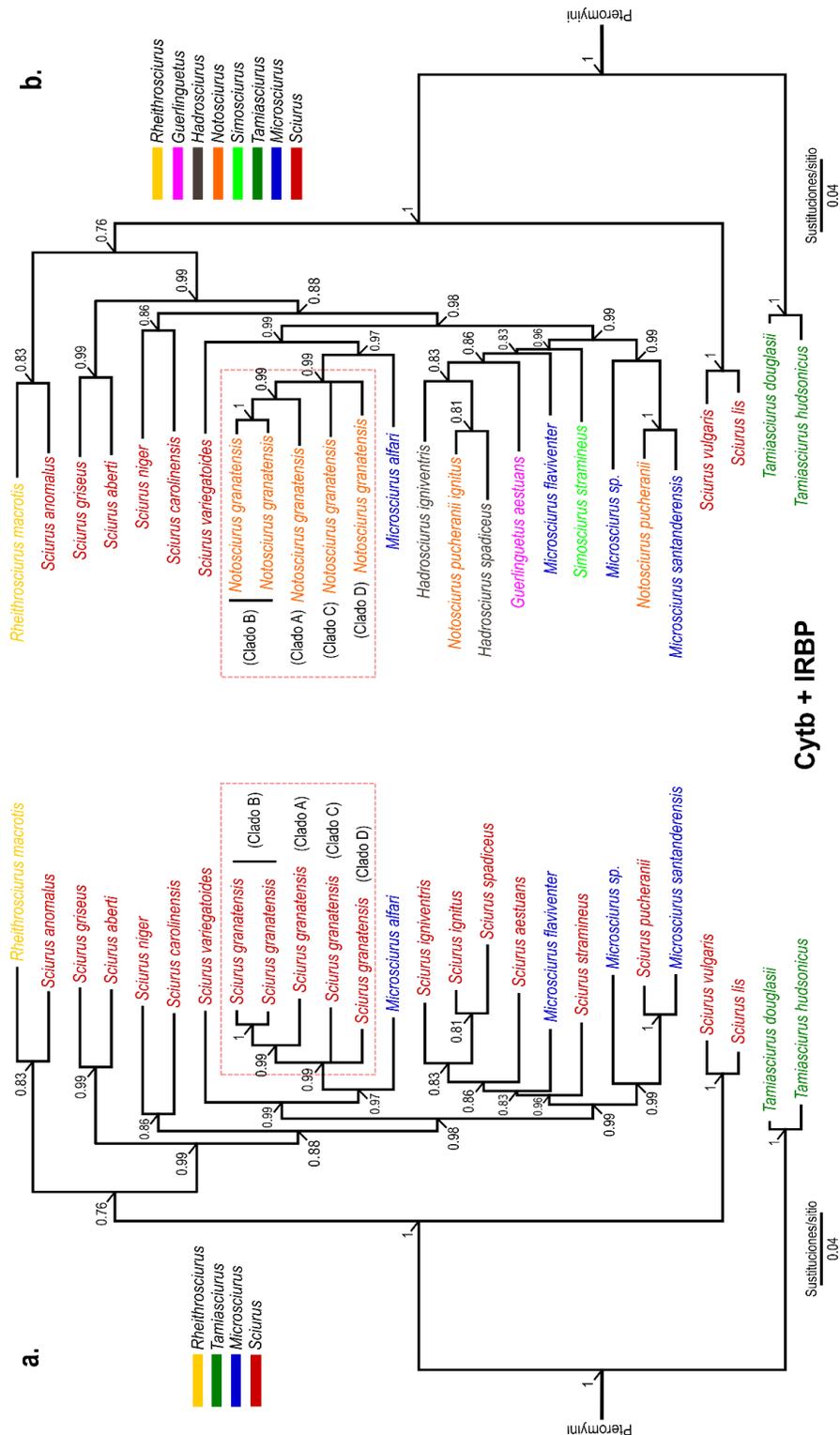


Figura 11. Topología bayesiana combinada mostrando la propuesta taxonómica comúnmente adoptada para la tribu Sciurini (Thorington y Hoffmann, 2015) (a), y la propuesta taxonómica más reciente, (de Vivo y Carmignotto, 2015).

#### 4.6 Análisis del contexto temporal de la diversificación de *Notosciurus granatensis*

La filogenia “inter-específica” escalada en tiempo, obtenida a partir del análisis conjunto del *Cytb* e *IRBP*, muestra un patrón de relaciones entre taxa muy similar al de las topologías anteriores. La tribu Sciurini se recupera como un grupo monofilético con alto soporte estadístico ( $pp = 1$ ) y la divergencia respecto de su tribu hermana, Pteromyini, se estima hace unos 27.74 millones de años (95 % HPD = 26.2 – 30.8 M.a.). También se puede evidenciar la diversificación gradual de los linajes dentro de Sciurini, la cual se dio en la medida en que colonizaban grandes regiones biogeográficas. Según esto, la llegada a los ecosistemas neotropicales fue la más reciente, y la separación de las ardillas de esta región respecto de las ardillas neárticas sucedió en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 5.60 M.a. (95 % HPD 4.33 – 7.17), (**figura 12**). Posteriormente, un proceso de divergencia que inició hace unos 5.07 M.a. (95 % HPD = 3.95 – 6.52) dividió el clado neotropical en dos subclados recíprocamente monofiléticos, el de las ardillas centroamericanas y el de las sudamericanas. En este último, la separación de las poblaciones Trans-andinas y Cis-andinas se estima sucedió en el Plioceno, hace unos 4.5 M.a. (95% HDP = 3.48 – 5.84).

La divergencia entre *Notosciurus granatensis* y su especie hermana putativa, *Microsciurus alfari*, se data hace unos 3.23 M.a. (95 % HDP = 2.33 – 4.38) (**figura 12**). La estructuración intraespecífica también es marcada, definiéndose los mismos cuatro linajes geográficos o “especies putativas” descritos anteriormente, además de una edad de 2.1 M.a. (95 % HDP = 1.50 – 2.99) para su ancestro común. Sin embargo, a diferencia de los demás análisis combinados, aquí las relaciones entre estos linajes son más claras y están mejor soportadas, en concordancia con las topologías mitocondriales. En este sentido, el clado A es hermano del clado B ( $pp = 0.99$ ), y ambos se han ido diferenciando desde hace unos 1.5 M.a (95 % HDP = 0.91 – 2.10), mientras que los

clados C y D, que también son hermanos ( $pp = 0.71$ ), se han diferenciado desde hace aproximadamente 1.7 M.a. (95 % HDP = 1.05 – 3.56).

En la filogenia “intra-específica”, obtenida a partir del análisis del *Cytb*, las edades estimadas para las divergencias entre clados de *N. granatensis* fueron ligeramente más recientes en comparación con los de la filogenia “inter-específica” (**figura 12**). Aunque este comportamiento era de esperarse, debido a que el ADN mitocondrial tiende a coalescer más rápido que el nuclear (Edwards y Beerli, 2000), las diferencias entre ambos acercamientos metodológicos son mínimas ya que hay un amplio solapamiento de los intervalos de confianza para cada nodo. Conjuntamente, las filogenias inter-específica e intra-específica señalan que la diversificación de la ardilla de cola roja inició en el Plioceno con su separación de *M. alfari*, y continuó a través del Pleistoceno, época en la cual se dio la divergencia entre los cuatro linajes o “especies putativas”.

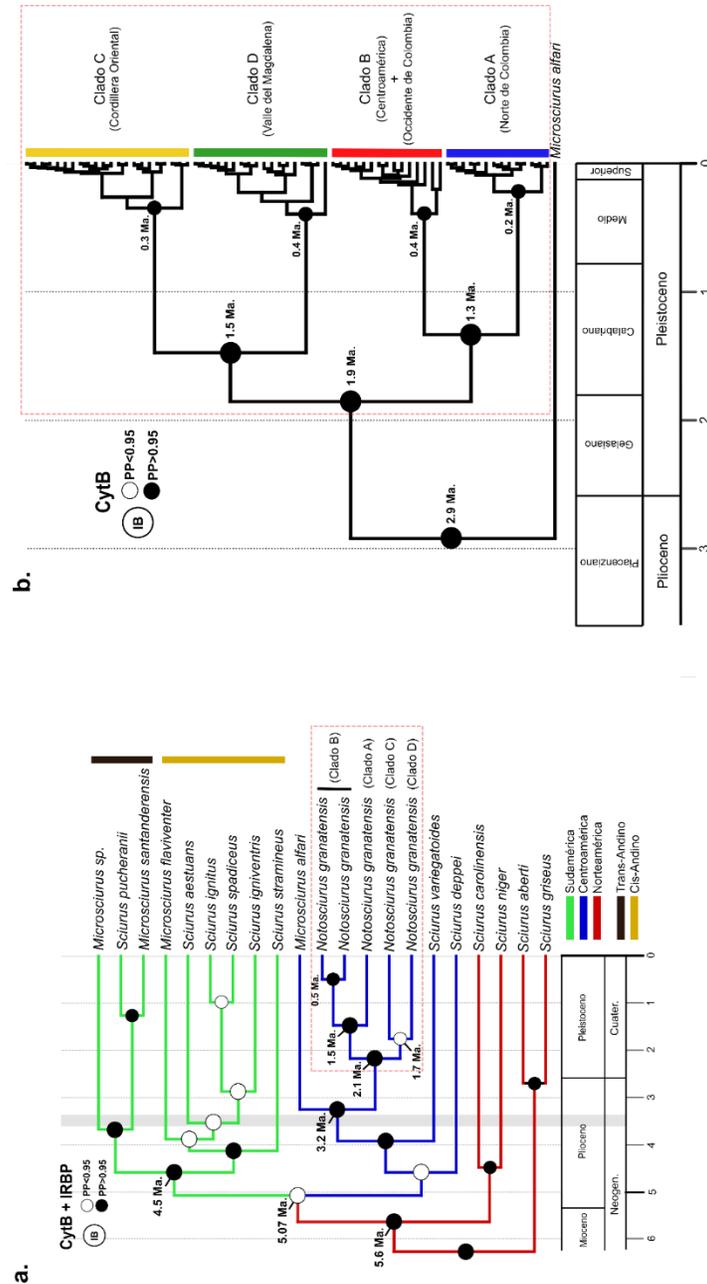


Figura 12. Filogenias escaladas en tiempo.

**a.** “Filogenia Inter-específica obtenida a partir del análisis combinado de los marcadores *Cytb* e *IRBP*. Se han incluido solo algunas edades de divergencia importantes en la historia de diversificación de Sciurini en el neotrópico, incluidas las edades de divergencia entre los clados de *Notosciurus granatensis*. La línea sombreada representa la fecha más aceptada para el cierre del istmo de Panamá; **b.** “Filogenia intra-específica” obtenida a partir del análisis del marcador *Cytb*. Las edades de divergencia entre clados de *Notosciurus granatensis* son ligeramente más recientes que en la filogenia inter-específica

#### 4.7 Modelamiento biogeográfico

El modelo biogeográfico recuperado evidencia que a lo largo de la historia de diversificación de la tribu Sciurini en el nuevo mundo ocurrieron por lo menos cuatro eventos de dispersión y dos de vicarianza.

Una primera llegada a los biomas sudamericanos se dio gracias a la expansión del rango geográfico de un ancestro de origen norteamericano (75 % de probabilidad) en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 5.6 millones de años, (**figura 13**). Posteriormente, esta distribución continua fue alterada por un evento vicariante sucedido hace unos 5.07 M.a., el cual aisló nuevamente por un largo periodo de tiempo las ardillas de Sudamérica respecto de las de Norteamérica. No obstante, a finales del Plioceno, hace más o menos 3.2 M.a., el ancestro de *Notosciurus granatensis* empezó desde el norte una nueva expansión hacia al sur, que posiblemente derivó en el establecimiento del rango geográfico actual de la especie. La diversificación intraespecífica tuvo lugar en el Pleistoceno, inicialmente con la separación entre el clado B y el clado C hace 1.7 M.a., seguida de la divergencia entre el clado A y el clado B desde hace 1.5 M.a. Dentro de este último, un evento vicariante iniciado hace aproximadamente 0.5 M.a., ha promovido el asilamiento entre las poblaciones de Centroamérica y el occidente de Colombia (**figura 13**).

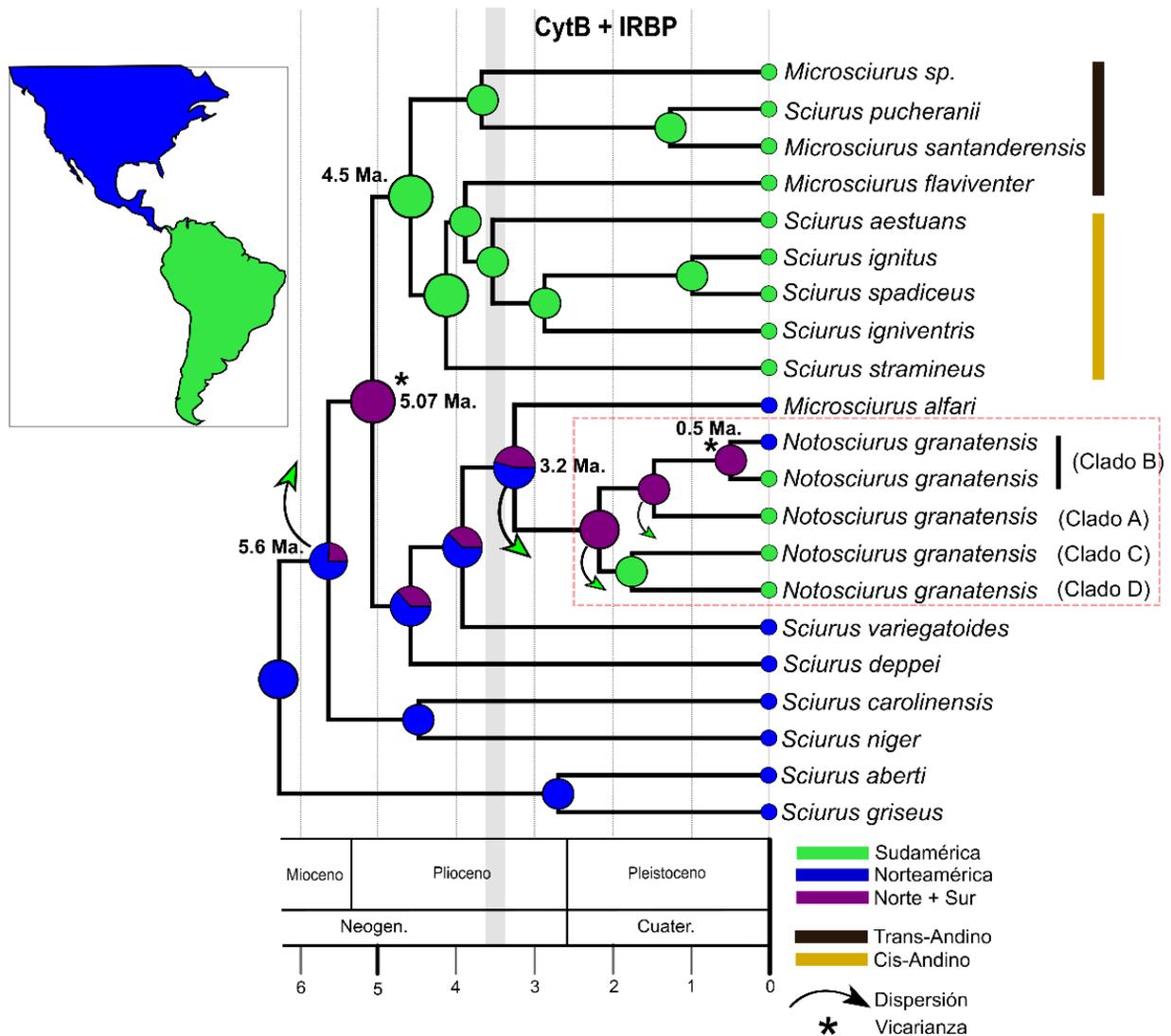


Figura 13. Filogenia “inter-específica” escalada en tiempo mostrando el modelo biogeográfico obtenido para los esciúridos del Nuevo Mundo.

En los nodos se muestra la reconstrucción de área ancestral y el porcentaje del gráfico de torta ocupado por cada color representa la probabilidad relativa para determinada área. Los eventos de dispersión están representados por flechas y su color indica la dirección de expansión; los eventos de vicarianza están señalados por asteriscos. La línea sombreada de gris corresponde a la fecha más aceptada para el cierre del istmo de Panamá. En el mapa a la izquierda se delimitan las dos grandes áreas incluidas en el modelo DEC (Bajo el esquema adoptado Centroamérica hace parte de Norteamérica).

#### 4.8. Análisis de la variación genética no neutral (*MCIR*: gen candidato implicado en la coloración del pelaje)

**4.8.1 Reconstrucción de la proteína (*Receptor-1 de la Melanocortina*).** En total se obtuvieron 63 secuencias del marcador nuclear *MCIR* que pertenecen a individuos de diferentes fenotipos, con un rango ente 644 y 945 pb. Se estableció que la región codificante del gen en la especie consta de 945 pb, al igual que en otros miembros de la tribu Sciurini como *Sciurus carolinensis*, *S. niger* y *S. vulgaris* (McRobie *et al.*, 2014). Este exón se traduce en una proteína de 314 aminoácidos cuya estructura consta de una cabeza Amino extracelular, una cola Carboxilo intracelular, tres lazos extracelulares, tres lazos intracelulares y siete dominios trans-membranales (**figura 14**).

**4.8.2 Inspección visual de los polimorfismos.** Un alineamiento inicial muestra gran similitud entre las secuencias del *MCIR* de *Notosciurus granatensis* y las de otras especies de la tribu Sciurini (**figuras 14 y 15**). En concordancia con la proximidad geográfica, los mayores porcentajes de similitud se dan con respecto de *Sciurus carolinensis* ( $\pm 98.5\%$ ) y *S. niger* ( $\pm 98.4\%$ ), ambas distribuidas en Norteamérica, mientras que el menor porcentaje se da con respecto de *S. vulgaris* ( $\pm 97\%$ ), la cual es originaria de Eurasia. Como resultado de esto, la proteína codificada por el gen es prácticamente idéntica en las cuatro especies.

Se contaron un total de 47 polimorfismos en toda la matriz interespecífica, de los cuales 32 corresponden a mutaciones sinónimas y solo 15 a mutaciones no sinónimas. Dentro de estas últimas, las que diferencian consistentemente a *Notosciurus granatensis* de las demás ardillas son (**figura 14**):

1. *N. granatensis* vs. *S. carolinensis*: G65C (cambio de la Arginina 22 por una Prolina).
2. *N. granatensis* vs. *S. niger*: T43C (cambio de la Serina 15 por una Prolina – solo con respecto de uno de los alelos de *S. niger*); G65C (cambio de la Arginina 22 por una Prolina), C88T (cambio de la Serina 30 por una Prolina – solo con respecto de uno de los alelos de *S. niger*); A477G (cambio de la Isoleucina 167 por una Metionina – solo con respecto de uno de los alelos de *S. niger*).
3. *N. granatensis* vs. *S. vulgaris*: G29C (cambio de la Cisteína 10 por una Serina); T61C (cambio de la Fenilalanina 21 por una Serina); G65C (cambio de la Arginina 22 por una Prolina); T314C (cambio de una Metionina 105 por una Treonina); G322A (cambio de la Alanina 108 por una Treonina); A340G (cambio de la Asparagina 114 por Ácido Aspártico); T473C y G474A (cambio de la Valina 158 por una Alanina); T697C (cambio de la Cisteína 233 por una Arginina); T713C (cambio de la Valina 238 por una Alanina)

Un segundo alineamiento, solo con las secuencias de *Notosciurus granatensis*, evidencia muy poca variación intraespecífica en el *MC1R*, con porcentajes de similitud siempre por encima del 99.5 % entre individuos de las diferentes poblaciones caracterizadas. Este valor puede ser mayor, llegando incluso hasta el 100 %, entre los miembros de un mismo clado o “especie putativa”, en concordancia con la afinidad demostrada en los análisis anteriores (mitocondriales o combinados).

Se contaron un total de 11 sitios variables, de los cuales ocho corresponden a mutaciones sinónimas y solo tres a mutaciones no sinónimas. Algunos de estos polimorfismos pueden ser exclusivos de algunas poblaciones o incluso de uno u otro clado o “especie putativa”, lo que en cierta medida también sustenta su separación. Los cambios que alteran la cadena de aminoácidos en la proteína son los siguientes (**figuras 14 y 15**):

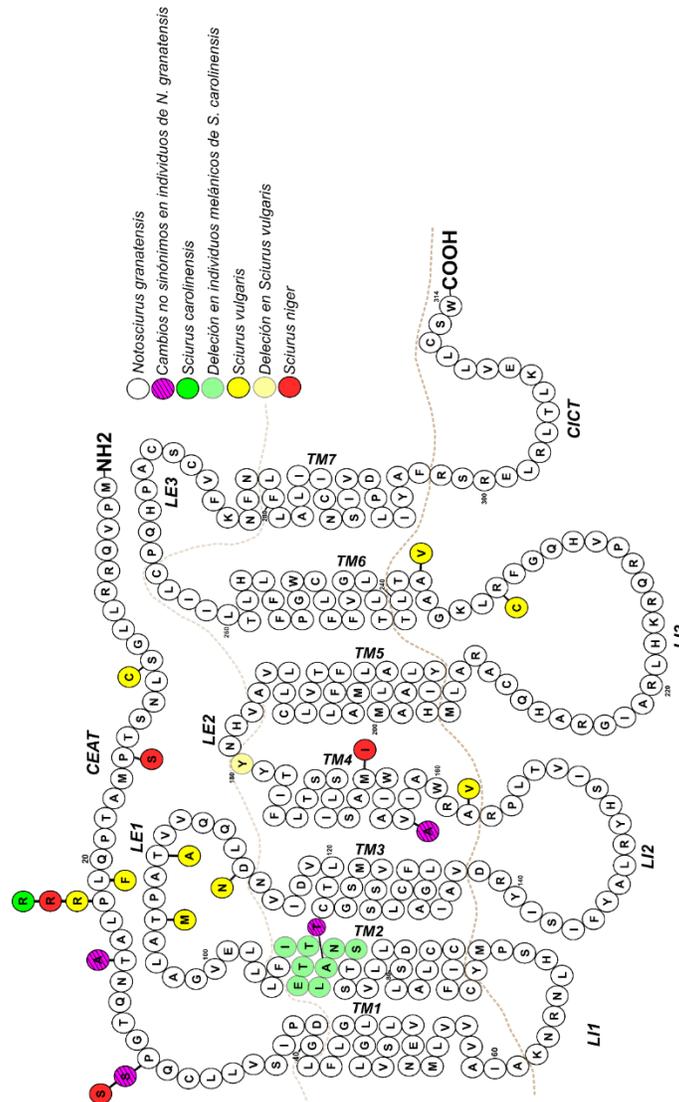
1. A73G (cambio de la Treonina 25 por una Alanina): solo en algunos individuos asociados a los clados C (Cordillera Oriental) y D (Valle del Magdalena).
2. C88T (cambio de la Prolina 30 por una Serina): solo en algunos individuos asociados al clado C, específicamente de la población de Choachí, Cundinamarca.
3. T464C (cambio de la Valina 155 por una Alanina – solo en un individuo asociado al clado D, específicamente de la población de San Antonio de Tequendama, Cundinamarca).

Se detectaron 14 posiciones heterocigóticas en las secuencias de 17 individuos, ocho de ellos miembros del clado B (occidente de Colombia), seis del clado D (Valle del Magdalena) y tres del clado A (norte de Colombia). En la mayoría de estas posiciones ninguna de las dos variables alélicas determina cambios en la cadena de aminoácidos, exceptuando la 254, en la cual la presencia de una G da como resultado un codón para Alanina, mientras que la presencia de una A un codón para Treonina (**figuras 14 y 15**).

No se detectó una asociación consistente entre los polimorfismos del *MC1R* y los patrones de coloración del pelaje observados dentro de *N. granatensis*, lo que en últimas quiere decir que este gen no ejerce una influencia directa sobre la variación fenotípica de la especie. En este sentido, las secuencias de dos individuos contrastantes, por ejemplo, uno de dorso rojizo y vientre blanco vs uno de dorso negruzco y vientre rojo, pueden ser prácticamente idénticas, al igual que la proteína que codifican (**figura 16**).

Como evidencia adicional, las mutaciones no sinónimas en el *MC1R* de *N. granatensis* no concuerdan con mutaciones que determinan cambios en la coloración del pelaje en otros vertebrados. La única excepción se da en tres individuos heterocigotos del clado D (Valle del Magdalena), en los cuales una de las variables alélicas podría cambiar una Alanina por una

Treonina en una posición asociada con el melanismo en cerdos (**figura 15**). No obstante, ninguno de estos tres individuos evidencia una coloración melánica.



*Figura 14.* Reconstrucción bidimensional de la proteína codificada por el gen MC1R en la tribu Sciurini.

Los círculos blancos delineados con negro representan los 314 aminoácidos expresados en la mayoría de los individuos de *N. granatensis*. Los círculos de colores representan los aminoácidos expresados en otras especies o aminoácidos alternativos expresados en algunas poblaciones de *N. granatensis* (morado). La línea punteada equivale a la membrana plasmática de los melanocitos. Cabeza extracelular Amino terminal (**CEAT**); Dominio trans-membranal (**TM**); Lazo extracelular (**LE**); Lazo intracelular (**LI**); Cola intracelular Carboxilo terminal (**CICT**)

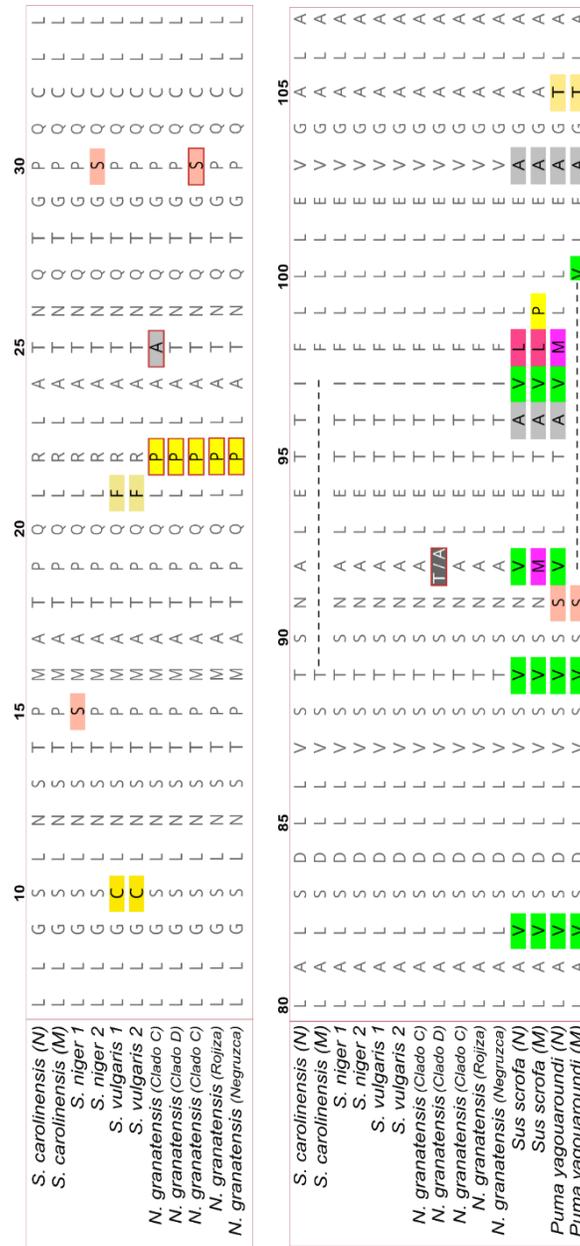


Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en un sector de la proteína codificada por el gen *MC1R* en ardillas.

Los cambios que diferencian a *N. granatensis* de otras especies están delineados con rojo. **(Abajo)** Alineamiento en un sector de la proteína asociado con cambios en la coloración del pelaje. Se incluyen otras especies de mamíferos en las que se ha comprobado la relación entre mutaciones en el *MC1R* y melanismo: *Sciurus carolinensis* (Delección entre 90 y 97); *Puma yagouaroundi*: delección entre 95 y 102; *Sus scrofa*: cambio de la Valina 92 por una Metionina. En *N. granatensis* algunos individuos son heterocigotos para esta misma posición, pudiendo codificarse una Alanina o una Treonina. No obstante, ninguno de estos individuos es melánico o muy oscuro. Normal (**N**); Melánico (**M**).

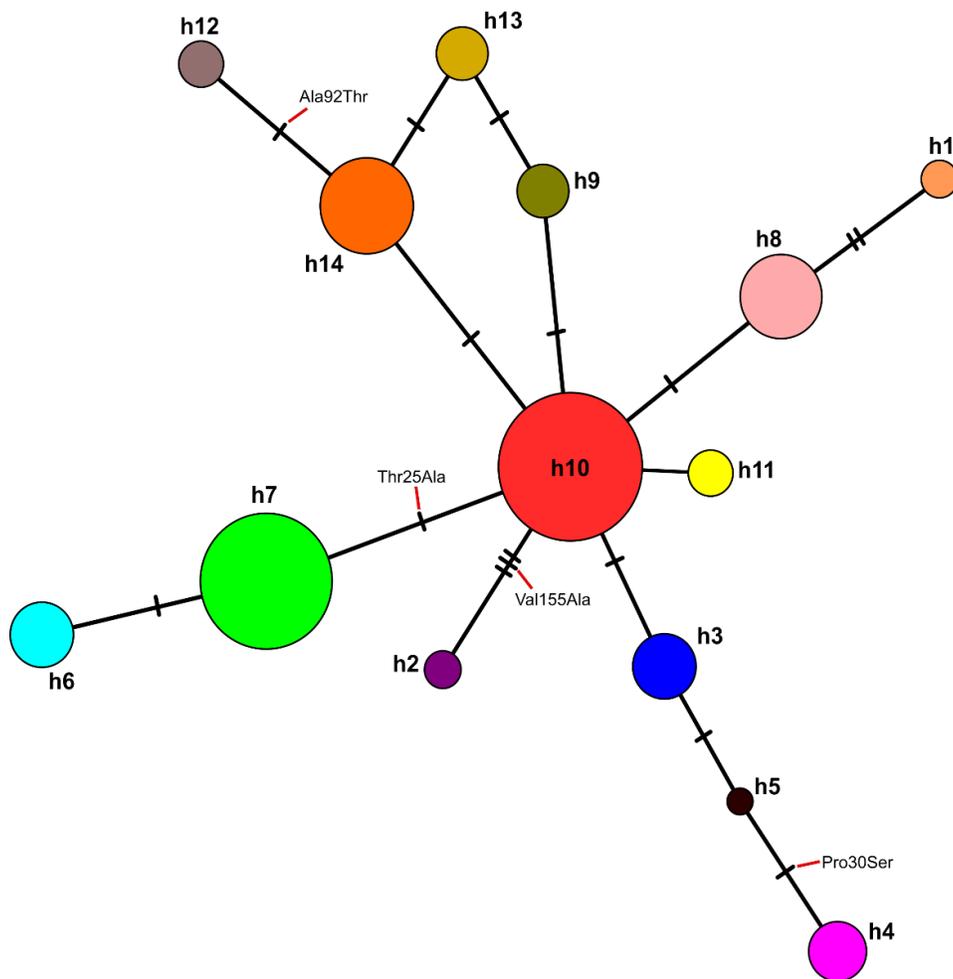


*Figura 16.* Ilustraciones de los dos fenotipos más extremos observados en las poblaciones de *Notosciurus granatensis* en Colombia

**a.** Fenotipo más claro, típico de las poblaciones del norte de Colombia; **b.** Fenotipo más oscuro, presente en algunas poblaciones de la región del bajo Zulia y el Catatumbo en Colombia. A pesar de las diferencias, las secuencias del *MC1R* entre individuos con estos dos fenotipos pueden tener hasta un 99.98% de similitud.

**4.8.3 Diversidad genética.** Las 63 secuencias del *MC1R* de *Notosciurus granatensis* representan un total de 14 haplotipos, los cuales pueden ocurrir entre una y 31 veces a lo largo de toda la muestra de individuos y se traducen en una diversidad haplotípica moderada ( $H_d = 0.854$ ) (tabla 12). De las 24 poblaciones caracterizadas para este marcador, tan solo el 12.5 % (3) alberga haplotipos exclusivos, mientras que la gran mayoría, es decir, el 87.5 % (21) comparte entre uno y tres.

Contrario a lo que sucede con los marcadores mitocondriales, la red haplotípica del *MC1R* no refleja algún patrón de estructuración particular, bien sea con relación a la geografía o a cualquiera de las hipótesis taxonómicas en torno a la especie (**figura 17**). En lugar de esto, los haplotipos de menos frecuencia están dispuestos desorganizadamente en torno al haplotipo más común, todos separados por escasos pasos mutacionales. Este haplotipo central se distribuye en individuos de todos los fenotipos, de todos los clados o “especies putativas” y casi que en todas las poblaciones caracterizadas.



*Figura 17.* Red haplotípica del *MC1R*. Cada color representa un haplotipo y el tamaño del círculo es equiparable a su frecuencia. Las líneas transversales constituyen pasos mutacionales, bien sea sinónimos o no sinónimos.

En términos de las “especies putativas” dentro de *N. granatensis*, las que corresponden a los clados C (cordillera Oriental) y D (Valle del Magdalena) exhiben una mayor diversidad genética en el marcador *MC1R* respecto de las que corresponden a los clados A (norte de Colombia) y B (occidente de Colombia) (**tabla 12**). No obstante, esto posiblemente esté relacionado con la cantidad desigual de individuos caracterizados en las poblaciones asociadas a cada uno de estos clados.

Tabla 12.

*Parámetros estadísticos de diversidad genética medidos a partir del alineamiento global del marcador nuclear MC1R, y en alineamientos individuales de cada uno de los haplogrupos/clados/especies putativas dentro de N. granatensis.*

Clado “especie putativa”	n	S	$\pi$	k	H	H <sub>d</sub>
Clado A “Norte”	12	1	0.00017	0.159	2	0,159
Clado B “Occidente”	9	4	0.00109	1.000	4	0.634
Clado C “Andes”	21	6	0.00187	1.711	7	0.731
Clado D “Magdalena”	16	7	0.00181	1.651	7	0.788
<i>Notosciurus granatensis</i> (alineamiento completo)						
	58	15	0.00191	1.748	14	0.854

**Nota:** Número de individuos caracterizados en el clado (**n**); Número de sitios polimórficos (**S**); diversidad nucleotídica ( **$\pi$** ); número promedio de diferencias nucleotídicas (**k**); número de haplotipos (**H**); diversidad haplotípica (**H<sub>d</sub>**).

Los análisis de neutralidad efectuados revelaron que el gen *MC1R* no está sujeto a presiones selectivas en las poblaciones de *N. granatensis* caracterizadas. Por un lado, la prueba de Tajima arrojó un valor negativo que podría reflejar la influencia de la selección purificante (**D = -1.029**), sin embargo, la probabilidad asociada no permite rechazar la hipótesis nula de evolución neutral

( $p > 0.10$ ). Por otra parte, en la prueba de McDonald-Kreitman el índice de neutralidad obtenido no se aleja significativamente de uno ( $IN = 0.824$ ;  $p = 1.00$ ), lo cual también sustenta el hecho de que este marcador nuclear no está siendo influenciado por la selección natural.

**4.8.4 Estructuración jerárquica de la variación en el *MCIR*.** Bajo las hipótesis de estructuración planteadas, los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con el *MCIR* arrojaron resultados similares a los obtenidos con los marcadores mitocondriales, salvo una excepción (**tabla 13**).

- 1. Sin definición de grupos a priori:** El primer AMOVA muestra que hay una estructuración marcada en este marcador, en principio debido a diferencias significativas existentes entre las poblaciones ( $\Phi_{ST} = 0.74$ ;  $P < 0.0001$ ).
- 2. 17 grupos = 17 subespecies, según propuesta taxonómica 1:** El segundo AMOVA indica que la mayor parte de la variación en el *MCIR* (66.44 %) se debe a las diferencias entre los 17 grupos definidos a priori ( $\Phi_{CT} = 0.66$ ;  $P < 0.0001$ ). Este resultado se considera atípico debido a que ninguno de los análisis precedentes, bien sea con el mismo *MCIR* o con los marcadores mitocondriales, refleja esta hipótesis taxonómica. Posiblemente este panorama de estructuración sea una réplica del obtenido en el primer AMOVA, ya que prácticamente cada población caracterizada representa una subespecie diferente.
- 3. 3 grupos = 3 subespecies, según propuesta taxonómica 2:** En contraste con el anterior, este tercer AMOVA evidencia que solo una pequeña proporción de la variación total (3.44 %) es explicada por las diferencias entre los grupos definidos a priori ( $\Phi_{CT} = 0.034$ ;  $P = 0.199$ ), mientras que un mayor porcentaje (71.08 %) se debe a las diferencias entre las poblaciones que los conforman ( $\Phi_{SC} = 0.736$ ;  $P < 0.0001$ ). Este resultado también coincide

con lo encontrado a partir de los marcadores mitocondriales, ya que las subespecies según esta propuesta taxonómica no constituyen grupos discretos.

**4 grupos = 4 haplogrupos/clados, según análisis precedentes:** Pese a que los marcadores mitocondriales dan cuenta de una clara divergencia entre los cuatro clados de *N. granatensis*, el último AMOVA señala que las diferencias que existen entre estos a nivel del *MC1R* explican solo un pequeño porcentaje de la variación total del gen en la especie (21.40 % -  $\Phi_{CT} = 0.214$ ;  $P < 0.001$ ), mientras que una mayor proporción es en cambio explicada por las diferencias que hay entre las poblaciones que los conforman (54.08 % -  $\Phi_{SC} = 0.688$ ;  $P < 0.0001$ ).

Tabla 13.

*Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de acuerdo con 4 hipótesis de estructuración dentro de N. granatensis:*

	Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Porcentaje de variación	Estadísticos	P		
<b>1</b>	Entre poblaciones	23	79.032	74.18%	$\Phi_{ST} = 0.742$	0		
	Dentro de poblaciones	92	21.494	25.82%				
<b>2</b>	Entre grupos	16	74.939	66.44%	$\Phi_{CT} = 0.664$	0		
	Entre poblaciones dentro de grupos	7	4.093	8.51%			$\Phi_{SC} = 0.254$	0.0145
	Dentro de poblaciones	92	21.494	25.05%			$\Phi_{ST} = 0.749$	0
<b>3</b>	Entre grupos	2	14.412	3.44%	$\Phi_{CT} = 0.034$	0.199		
	Entre poblaciones dentro de grupos	21	66.620	71.08%			$\Phi_{SC} = 0.736$	0
	Dentro de poblaciones	92	21.494	25.48%			$\Phi_{ST} = 0.745$	0
<b>4</b>	Entre grupos	3	28.636	21.40%	$\Phi_{CT} = 0.214$	0.0004		
	Entre poblaciones dentro de grupos	20	50.396	54.08%			$\Phi_{SC} = 0.688$	0
	Dentro de poblaciones	92	21.494	24.52%			$\Phi_{ST} = 0.754$	0

**Nota:** **1.** Sin grupos definidos a priori; **2.** Tres grupos definidos con base en la propuesta de subespecies de de Vivo y Carmignotto (2015); **3.** 17 grupos definidos a priori con base en las propuestas de subespecies de Nitikman (1985) y Thorington et al. (2012); **4.** Cuatro grupos definidos a priori de acuerdo con igual número de haplogrupos/clados recuperados en análisis previos. **g.l.** grados de libertad.

#### 4.9. Análisis estadístico de la variación fenotípica

**4.9.1 Selección de variables.** La amplia dispersión de los puntos en el espacio de los componentes del ACP, evidencia gran heterogeneidad ambiental a lo largo de la distribución de *N. granatensis* en Colombia (**figuras 18 y 19**). De acuerdo con este análisis, el 72 % de la variación total en el conjunto original de datos (21 variables) es explicada por los dos primeros componentes: el componente 1 reúne un 39,72 % de dicha variación y está influenciado principalmente por variables relacionadas con la temperatura y la presión del vapor de agua, mientras que el componente 2, que reúne el 31,99 % de la variación, está influenciado principalmente por variables de precipitación (**tabla 14**). El gráfico del análisis no muestra patrones de ordenamiento marcados, pero si un ligero gradiente de localidades a lo largo del componente 1, relacionado en mayor medida con variables de temperatura, y la separación de unas pocas localidades con altos valores de precipitación en el componente 2 (**figuras 18 y 19**).

Tabla 14.

*Variables medioambientales con mayor contribución a los 3 primeros factores del Análisis de Componentes Principales.*

Variable	Contribución de las variables		
	CP1	CP2	CP3
<i>Temperatura media anual (TMA)</i>	<b>0.339</b>	-0.057	-0.079
<i>Temperatura máxima del mes más caliente (TMMeCa)</i>	<b>0.331</b>	-0.077	-0.105
<i>Temperatura mínima del mes más frío (TmMeFr)</i>	<b>0.338</b>	-0.022	-0.054
<i>Temperatura media del cuarto más húmedo (TmeCuHu)</i>	<b>0.337</b>	-0.062	-0.077
<i>Temperatura media del cuarto más seco (TmeCuSe)</i>	<b>0.339</b>	-0.045	-0.086
<i>Temperatura media del cuarto más caliente (TmeCuCa)</i>	<b>0.339</b>	-0.062	-0.058
<i>Temperatura media del cuarto más frío (TmeCuFr)</i>	<b>0.339</b>	-0.047	-0.094
<i>Presión del vapor del agua (PrVaAg)</i>	<b>0.341</b>	-0.033	-0.007

Variable	Contribución de las variables		
	CP1	CP2	CP3
<i>Precipitación media anual (PmeAn)</i>	0.096	<b>0.348</b>	0.154
<i>Precipitación del mes más húmedo (PMeHu)</i>	0.107	<b>0.282</b>	0.277
<i>Precipitación del mes más seco (PMeSe)</i>	0.051	<b>0.351</b>	-0.050
<i>Precipitación del cuarto más húmedo (PCuHu)</i>	0.108	<b>0.300</b>	0.252
<i>Precipitación del cuarto más seco (PCuSe)</i>	0.053	<b>0.359</b>	-0.041
<i>Precipitación del cuarto más caliente (PCuCa)</i>	0.012	<b>0.350</b>	0.106
<i>Precipitación del cuarto más frío (PCuFr)</i>	0.143	<b>0.318</b>	0.007
<i>Radiación solar (RS)</i>	0.127	-0.156	<b>0.403</b>
<i>Eigenvalor:</i>	8.341	6.719	2.519
<i>Proporción de la varianza explicada:</i>	39.72%	31.99%	11.99%

**4.9.2 Patrones medioambientales y fenotípicos.** Considerando la identidad taxonómica de los especímenes en cada localidad, no se evidencian agrupamientos discretos que reflejen fielmente las propuestas adoptadas en el presente trabajo; por el contrario, localidades de una misma subespecie pueden aparecer dispersas por todo el gráfico, con algunas excepciones (p. ej. *S. g. meridensis*) (**figuras 18 y 19**). Según esto, condiciones medioambientales similares no parecen determinar del todo la expresión de fenotipos idénticos o parecidos. No obstante, hacia la parte derecha del gráfico se agrupan varias de las localidades de subespecies (según Nitikman, 1985) que exhiben una coloración dorsal rojiza a naranja uniforme y el vientre totalmente blanco, lo que sugiere que estas características en particular pueden estar moduladas por condiciones más específicas, relacionadas en mayor medida a valores altos de temperatura.

En el Análisis de Agrupamiento se aprecia claramente como se juntan localidades geográficamente cercanas y con condiciones ambientales similares, sin embargo, tampoco se recupera un patrón que refleje fielmente alguna de las propuestas taxonómicas adoptadas (**figura 20**). Al igual que en el ACP, las localidades de una misma subespecie pueden aparecer dispersas por todo el árbol jerárquico, salvo algunas excepciones (p. ej. *S. g. meridensis*), lo que soporta la

idea de que bajo ambientes similares no necesariamente aparecen fenotipos idénticos. En este análisis también se distingue un grupo grande en el que se encuentran la mayoría de las subespecies con coloración dorsal rojiza-naranja uniforme y vientre totalmente blanco.

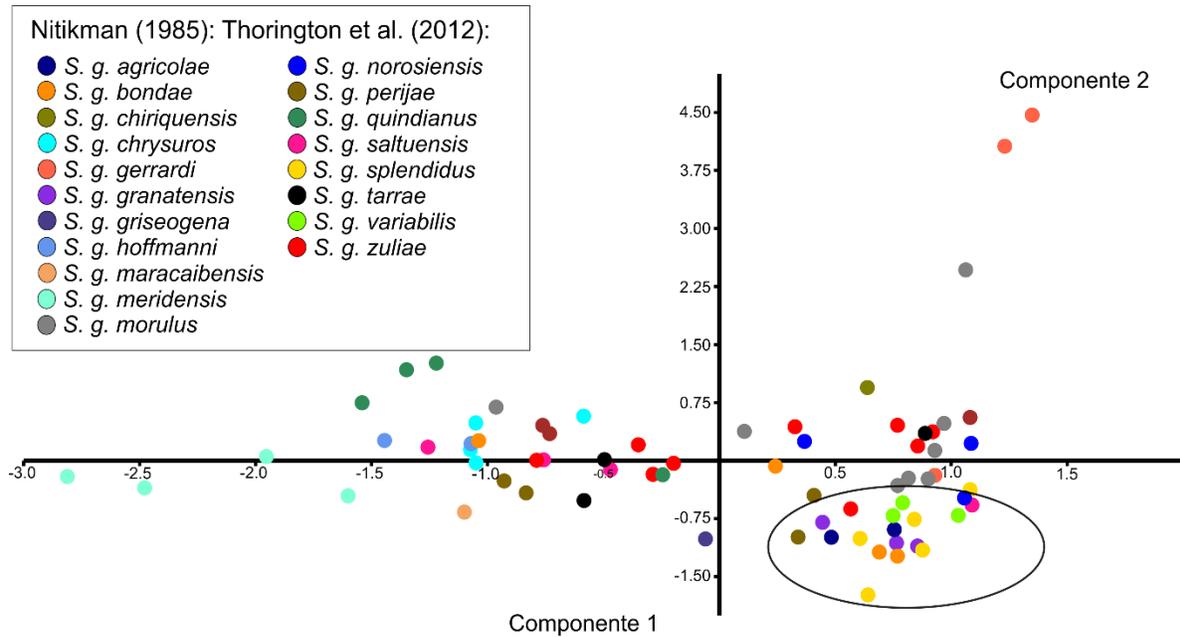


Figura 18. Gráfico en 2 dimensiones del ACP de las variables ambientales medidas en 40 localidades a lo largo de la distribución de *N. granatensis*. Las localidades están coloreadas según las subespecies de la propuesta de Nitikman, (1985) o Thorington et al. (2012)

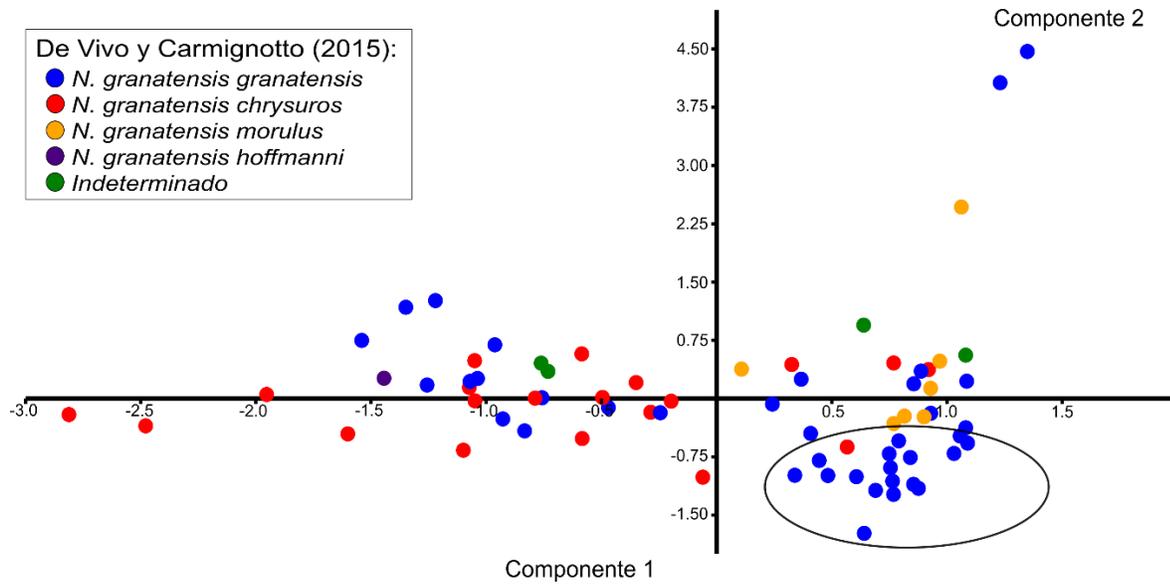


Figura 19. Gráfico en 2 dimensiones del ACP de las variables ambientales medidas en 40 localidades a lo largo de la distribución de *N. granatensis*. Las localidades están coloreadas según las subespecies de la propuesta de de Vivo y Carmignotto (2015).

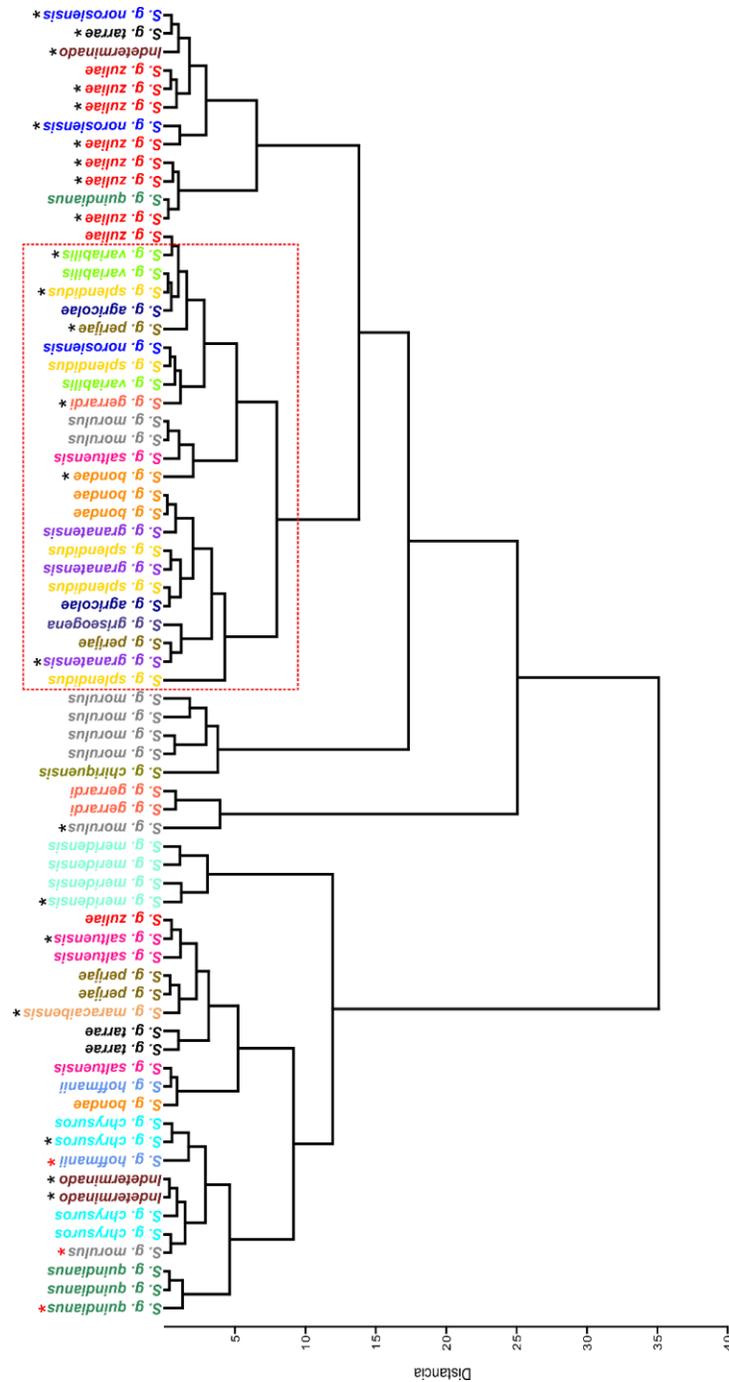
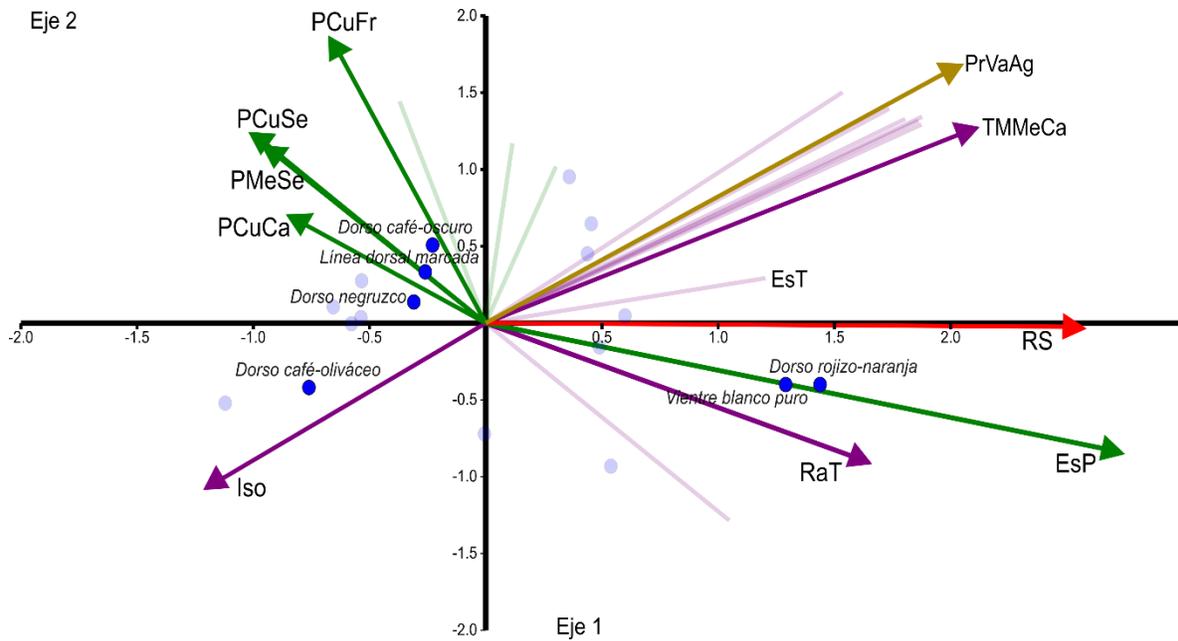


Figura 20. Árbol jerárquico que representa las relaciones de similitud ambiental entre 40 localidades en las que se ha registrado *N. granatensis* en Colombia y países vecinos. Localidades coloreadas según propuesta de Nitikman (1985) o Thorington et al. (2012).

\* representan las localidades de recolecta del presente estudio, \* representan localidades de las que se revisaron especímenes en colecciones biológicas, y las restantes corresponden a localidades obtenidas de la literatura. El recuadro encierra algunas de las subespecies con coloración dorsal rojiza-naranja uniforme y vientre blanco.

**4.9.3 Relación Ambiente-Fenotipo.** En los Análisis de Correspondencias Canónicas (ACC), las variables ambientales explican aproximadamente el 60 % de la variación en los datos de presencia-ausencia de características fenotípicas medidas en las 40 localidades. El eje 1 reúne el 40,97 % de la varianza y está correlacionado principalmente con la estacionalidad en la precipitación ( $r = 0,66$ ), la radiación solar ( $r = 0,62$ ), temperatura máxima del mes más caliente ( $r = 0,51$ ) y la presión del vapor de agua ( $r = 0,49$ ). Por su parte, el eje 2 acumula el 18,11 % de la varianza y está principalmente correlacionado con la precipitación del cuarto más frío ( $r = 0,44$ ) y con la presión del vapor de agua ( $r = 0,40$ ). A partir de la **figura 21** se puede destacar que: **a.** Los fenotipos más claros (menos melánicos) de *N. granatensis* en Colombia, y que predominan en tierras bajas del Caribe, están influenciados probablemente por una combinación de valores altos en el rango anual de temperatura, la estacionalidad en la precipitación y la radiación solar; **b.** Los fenotipos más oscuros (más melánicos), como los que se encuentran en poblaciones del alto Catatumbo y las tierras bajas del alto Zulia, están influenciados principalmente por valores entre medios y altos en variables de precipitación; **c.** el fenotipo más común en la muestra, que representa una tonalidad dorsal intermedia y predomina en poblaciones andinas (dorso café-oliváceo), aparentemente está determinado por valores altos de Isotermalidad. Según lo anterior, condiciones ambientales relativamente extremas, como altas temperaturas, alta radiación solar, o precipitaciones abundantes, propician fenotipos extremos, mientras que condiciones más estables propician fenotipos intermedios.



*Figura 21.* Gráfico en 2 dimensiones del CCA: se destacan las variables ambientales que más explican la matriz fenotípica completa, y aquellas que determinan algunas de las características de coloración del pelaje.

La dirección y largo de las flechas es proporcional a su influencia sobre los ejes 1 y 2; las flechas verdes representan variables de precipitación y las moradas de temperatura. Los puntos azules representan las características fenotípicas y su proximidad con las flechas refleja su relación. **PCuFr** (Precipitación del cuarto más frío); **PCuSe** (Precipitación del cuarto más seco); **PMeSe** (Precipitación del mes más seco); **PCuCa** (Precipitación del cuarto más caliente); **Iso** (Isotermalidad); **PrVaAg** (Presión del vapor de agua); **TMMeCa** (Temperatura máxima del mes más caliente); **RS** (Radiación solar); **EsP** (Estacionalidad en la precipitación); **RaT** (Rango anual de la temperatura).

## 5. Discusión

### Panorama filogenético de la tribu Sciurini e implicaciones taxonómicas:

La totalidad de los análisis filogenéticos interespecíficos efectuados en el presente trabajo, bien sea mitocondriales o combinados y mediante acercamientos bayesianos o de máxima

verosimilitud, arrojaron resultados en general consistentes con los obtenidos por otros autores (Mercer y Roth, 2003; Steppan *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2003; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014; Pecnerová *et al.*, 2015). Hasta el momento, el mayor esfuerzo por caracterizar la tribu Sciurini a nivel molecular fue hecho por Pecnerová *et al.* (2015), quienes generaron secuencias de ocho marcadores, entre nucleares y mitocondriales, a partir de un total de 28 taxa, permitiendo esto la reconstrucción de la filogenia más completa del grupo. Aunque aquí se utilizó un esquema reducido, en cuanto al número de marcadores (uno mitocondrial y uno nuclear) y el número de taxa (23), así como una perspectiva metodológica diferente a la de estos autores, los patrones de relaciones recuperados fueron básicamente los mismos, salvo algunas excepciones.

A continuación, se discuten los aspectos relevantes de la taxonomía de Sciurini a la luz del panorama filogenético recuperado en el presente trabajo y en los trabajos de otros autores:

- **Propuesta taxonómica más aceptada (Thorington y Hoffmann, 2005): cinco géneros, *Tamiasciurus*, *Sciurus*, *Microsciurus*, *Rheithrosciurus* y *Syntheosciurus*:**

*Tamiasciurus* se recuperó como la divergencia más temprana dentro de Sciurini y como el único género de la propuesta taxonómica más aceptada para esta tribu (Thorington y Hoffmann, 2005) que es claramente monofilético, tal y como había sido determinado en trabajos previos (Mercer y Roth, 2003; Steppan *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2003; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014; Pecnerová *et al.*, 2015). En este sentido, se trataría del único género de la tribu en el que la diagnosis histórica, basada en características distribucionales, ecológicas y morfológicas, concuerda con la diagnosis molecular, es decir, permite circunscribir inequívocamente un grupo natural. Tal es el carácter distintivo de las especies de *Tamiasciurus* que incluso en algún momento fueron consideradas dentro de una tribu aparte, Tamiasciurini (Moore, 1959).

El caso contrario sucede con los demás géneros reconocidos en la propuesta taxonómica de Thorington y Hoffmann (2005). De estos, *Sciurus* es posiblemente el que más llama la atención, ya que exhibe una distribución casi cosmopolita y alberga el mayor ensamblaje de especies y subespecies dentro de la tribu Sciurini. Dicha heterogeneidad de formas se traduce en un panorama morfológico y ecológico muy amplio, lo que ha dificultado la construcción de una diagnosis precisa y definitiva para el género a lo largo de la historia. De hecho, con el fin de acomodar toda esta variación, algunos autores han planteado propuestas alternativas en la que se reconocen varios grupos dentro de *Sciurus*, a los cuales se les ha dado el estatus de subgéneros o incluso de géneros (de Vivo y Carmignotto, 2015). Este conflicto taxonómico se ve reflejado en la evidencia molecular, ya que, en todos los análisis filogenéticos existentes, incluidos los del presente trabajo, *Sciurus* se recupera como un grupo parafilético que incluye también a los miembros de los géneros *Microsciurus*, *Rheithosciurus* y *Syntheosciurus*. (Pecnerová, 2012; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014; Pecnerová *et al.*, 2015).

Los hallazgos del presente trabajo con relación a *Microsciurus* también concuerdan con los de otros autores, en cuanto a que se trata de un grupo polifilético si se tiene en cuenta la propuesta taxonómica de Thorington y Hoffmann (2005). Aunque la circunscripción original del género se basa escuetamente en el tamaño y en la presencia de dos premolares en el maxilar, Pecnerová *et al.* (2015) demostraron que estas características pueden ser el resultado de convergencia evolutiva en linajes que no tienen una ancestría común. Según esto, la diagnosis existente de *Microsciurus* tampoco permite delimitar un grupo natural, sino más bien un arreglo de especies cuya morfología equiparable ha sido determinada por hábitos y dietas similares (Pecnerová *et al.*, 2015). En las filogenias presentadas por algunos autores (p. ej. Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015) las únicas dos especies de *Microsciurus* incluidas aparecen asociadas a clados independientes; por un

lado, la especie tipo (*M. alfari*) está estrechamente relacionada con especies de mayor tamaño del género *Sciurus* dentro de un clado netamente centroamericano, mientras que la otra especie (*M. flaviventer*) se anida en un clado netamente sudamericano Cis-andino también en estrecha relación con miembros del género *Sciurus* (Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015). En el presente trabajo se caracterizaron por primera vez especies de origen colombiano supuestamente pertenecientes a *Microsciurus*, las cuales se recuperaron dentro de un grupo monofilético Trans-andino también dentro del clado de ardillas sudamericanas. Según esto, *Microsciurus*, tal y como se ha definido históricamente, estaría representado por tres grupos independientes y distantes genéticamente.

*Rheithrosciurus* es otro género polémico dentro de la propuesta taxonómica de Thorington y Hoffmann (2005) para Sciurini. Aunque su morfología es bastante distintiva, y su distribución es notablemente parápatrica con relación a las demás especies de la tribu (Thorington *et al.*, 2012), la evidencia molecular presentada en diversos trabajos, incluido el presente, no permite resolver claramente su estatus (Mercer y Roth, 2003; Steppan *et al.*, 2003; Herron *et al.*, 2003; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014; Pecnerová *et al.*, 2015). Ya incluso en el trabajo de Pecnerová *et al.* (2015), con ocho marcadores, la posición de este género en la filogenia es variable con relación al acercamiento metodológico utilizado; en los “super-árboles reconstruidos con los métodos veto y super-tripletes aparece como un grupo monofilético que divergió antes que los miembros del género *Sciurus*, sin embargo, en los árboles de inferencia bayesiana aparece anidado dentro de un clado eurasiático en estrecha relación con la especie *Sciurus anomalus*. Villalobos y Gutiérrez-Espeleta (2014) también obtuvieron este último resultado usando cuatro marcadores, mientras que en el presente trabajo se obtuvo con dos. Bajo este panorama conflictivo es imposible determinar

si *Rheithrosciurus* constituye un género válido, es decir, un grupo natural, o es un miembro morfológicamente particular de los “*Sciurus*” euroasiáticos.

El género *Syntheosciurus* representa un caso muy similar al de *Rheithrosciurus*, pues a pesar de que históricamente se ha reconocido la peculiaridad morfológica de la única especie que lo conforma, la evidencia molecular no respalda del todo su validez. Solamente en el trabajo de Pecnerová *et al.* (2015), y bajo un acercamiento metodológico particular, este género se recupera como una radiación temprana con respecto de las demás ardillas centroamericanas, lo cual podría indicar que se trata de un grupo natural bien diferenciado. Sin embargo, en otros análisis de esos mismos autores, y en los efectuados en otros trabajos, aunque también se relaciona con taxa centroamericanos, su posición ya no es basal sino derivada, en estrecha relación con especies de los géneros *Microsciurus* o *Sciurus*. En el presente trabajo no se incluyeron secuencias de *Synthesosciurus*, por lo que no se puede ofrecer una perspectiva alternativa.

- **Propuestas taxonómicas alternativas (Allen, 1915; de Vivo y Carmignotto, 2015):  
Múltiples géneros.**

A la luz de la evidencia molecular, el esquema taxonómico más aceptado para Sciurini (Thorington y Hoffmann, 2005) no concuerda con la realidad evolutiva. Prácticamente ninguno de los géneros existentes bajo esta propuesta (*Microsciurus*, *Rheithrosciurus*, *Sciurus*, *Syntheosciurus*), exceptuando *Tamiasciurus*, representa un grupo natural, es decir, que se vea reflejado como grupo monofilético en las filogenias del presente trabajo o en las de otros autores. Existen hipótesis taxonómicas alternativas que se han utilizado históricamente para organizar la diversidad dentro de la tribu, especialmente en el nuevo mundo, pero que se han descartado en pro de la visión simplificada de cinco géneros. Dichas propuestas se han basado en cambio en una visión más amplia en la que se han usado numerosos grupos para acomodar las especies, a los que

se les ha dado el estatus de subgéneros o incluso de géneros (Trouessart, 1880; Nelson, 1899; Moore, 1959). No obstante, hasta el momento estas hipótesis no han sido contrastadas con la evidencia molecular.

La revisión más completa de la taxonomía y sistemática de la familia Sciuridae en el Nuevo Mundo fue hecha por J. A. Allen en 1915. Este autor también fue partidario de la visión amplia y argumentaba que una mayor cantidad de grupos permite expresar mejor las interrelaciones y las diversidades dentro de sus elementos constituyentes (Allen, 1915). Por tal razón, en su propuesta taxonómica circunscribe un total de 16 géneros, todos aparentemente diagnosticables a partir de una serie de características morfológicas y de patrones distribucionales. Ocho de estos géneros estarían restringidos a Norteamérica (incluyendo Centroamérica), de los cuales *Tamiasciurus* sería el único que se recupera como monofilético en los análisis de diferentes trabajos, tal y como se había mencionado anteriormente. La evaluación de la monofilia de los demás géneros norteamericanos a la luz de la evidencia molecular resulta más complicada debido a que algunas especies aún no han sido caracterizadas, o debido a que hay muy pocas secuencias por especie disponibles. Por tal razón, se requiere de un muestreo más amplio para poder determinar si *Neosciurus*, *Otosciurus*, *Herperosciurus*, *Echinosciurus*, *Baiosciurus*, *Syntheosciurus* y *Parasciurus* representan grupos naturales. *Microsciurus* y *Mesosciurus* por su parte, son géneros reconocidos por Allen (1915) que además de distribuirse en Norteamérica también se encuentran en los ecosistemas de Sudamérica. Siguiendo la visión de este autor, ambos se recuperan en las filogenias del presente trabajo como grupos polifiléticos, al igual que en otros trabajos, lo que en últimas refleja que su diagnosis no permite delimitar grupos naturales. Los restantes géneros, distribuidos exclusivamente en Sudamérica, sufren del mismo problema que los géneros de Norteamérica, ya que no todas las especies están caracterizadas o existen pocas secuencias por

especie. En el presente trabajo se generaron por primera vez secuencias de algunas especies colombianas que supuestamente redimían las características morfológicas de *Microsciurus*, así como secuencias de lo que tradicionalmente se ha conocido como *Sciurus pucheranii* (Thorington y Hoffmann, 2012). Todas estas secuencias sorprendentemente conformaron un grupo monofilético bien soportado, dentro de un clado más grande netamente sudamericano. Este grupo, previamente desconocido en análisis filogenéticos, se ajusta en parte al concepto de *Leptosciurus* de Allen (1915), sin embargo, otra especie que supuestamente pertenece a este género, *Sciurus ignitus*, se recupera en un clado aparte, lo que lleva a otro caso de polifilia dentro de la propuesta de este autor. Por otro lado, las ardillas sudamericanas de mayor tamaño fueron agrupadas por Allen (1915) en los géneros *Hadrosiurus* y *Urosiurus*. Los análisis del presente trabajo y los de Pecnerová *et al.* (2015) señalaron una estrecha relación entre especies de ambos géneros, lo que en principio indicaría que no constituyen grupos independientes. Ante esto, los únicos géneros de ardillas sudamericanas propuestos por Allen (1915) que tentativamente constituyen grupos naturales son *Guerlinguetus* y *Simosciurus*. Estos se recuperan como monofiléticos en el presente trabajo y en el de Pecnerová *et al.* (2015), sin embargo, se requiere clarificar mejor sus relaciones con otros géneros, además de una mayor cantidad de muestras para evaluar detalladamente su diagnóstico molecular y la consistencia con la diagnóstico morfológica.

Recientemente de Vivo y Carmignotto (2015) hicieron un esfuerzo notable para reestructurar la taxonomía de las ardillas sudamericanas desde una perspectiva morfológica. La visión de estos autores es muy similar a la de Allen (1915), por lo que plantean nuevamente el uso de la mayoría de los géneros que este propone para organizar la diversidad de especies, efectuando solo ligeros cambios. Sin embargo, esta propuesta tampoco armoniza del todo con el marco filogenético que se ha construido con los datos moleculares, en cuanto a que las diagnósticos que proveen siguen

siendo pobres y no permiten circunscribir grupos naturales. En los análisis del presente trabajo y los de Pecnerová et al. (2015), *Microsciurus* y *Notosciurus*, se recuperan como grupos polifiléticos, mientras que *Hadroskiurus* como grupo parafilético o polifilético, respectivamente. Los géneros *Guerlinguetus* y *Simosciurus*, por otra parte, si se recuperan como monofiléticos, pero tal y como se mencionó anteriormente con relación a la propuesta taxonómica de Allen (1915), es necesario clarificar sus relaciones con otros géneros e incluir una mayor cantidad de muestras para corroborar su diagnóstico molecular.

El contexto filogenético que se ha construido a partir de la evidencia molecular con relación a la tribu Sciurini está lejos de ser definitivo, sin embargo, parece constituir suficiente soporte de que la taxonomía del grupo necesita ser reevaluada. Las hipótesis históricas se han basado principalmente en un número limitado de caracteres morfológicos, y en menor medida en los patrones distribucionales. El hecho de que estas hipótesis no representen fielmente la realidad evolutiva quiere decir que se necesitan nuevos planteamientos basados en una visión más integral, es decir, una en la que se utilicen conjuntamente diferentes líneas de evidencia, como morfología, ecología y datos moleculares de loci mitocondriales y nucleares. Uno de los dilemas más grandes por resolver es el de las categorías supra-específicas convenientes para agrupar la diversidad dentro de la tribu. El contraste entre las propuestas taxonómicas, unas en las que se plantea la existencia de cinco géneros (Thorington y Hoffmann, 2005), y otras en las que se plantea que son 16 (Allen, 1915), deja claro que no existen aún criterios claros para definir los límites de dichas categorías. Las filogenias reconstruidas en el presente trabajo y en trabajos previos señalan que hay grupos bien circunscritos dentro de Sciurini, los cuales podrían ser la base para el planteamiento de una nueva propuesta que esté en armonía con la realidad evolutiva.

**Contexto temporal de la diversificación de Sciurini y patrones biogeográficos:**

Los estudios previos sobre la diversificación de Sciurini han demostrado la influencia de grandes eventos geológicos en la divergencia de los principales linajes (Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015). Sin embargo, los acercamientos metodológicos que se han implementado sufren de un problema de circularidad, ya que las edades estimadas de dichos eventos se han impuesto a la vez como puntos de calibración para datar las filogenias (Bacon *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015). En el presente trabajo se utilizó una visión alternativa, en la cual la datación se basa exclusivamente en información del registro fósil de lagomorfos (conejos y afines) y roedores, incluyendo ardillas. Aunque algunos de los resultados obtenidos concuerdan con los de otros autores, la edad obtenida para ciertas divergencias es completamente diferente, ofreciendo nuevas hipótesis sobre la historia evolutiva de algunos linajes de la tribu, sobre todo en el Neotrópico. Sumado a esto, aquí se evalúa por primera vez un modelo que permite dilucidar la importancia de eventos biogeográficos como la dispersión, la vicarianza y la extinción, esto con relación a dichas divergencias y a los eventos geológicos de la región.

La edad estimada para la divergencia de la tribu Sciurini con respecto de su tribu hermana, Pteromyini, ha sido variable en los diferentes trabajos. Mercer y Roth (2003) propusieron que la separación entre ambos grupos se dio hace aproximadamente 23 millones de años, a comienzos del Mioceno, mientras que Pecnerová *et al.* (2015) plantean que fue hace unos 25 millones de años, a finales del Oligoceno. Los resultados obtenidos aquí se acercan más a los de estos últimos autores, situando esta divergencia hace 27 millones de años (95% HPD = 26.2 – 30.8 M.a.). Incluso, si se tienen en cuenta los intervalos de confianza obtenidos en ambos trabajos, las estimaciones se llegan a solapar.

Uno de los resultados más consistentes en los análisis filogenéticos de Sciurini tiene que ver con la recuperación de un patrón gradual de diversificación, en el cual se puede apreciar claramente que las especies euroasiáticas fueron las primeras en diferenciarse, seguidas por las especies de Norteamérica, Centroamérica y finalmente las de Sudamérica (Pecnerová *et al.*, 2015). En el presente trabajo se establece que la invasión de los ecosistemas del Neotrópico por parte de la tribu se dio gracias a la dispersión exitosa de un ancestro de origen norteamericano. Este evento sucedió hace unos 5.6 millones de años, a finales del Mioceno, permitiendo incluso la colonización de Sudamérica mucho antes de la fecha comúnmente aceptada para el cierre final del istmo de Panamá (Bacon *et al.*, 2015). Este resultado respalda los hallazgos de Pecnerová *et al.* (2015), quienes también encontraron que el ancestro de la tribu en Sudamérica se estableció antes de esta fecha. Sin embargo, contradice el planteamiento de Mercer y Roth (2003), quienes mencionaron que no había miembros de Sciurini en Sudamérica hasta hace unos 2.8 millones de años. Existe un amplio consenso en que el cierre final del istmo de Panamá se dio hace aproximadamente 3.5 millones de años, propiciando esto el intercambio de fauna entre el norte y el sur, o viceversa (Bacon *et al.*, 2015). No obstante, trabajos recientes sugieren que este paradigma debe ser reconsiderado, y que hubo al menos tres pulsos de migración de organismos terrestres en los últimos 30 millones de años por este corredor (Bacon *et al.*, 2015). El evento de dispersión encontrado aquí, que permitió la llegada de miembros de la tribu Sciurini a Sudamérica, concuerda con el último pulso, el cual sucedió entre 5.1 a 6 millones de años (Bacon *et al.*, 2015). Debido a los hábitos exclusivamente arbóreos de las ardillas de esta tribu, es posible que en este intervalo de tiempo ya hubiese una masa de tierra continua establecida, la cual muy seguramente estaba cubierta por bosques exuberantes similares a los que se encuentran hoy en día.

La llegada al Neotrópico por parte de Sciurini fue concomitante con la separación de dos grandes clados, uno conformado principalmente por especies centroamericanas, y otro por especies sudamericanas. Los análisis efectuados aquí también permiten establecer que una vez las ardillas de la tribu llegaron al sur, algún evento vicariante propició la divergencia entre estos dos grupos hace unos 5.07 millones de años, a comienzos del Plioceno. Más que tratarse de un fenómeno geológico, es posible que este evento concuerde con cambios en la vegetación a lo largo del istmo de Panamá, lo que pudo transformar un corredor dominado por bosques, ideal para las ardillas, en un corredor dominado por sabanas, ideal para el desplazamiento de otro tipo de mamíferos. Esta hipótesis se ve respaldada por el trabajo de Ruedas *et al.* (2017), quienes encontraron que la diversificación de los conejos de sabana, y su migración hacia el sur, pudo haber comenzado hace unos 5.1 millones de años. De acuerdo con esto, un paisaje con abundantes sabanas debió constituir una barrera ecológica que restringió el intercambio genético entre ardillas del norte y ardillas del sur.

La inclusión de nuevos taxa en el contexto del estudio filogenético de Sciurini, permitió en el presente trabajo el hallazgo de un clado previamente desconocido dentro de las ardillas sudamericanas, lo que en últimas se traduce en una oportunidad para comprender aspectos adicionales sobre la diversificación de la tribu. Este clado, conformado por especies de distribución trans-andina recolectadas en Colombia, es el grupo hermano de las demás especies de la región, las cuales, por el contrario, tienen una distribución predominantemente cis-andina. La divergencia entre ambos grupos fue datada hace unos 4.5 millones de años, en un periodo que coincide con el incremento en la orogénesis de los Andes del norte, especialmente de la cordillera Oriental colombiana (Gregory-Wodzicki, 2000). Estos resultados permiten hipotetizar que el rango geográfico continuo del ancestro de ambos grupos fue posiblemente interrumpido en el Plioceno

por el levantamiento de esta barrera montañosa, lo que promovió la separación genética de las poblaciones a lado y lado de la misma. Este patrón Cis-Trans andino también se ha encontrado en otros grupos de mamíferos, lo que demuestra que los Andes han sido importantes, no solo en la diversificación de las ardillas, sino de la mastofauna sudamericana en general (Patterson *et al.*, 2012).

La amplia caracterización molecular del sujeto de estudio del presente trabajo, y los análisis de esta información en un contexto filogenético y temporal, fueron determinantes también para dilucidar aspectos desconocidos sobre la diversificación de las ardillas en el Neotrópico. Los resultados obtenidos señalan que la migración de los miembros de la tribu desde Norteamérica a Sudamérica no sucedió una sola vez, como tradicionalmente se ha hipotetizado (Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015), sino que ocurrió en dos oportunidades independientes, separadas por varios millones de años. El segundo evento de dispersión se dio hace unos 3.2 millones de años, a finales del Plioceno, por parte del ancestro de la ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*. Esto indica que en esa época muy seguramente el corredor del istmo de Panamá estaba nuevamente cubierto por bosques, en lugar de sabanas, propiciando el paso de animales arbóreos como las ardillas. En esta época también la Cordillera Oriental de Colombia ya alcanzaba sus elevaciones actuales (Gregory-Wodzicki, 2000), lo que permite explicar que, a su llegada a Sudamérica, el ancestro de la ardilla de cola roja no haya podido alcanzar las tierras bajas al oriente, lo cual se ve reflejado en la distribución Trans-andina que tiene actualmente la especie. Adicionalmente, los análisis del presente trabajo también señalan la existencia de un evento vicariante reciente que ha propiciado la divergencia genética entre las poblaciones sudamericanas y las centroamericanas. Este evento, datado hace unos 0.5 millones de años, a finales del Pleistoceno, podría estar ligado también a un cambio en la vegetación que posiblemente restringió

el flujo de individuos entre el norte y el sur, o viceversa, o una incursión marina que tuvo el mismo efecto.

**La ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, dentro de Sciurini:**

**¿A qué género pertenece la ardilla de cola roja?**

La historia taxonómica de la ardilla de cola roja ha sido variable con relación a las categorías supra-específicas que ha ocupado. Esta especie ha sido asignada a los géneros *Guerlinguetus*, *Mesosciurus* y más comúnmente a *Sciurus* (Nitikman, 1985; Thorington y Hoffmann, 2005; Thorington *et al.*, 2012), sin embargo, en la propuesta más reciente para la tribu Sciurini de Vivo y Carmignotto (2015) la sitúan dentro de *Notosciurus*. La evidencia molecular presentada aquí, en conjunto con la de otros autores, da cuenta de que todos estos géneros son parafiléticos, por lo que su validez debe ser reevaluada. La ardilla de cola roja hace parte de un clado bien soportado junto con otras especies centroamericanas, lo que podría dar pie a la definición a futuro de un género basado en este patrón biogeográfico. No obstante, el hecho de que aún no se ha caracterizado a nivel molecular toda la diversidad de esta región, de que haya tanta heterogeneidad morfológica, y de que no existan criterios claros para la definición de categorías supra-específicas en la tribu, constituye un desafío grande para delimitar este grupo.

**¿Cuál es la especie hermana de la ardilla de cola roja?**

Los análisis filogenéticos efectuados aquí, así como los de otros autores, son contundentes al señalar que la ardilla de cola roja hace parte de un clado conformado por especies de origen centroamericano. Sin embargo, existen discrepancias respecto a las relaciones entre los miembros de este grupo, lo cual no permite inferir con claridad cuál es su especie hermana.

Hasta el momento se han incluido secuencias de la ardilla de cola roja en los análisis de cinco trabajos, todos ellos ofreciendo perspectivas diferentes sobre sus relaciones con otros taxa: **1.** En

el trabajo de Mercer y Roth (2003), quienes utilizaron una matriz con tres marcadores, *Microsciurus alfari* se recuperó como su especie hermana; **2.** En el de Villalobos y Gutiérrez-Espeleta (2014) se recuperó a *Sciurus aureogaster* usando solamente los datos del marcador *Cytb*, mientras que al usar cuatro marcadores se recuperó a *Syntheosciurus brochus*; **3.** En trabajo de Pecnerová (2011), también *M. alfari* se recuperó como su especie hermana, esto tras el análisis de una matriz de siete marcadores; **4.** En el presente trabajo, los análisis mitocondrial y combinado (*Cytb*+*IRBP*) arrojaron resultados contrastantes: en el primero de ellos, *Sciurus variegatoides* se recuperó como su especie hermana, mientras que en el segundo se recuperó a *M. alfari*, en ambos casos con alto soporte estadístico; **5.** Pecnerová *et al.* (2015) han sido los únicos autores en incluir en sus análisis filogenéticos a la especie centroamericana *Sciurus colliaei*, la cual recuperaron como hermana de la ardilla de cola roja.

Aunque la mayoría de estos trabajos señalan que *Microsciurus alfari* es la especie hermana de la ardilla de cola roja, esta relación podría considerarse como atípica si se tiene en cuenta que ambas han sido asignadas históricamente a géneros diferentes, esto con base en la morfología. Por un lado, *Microsciurus alfari*, exhibe las características que definen su género, como el tamaño pequeño, orejas cortas, cola poco peluda y dos premolares en el maxilar (de Vivo y Carmignotto, 2015). En cambio, la ardilla de cola roja tiene un mayor tamaño, orejas más largas, cola más peluda y un solo premolar en el maxilar, características más afines a las de los miembros del género *Sciurus* (Thorington *et al.*, 2012). A pesar de este contraste, Villalobos y Cervantes-Reza (2007) encontraron que ambas especies comparten otras características que no habían sido tenidas en cuenta previamente. En el marco de un análisis de parsimonia, estos autores también recuperan una relación de hermandad entre las dos, la cual está soportada por la presencia de un canal entre el premolar superior 4 (P4) y el molar superior 1 (M1), a la altura de la placa zigomática.

De acuerdo con todo lo anterior, existen diferentes líneas de evidencia que sugieren que *Microsciurus alfari* podría ser la especie hermana de la ardilla de cola roja. Sin embargo, es posible que la caracterización molecular de otras especies centroamericanas (p. ej. *Sciurus richmondi*, *S. colliaei*) ofrezca en un futuro una perspectiva diferente.

**Variación genética mitocondrial en la ardilla de cola roja, “*Notosciurus granatensis*”, e implicaciones taxonómicas:**

La caracterización realizada en el presente trabajo a lo largo de la distribución de la ardilla de cola roja permitió generar el conjunto de datos moleculares más completo hasta la fecha de una especie neotropical dentro de la tribu Sciurini. Esto implica una gran cantidad de secuencias, especialmente de marcadores mitocondriales, correspondientes a individuos de diferentes procedencias geográficas, de diferentes fenotipos y de diferentes subespecies. Debido a que se trata de uno de los taxa con mayor espectro fenotípico en toda la familia Sciuridae, y posiblemente el más politípico, este trabajo constituye una ventana importante para comprender aspectos de la variación intraespecífica, sus causas asociadas, e incluso sus implicaciones taxonómicas. Además de esto, la amplia distribución de la especie y su presencia en numerosos ecosistemas del Neotrópico (Nitikman, 1985), ofrecen una oportunidad para responder cuestiones relacionadas a su historia de diversificación en la región. Un esfuerzo similar solo se ha realizado con la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), distribuida en Eurasia, la cual se puede considerar como el miembro mejor estudiado dentro de la tribu Sciurini (p. ej. Grill *et al.*, 2009). En el Nuevo Mundo, por otra parte, solo especies como la ardilla gris oriental, *Sciurus carolinensis* y la ardilla zorro oriental, *Sciurus niger*, han sido medianamente caracterizadas a nivel molecular, existiendo una cantidad relativamente buena de secuencias de diferentes marcadores depositadas en bases de datos públicas, pero muchos vacíos en su conocimiento.

Quizás uno de los hallazgos más importantes a partir de los marcadores mitocondriales tiene que ver con la fuerte estructuración a la que está sujeta la variación genética de la ardilla de cola roja. La totalidad de los análisis efectuados señalan un patrón común en el que esta variación se puede discretizar en cuatro grandes grupos o linajes a lo largo del rango distribucional de la especie, los cuales tienen cierta tendencia geográfica: **1. Clado A:** el primero de ellos alberga los haplotipos correspondientes a individuos originarios de las tierras bajas del norte de Colombia, los flancos sur y occidental de la Sierra Nevada de Santa Marta, la base suroccidental de la Serranía del Perijá y el norte de la cuenca media del Río Magdalena; **2. Clado B:** el segundo reúne los haplotipos de individuos provenientes de la porción norte del rango distribucional de la especie, en Centroamérica, así como de las tierras bajas del Chocó biogeográfico, las Cordilleras Occidental y Central, y las tierras bajas al norte de la Cordillera Occidental, en Colombia; **3. Clado C:** el tercero contiene haplotipos de localidades asociadas a la Cordillera Oriental colombiana, especialmente en su flanco occidental, así como de la región del Catatumbo y las tierras bajas de la cuenca del río Zulia, en límites con Venezuela; **4. Clado D:** el cuarto, por su parte, engloba haplotipos de individuos recolectados principalmente en la cuenca media del Magdalena, a lado y lado del cauce del río.

Las redes haplotípicas reconstruidas, tanto para el *Cytb* como para el *D-loop*, además de que son consistentes al mostrar que estos grupos no comparten haplotipos entre sí, también revelan que están separados hasta por 45 pasos mutacionales, lo que en últimas sugiere que ha habido una diferenciación profunda subyacente. En todas las topologías obtenidas en los análisis filogenéticos con estos marcadores, los cuatro grupos “geográficos” se evidencian como clados con alto soporte estadístico, los cuales han sido el resultado de tres grandes eventos de bifurcación sucesivos desde la llegada de la especie a Sudamérica. Las dataciones realizadas señalan que el primero de estos

eventos sucedió hace aproximadamente 1,9 millones de años, en la edad Gelasiense del Pleistoceno, originando inicialmente dos grandes linajes. Posteriormente, hace más o menos 1.5 millones de años, en la edad Calabriense del Pleistoceno, uno de estos grandes linajes dio origen a los clados C (Cordillera Oriental de Colombia) y D (Valle del Magdalena), mientras que unos miles de años después, también en el Calabriense, el segundo gran linaje dio origen a los clados A (Norte de Colombia) y B (Centroamérica y Occidente de Colombia). El hecho de que estas divergencias se remonten hasta el Pleistoceno, época a la que se le atribuye una gran influencia en los procesos de especiación del Neotrópico (Rull, 2006), es una evidencia contundente de que los linajes encontrados dentro de *Notosciurus granatensis* representan unidades evolutivas con posibles historias independientes. El aislamiento genético al que han estado sujetas estas unidades ha sido suficiente para acumular distancias entre sí, por lo menos a nivel del marcador *Cytb*, superiores a las distancias promedio que se han reportado dentro de varias especies de roedores (Bradley y Baker, 2000), incluyendo otras ardillas, además de que llegan a superar incluso las distancias que separan especies hermanas dentro de la tribu Sciurini.

De acuerdo con todo lo anterior, un esquema de cuatro unidades evolutivas dentro de la ardilla de cola roja es discordante con las hipótesis taxonómicas que se han planteado para organizar la variación dentro de esta especie (Nitikman, 1985; Thorington y Hoffmann, 2005; Thorington *et al.*, 2012; de Vivo y Carmignotto, 2015). En la más ampliamente aceptada, Thorington *et al.* (2012) reconocen la existencia de 32 subespecies a lo largo de su rango distribucional, mientras que, en la más reciente, de Vivo y Carmignotto (2015) reconocen seis. Estas hipótesis se han basado casi que exclusivamente en patrones de coloración del pelaje, y en menor medida en el tamaño, tendencia que se repite también en muchas otras especies de Sciurini. En este sentido, los resultados del presente trabajo podrían demostrar que, en las ardillas de esta tribu, las diferencias

en estas características no son necesariamente un reflejo de rupturas genéticas. Los análisis de varianza molecular (AMOVA) realizados muestran claramente que dentro de la ardilla de cola roja hay una fuerte estructuración genética, pero que la mayor parte de la variación se recoge en los cuatro “linajes geográficos” y no en los 32 o seis grupos que se plantean en estas propuestas taxonómicas. Prácticamente ninguna de las subespecies allí reconocidas se recupera como un grupo discreto en todos los análisis efectuados, sino que, por el contrario, varias de estas subespecies pueden estar mezcladas dentro de un mismo linaje. Por ejemplo, los clados A y B pueden albergar cada uno hasta cinco de las diferentes subespecies propuestas por Thorington *et al.* (2012), y el clado B puede albergar hasta tres de las que proponen de Vivo y Carmignotto (2015), todas variables en coloración, pero sin diferencias genéticas entre ellas. Si se tienen en cuenta que las subespecies de *Notosciurus granatensis* descritas hasta la fecha no son más que variantes fenotípicas, es posible afirmar que la taxonomía de la especie ha estado sesgada, es decir, no refleja la realidad evolutiva. Esto implica que los caracteres que se han usado como base, y por ende las descripciones de los autores de las diferentes propuestas, realmente no permiten diagnosticar grupos naturales.

Este problema no es exclusivo de la ardilla de cola roja, sino que permea en general la taxonomía intra y supra-específica de Sciurini, así como la taxonomía de otros grupos de mamíferos neotropicales. Entre los años 1700's y 1900's era común que llegaran numerosos especímenes de esta región, o de otras, a los grandes museos del mundo, lo que produjo una impresionante proliferación de nuevos taxa. Debido a las limitaciones metodológicas en estas épocas, las descripciones de géneros, especies y subespecies solían basarse en escasos caracteres, principalmente relacionados con el tamaño y la coloración del pelaje (Koprowski *et al.*, 2016). La mayoría de las subespecies de la ardilla de cola roja dentro de la propuesta taxonómica más

aceptada (Thorington *et al.*, 2012) fueron descritas entre 1811 y 1984 (de Vivo y Carmignotto, 2015) exclusivamente con base en este tipo de caracteres. Prácticamente ninguna de estas descripciones ha involucrado el análisis de rasgos cuantitativos, y por supuesto, los métodos moleculares no estaban disponibles en esos tiempos. Por tal razón, no es sorprendente que en el presente trabajo se haya evidenciado una total desconexión o incongruencia entre la membresía subespecífica y los linajes molecularmente definidos. Las propuestas evaluadas aquí no son más que un resumen de una larga historia taxonómica en torno a la ardilla de cola roja, la cual incluye la descripción de muchas más variantes fenotípicas que con el tiempo han sido sinonimizadas con otras (de Vivo y Carmignotto, 2015). Según esto, se podría decir que esta especie es un claro ejemplo de lo que Wilson y Brown (1953) llamaron una proliferación desenfrenada de epítetos subespecíficos, lo cuales en últimas resultan ineficientes, arbitrarios, e incluso la raíz de un caos nomenclatural.

Debido a que el tamaño corporal y la coloración del pelaje pueden mostrar respuestas plásticas frente a factores ambientales, es preciso descartar estos caracteres en la búsqueda de una reestructuración de la taxonomía de Sciurini (Caro, 2005; Koprowski *et al.*, 2016).

### **La ardilla de cola roja, ¿una, o cuatro especies?**

Uno de los grandes problemas de la taxonomía es que los límites entre especies pueden diferir drásticamente dependiendo del concepto que se aplique (de Queiroz, 2007). Por tal razón, se ha hecho un gran énfasis en la búsqueda de un concepto unificado que reconcilie todos los puntos de vista y que esté basado principalmente en el origen evolutivo de las especies (Phuong *et al.*, 2014). Según el concepto de linajes, la única propiedad necesaria y suficiente para que una entidad constituya una especie es que corresponda a un linaje que está evolucionando independientemente de otros linajes (de Queiroz, 2007). A lo largo del curso de su divergencia, este linaje va

adquiriendo propiedades que pueden ser cuantificadas por los investigadores y tomadas como evidencia de la existencia de dicha especie, tales como aislamiento reproductivo, monofilia, diferenciación morfológica, distancias genéticas, etc (de Queiroz, 2007). Aunque cualquiera de estas fuentes de evidencia puede utilizarse para plantear una hipótesis inicial, ninguna puede considerarse individualmente como mejor que otra. En este sentido, la acumulación de múltiples líneas de evidencia a partir de diferentes conjuntos de datos representa el camino óptimo para revelar la evolución independiente de un linaje y para diagnosticarlo y clasificarlo como una especie (Phuong *et al.*, 2014).

Bajo este razonamiento, los resultados de los diferentes análisis del presente trabajo constituyen un conjunto de evidencias suficientes para la formulación de una nueva hipótesis taxonómica en torno a la ardilla de cola roja. La taxonomía actual de esta ardilla se basa en una pobre diagnosis morfológica (concepto morfológico o tipológico de especie), la cual no refleja en lo más mínimo la realidad evolutiva. Se propone entonces que sean reconocidas cuatro especies en lugar de una y que las subespecies “fenotípicas” sean utilizadas solamente con fines comunicativos (Defler, 2000), reconociéndose que no representan unidades evolutivas independientes. Lo anterior se basa en los siguientes argumentos:

1. Según la totalidad de los análisis filogenéticos, usando marcadores que ofrecen resolución de eventos recientes de divergencia (mitocondriales), o eventos más antiguos (nucleares), la ardilla de cola roja, como está definida en las propuestas taxonómicas más aceptadas (Nitikman, 1985; Thorington *et al.*, 2012), representa cuatro grupos monofiléticos con alto soporte estadístico. Ninguno de estos grupos coincide con las subespecies reconocidas por diferentes autores para esta ardilla (Thorington *et al.*, 2012; de Vivo y Carmignotto, 2015).

2. Estos cuatro grupos no comparten haplotipos mitocondriales entre sí y están separados por numerosos pasos mutacionales, tanto para el marcador *Cytb*, como para el *D-loop*.
3. La variación genética mitocondrial en todo el rango de la ardilla de cola roja muestreado se reparte mejor en estos cuatro grupos que en otros niveles jerárquicos.
4. Estos cuatro grupos llevan una historia evolutiva independiente desde el Pleistoceno, hace aproximadamente 1.5 millones de años, época que ha sido asociada a múltiples eventos de especiación en mamíferos neotropicales.
5. Este tiempo de separación ha propiciado que entre estos cuatro grupos se acumulen distancias del *Cytb* hasta del 10 %, valor que está muy por encima de las distancias intraespecíficas típicas de otras especies de Sciurini y de la distancia intraespecífica promedio reportada para roedores en general (Bradley y Baker, 2001). Incluso, este valor llega a estar por encima de las distancias interespecíficas entre especies hermanas de la tribu.

La información molecular ha probado ser eficiente en la detección de diversidad críptica, principalmente en géneros o especies de ardillas de otras tribus diferentes a Sciurini (Phuong *et al.*, 2015; Arbogast *et al.*, 2017). El único trabajo hasta el momento en el que se usó este tipo de evidencia para sustentar un cambio radical en la taxonomía de algún miembro de esta tribu fue el de Wauters *et al.* (2017). Estos autores toman las distancias genéticas a nivel de los marcadores *Cytb* y *D-loop* como un indicador de la divergencia entre la población de *Sciurus vulgaris* de Calabria (Italia), y las poblaciones del resto de Europa. Con valores tan bajos como un 2.6 % y 6.7 %, para cada uno de estos marcadores, proponen entonces que las ardillas de Calabria deberían tratarse como una especie aparte, a la que llaman *Sciurus meridionalis*. Partiendo de la referencia de este trabajo, la propuesta taxonómica para la ardilla de cola roja planteada aquí, que se basa en

distancias hasta del 10 % en el *CytB*, además de los restantes argumentos mencionados anteriormente, parece plausible bajo un marco comparativo.

### **Una nueva propuesta taxonómica para la ardilla de cola roja:**

Tal y como se mencionó anteriormente, el marco filogenético del presente trabajo y el de trabajos previos señalan que todos los géneros en los que se ha incluido la ardilla de cola roja son parafiléticos (p. ej. Pecnerová *et al.*, 2015). A la espera de una revisión y reestructuración de la taxonomía de la tribu Sciurini, las cuatro especies que se proponen aquí seguirán siendo asignadas al género *Notosciurus*, según las apreciaciones de de Vivo y Carmignotto (2015).

#### **1. Especie 1 (Clado A): *Notosciurus granatensis* (Humboldt, 1811)**

Este clado debe recibir el nombre asignado a la especie en la descripción original realizada por Humboldt en 1811, ya que dentro de él se recuperan individuos recolectados cerca de la localidad tipo y que redimen todas las características dadas por el autor.

**Localidad tipo:** Cartagena, departamento de Bolívar, Colombia.

**Distribución (Figura 22):** Tierras bajas de la región Caribe en el norte de Colombia, Sierra Nevada de Santa Marta, valle del Río Cesar, flanco occidental de la Serranía del Perijá y porción norte de la cuenca media del Magdalena; prácticamente desde el nivel del mar hasta unos 1200 m de elevación. Departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, La Guajira y Magdalena.

**Hábitats:** Según el mapa de ecosistemas terrestres del planeta (Olson *et al.*, 2001), *Notosciurus granatensis* estaría presente en el Matorral seco de La Guajira-Barranquilla, Bosque Montano de Santa Marta, Bosque seco del valle del Sinú, Bosque Montano del valle del Magdalena y Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.

**Descripción (Figura 23):** Se requiere de una descripción morfológica detallada en la que se incluyan posibles caracteres diagnósticos. Algunas de las medidas son: **Longitud Cabeza Cuerpo**

= 200-285 mm: **Longitud de la Cola** = 187-269 mm; **Pata Posterior** = 54-65 mm; **Oreja** = 26-36 mm. Esta especie presenta una amplia variación fenotípica en cuanto a la coloración del pelaje y el tamaño. Los individuos más pequeños se encuentran en las poblaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta y la Serranía del Perijá, mientras que los más grandes se encuentran en las poblaciones de las tierras del noroccidente, cerca de la localidad tipo, y del valle del Río Cesar. Se pueden encontrar poblaciones en las que predomina un tono rojizo o anaranjado brillante y uniforme en la región dorsal y la cola, y otras en las que estas partes del cuerpo se vuelven más oscuras por una entremezcla con pelos negros, sobre todo en la región posterior del dorso. El vientre por lo general es totalmente blanco, lo cual sería una característica fenotípica distintiva de esta especie.

**Sinónimos:** se listan solo los nombres de las subespecies reconocidas en las propuestas de Thorington *et al.*, (2012) y de de Vivo y Carmignotto (2015), y de las cuales se incluyeron muestras en el presente trabajo:

- *Sciurus granatensis granatensis* (Humboldt, 1811)
- *Sciurus granatensis splendidus* (Gray, 1842)
- *Sciurus granatensis saltuensis* (Bangs, 1898)
- *Sciurus granatensis bondae* (Allen, 1899)
- *Sciurus granatensis agricolae* Hershkovitz, 1947
- *Sciurus granatensis perijae* Hershkovitz, 1947
- *Notosciurus granatensis granatensis*: de Vivo y Carmignotto, 2015

**Comentarios:** En su revisión de las ardillas de Sudamérica, incluyendo el “complejo *granatensis*”, Allen (1915) reconoció que las poblaciones del norte se distinguen de otras poblaciones del resto de la distribución por poseer el vientre blanco. De acuerdo con esto, el autor las reúne bajo una misma especie, *Mesosciurus saltuensis*.

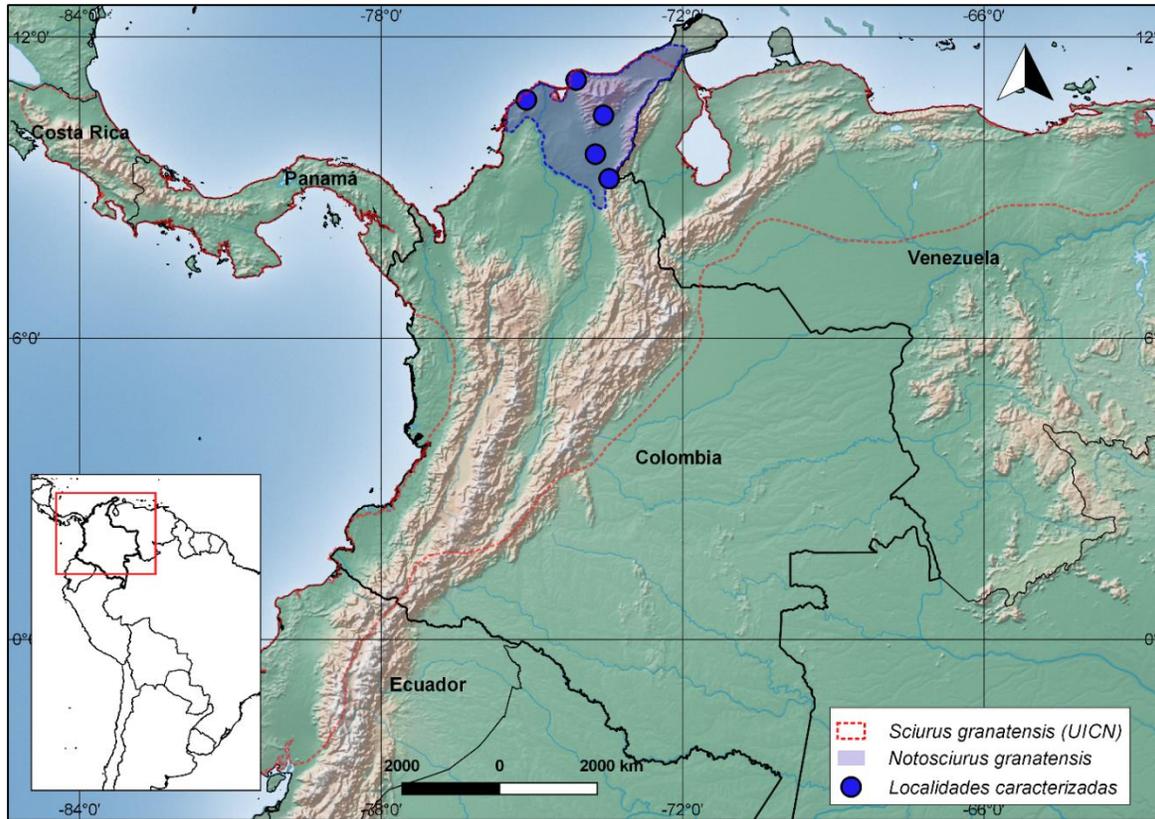


Figura 22. Distribución hipotética de la especie *Notosciurus granatensis*



Figura 23. Individuos de *Notosciurus granatensis* de diferentes poblaciones y con diferentes fenotipos..

Se aprecia que la región ventral es de color blanco, característica distintiva de esta especie. **a.** tomada de <http://colombia.inaturalist.org/taxa/46010-Sciurus-granatensis>. Fenotipo característico de *Sciurus granatensis bondae* (Thorington *et al.*, 2012) en poblaciones de Minca, Santa Marta, Magdalena. **b.** Elson Meneses Pelayo. Fenotipo característico de *Sciurus granatensis splendidus* (Thorington *et al.*, 2012) en un individuo cautivo en el Jardín Botánico Eloy Valenzuela, Floridablanca, Santander.

## 2. Especie 2 (Clado B): *Notosciurus gerrardi* (Gray, 1861)

El epíteto específico que se le da a este clado es el más antiguo disponible. Fue acuñado por Gray en 1861 para referirse, posiblemente, a las poblaciones de la ardilla de cola roja en cercanías de Medellín, Antioquía (Allen, 1915). Algunos de los individuos que se recuperan dentro de este clado redimen las características típicas de dichas poblaciones.

**Localidad tipo:** Redefinida por Allen (1915) como Antioquia, Colombia, posiblemente cerca de Medellín.

**Distribución (Figura 24):** Sur de Nicaragua, Costa Rica, Panamá, tierras bajas del Chocó Biogeográfico de Colombia, cordilleras Occidental y Central de Colombia, y tierras bajas al norte de la cordillera Occidental de Colombia, prácticamente desde el nivel del mar, hasta unos 1850 m. En Colombia estaría presente en los departamentos de Antioquia, Caldas, Chocó, Córdoba, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca.

**Hábitats:** *Notosciurus gerrardi* posiblemente ocupa el bosque montano de Talamanca en Costa Rica, el Bosque Húmedo Istmio-Atlántico en Panamá, y el Bosque Montano de Valle del Magdalena, Bosque Andino Montano del Noroccidente, Bosque Montano del Valle del Cauca, Bosque Húmedo del Chocó-Darién y Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá, en Colombia.

**Descripción (Figura 25):** Se requiere de una descripción morfológica detallada en la que se incluyan posibles caracteres diagnósticos. Algunas de las medidas son: **Longitud Cabeza Cuerpo** = 208-255 mm; **Longitud de la Cola** = 172-236 mm; **Pata Posterior** = 51-64 mm. Esta especie es aún más variable en cuanto a coloración del pelaje y tamaño que *Notosciurus granatensis*. Los individuos de menor tamaño se encuentran en las poblaciones de las montañas de Costa Rica y las que están asociadas a las cCordilleras Occidental y Central en Colombia, mientras que los más grandes se encuentran en las tierras bajas de Panamá y del Chocó Biogeográfico de Colombia. En

las poblaciones de las montañas de Costa Rica y algunas de las cordilleras Occidental y Central de Colombia, predomina una coloración café amarillenta más o menos uniforme en la región dorsal, mientras que la región ventral puede ser de una tonalidad naranja clara u ocrácea. En las poblaciones de Panamá y tierras bajas del Chocó Biogeográfico y cordillera Occidental y Central de Colombia suele manifestarse una línea media dorsal oscura. En las poblaciones de las tierras bajas del Chocó colombiano la coloración es más variable y destaca la presencia de tonalidades rojizas en los hombros y zona escapular, así como un vientre usualmente rojizo y en ocasiones con líneas o manchas blancas.

**Sinónimos:** se listan solo los nombres de las subespecies reconocidas en las propuestas de Thorington *et al.*, (2012) y de de Vivo y Carmignotto (2015), y de las cuales se incluyeron muestras en el presente trabajo:

- *Sciurus granatensis gerrardi* (Gray, 1861)
- *Sciurus granatensis hoffmanni* (Peters, 1863)
- *Sciurus granatensis morulus* (Bangs, 1900)
- *Sciurus granatensis chiriquensis* (Bangs, 1902)
- *Sciurus granatensis quindianus* (Allen, 1914)
- *Notosciurus granatensis granatensis*: de Vivo y Carmignotto, 2015
- *Notosciurus granatensis morulus*: de Vivo y Carmignotto, 2015
- *Notosciurus granatensis hoffmanni*: de Vivo y Carmignotto, 2015

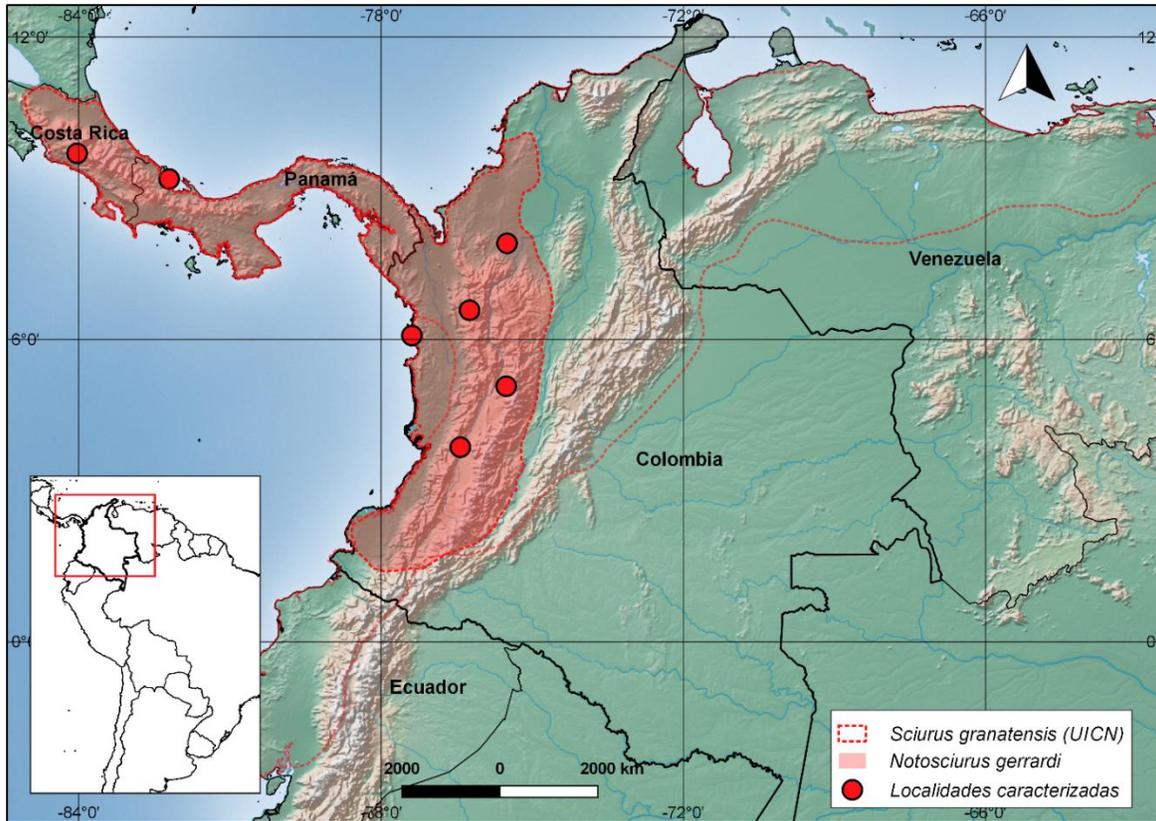


Figura 24. Distribución hipotética de la especie *Notosciurus gerrardi*



Figura 25. Individuos de *Notosciurus gerrardi* de diferentes poblaciones y con diferentes fenotipos.

**a.** tomada de <http://colombia.inaturalist.org/taxa/46010-Sciurus-granatensis>. Fenotipo característico de *Sciurus granatensis morulus* (Thorington *et al.*, 2012) en una población de Bahía Solano, Chocó. **b.** tomada de <http://colombia.inaturalist.org/taxa/46010-Sciurus-granatensis>. Fenotipo característico de *Sciurus granatensis quindianus* (Thorington *et al.*, 2012) en una población de Calarcá, Quindío. Nótese la línea media dorsal oscura en ambos especímenes, la cual suele aparecer en poblaciones de esta especie.

### 3. Especie 3 (Clado C): *Notosciurus chrysueros* (Pucheran, 1845)

El epíteto específico que se le da a este clado es el más antiguo disponible. Fue acuñado por Pucheran en 1845 para referirse a las poblaciones de la ardilla de cola roja en cercanías de Bogotá, Cundinamarca (Allen, 1915). Algunos de los individuos que se recuperan dentro de este clado redimen las características típicas de dichas poblaciones.

**Localidad tipo:** Santafé de Bogotá, Colombia

**Distribución (figura 26):** a lo largo de la cordillera Oriental de Colombia; en el departamento de Santander se puede encontrar en la cuenca media del Magdalena, en el margen derecho del caudal del río, principalmente hacia el flanco occidental de la cordillera Oriental. También está presente en la región del Catatumbo y las tierras bajas de la cuenca del Río Zulia, en límites con Venezuela; desde los 87 hasta los 2144 m. En los departamentos de Cundinamarca, Norte de Santander, Santander; posiblemente en Boyacá.

**Hábitats:** *Notosciurus chrysueros* se encuentra en el Bosque Montano del Valle del Magdalena, Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá, Bosque Húmedo del Catatumbo y Bosque Montano de la cordillera Oriental.

**Descripción (figura 27):** Se requiere de una descripción morfológica detallada en la que se incluyan posibles caracteres diagnósticos. Algunas de las medidas son: **Longitud Cabeza Cuerpo** = 190-245 mm; **Longitud de la Cola** = 170-228 mm; **Pata Posterior** = 50-62 mm; Longitud Oreja = 25-30 mm. Esta especie presenta una notable variación en tamaño, y en menor medida en coloración del pelaje. Los individuos de menor tamaño se encuentran en las poblaciones de zonas altas de Cundinamarca, y posiblemente en Boyacá, mientras que los individuos de mayor tamaño se encuentran en las poblaciones entre el río Magdalena y el flanco occidental de la cordillera Oriental, en la cuenca media del río, en el departamento de Santander. A lo largo de la distribución

conocida de la especie predomina una tonalidad café-olivácea, más o menos uniforme en la región dorsal. En algunas poblaciones la región entre los hombros puede ser de una tonalidad anaranjada, pálida o brillante. El vientre suele ser rojizo o anaranjado (pálido o brillante), usualmente con líneas blancas en axilas o pecho. Las poblaciones del Catatumbo son muy oscuras, casi negras, y representan el fenotipo más melánico en todo el rango geográfico del complejo *granatensis*.

**Sinónimos:** se listan solo los nombres de las subespecies reconocidas en las propuestas de Thorington *et al.*, (2012) y de de Vivo y Carmignotto (2015), y de las cuales se incluyeron muestras en el presente trabajo:

- *Sciurus granatensis chrysueros* (Pucheran, 1845)
- *Sciurus granatensis meridensis* (Thomas, 1901)
- *Sciurus granatensis zuliae* (Osgood, 1910)
- *Sciurus granatensis maracaibensis* Hershkovitz, 1947
- *Sciurus granatensis tarrae* Hershkovitz, 1947
- *Notosciurus granatensis chrysueros*: de Vivo y Carmignotto, 2015

**Comentarios:** Las poblaciones de esta especie localizadas en las zonas altas de Cundinamarca y Boyacá son bastante particulares en cuanto a coloración del pelaje y tamaño, lo que las hace distinguirse claramente de las restantes poblaciones del complejo *granatensis*. Por tal razón, la primera vez que se acuñó el epíteto *chrysueros* fue para referirse a las ardillas de Bogotá como una especie diferente (de Vivo y Carmignotto, 2015).

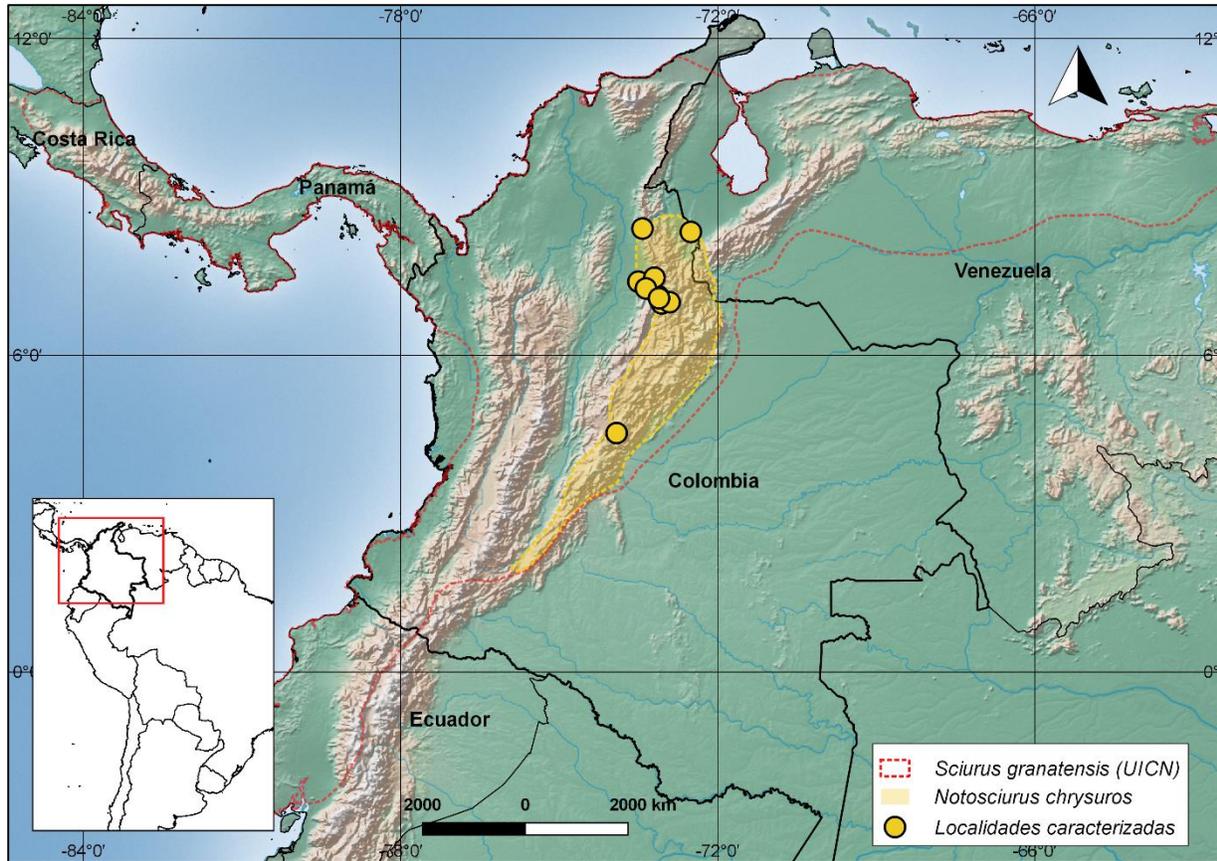


Figura 26. Distribución hipotética de la especie *Notosciurus chrysuros*.



Figura 27. Individuos de *Notosciurus chrysuros* de diferentes poblaciones.

**a** y **b**. tomadas de <http://colombia.inaturalist.org/taxa/46010-Sciurus-granatensis>. Fenotipo característico de *Sciurus granatensis chrysuros* (Thorington *et al.*, 2012) en poblaciones de Cundinamarca y Boyacá, respectivamente.

#### 4. Especie 4 (Clado D): *Notosciurus variabilis* Geoffroy, 1832

El epíteto específico que se le ha dado a este clado es el más antiguo disponible. Fue el segundo epíteto específico utilizado para referirse a ardillas provenientes de Colombia (Herskovitz, 1947). La procedencia del material original al que se le asignó este epíteto es dudosa, no obstante, Herskovitz (1947) encontró que la descripción original concuerda con las características que exhiben las poblaciones del municipio de La Gloria, Cesar. En el presente trabajo se incluyen individuos de dichas poblaciones, los cuales fueron recuperados dentro de este clado.

**Localidad tipo:** Redefinida por Herskovitz (1947) como La Gloria, Cesar; banco derecho del río Magdalena, unos 45 kilómetros arriba de la boca del río Cesar.

**Distribución (figura 28):** En la cuenca media del Magdalena y parte de la cuenca alta, entre el flanco oriental de la cordillera Central y el flanco occidental de la cordillera Oriental; desde los 66 hasta los 1809 m. En los departamentos de Bolívar, Cesar, Cundinamarca y Santander.

**Hábitats:** *Notosciurus variabilis* está presente en el Bosque Montano del Valle del Magdalena y el Bosque Húmedo del Magdalena-Urabá.

**Descripción (figura 29):** Se requiere de una descripción morfológica detallada en la que se incluyan posibles caracteres diagnósticos. Algunas de las medidas son: **Longitud Cabeza Cuerpo** = 229-249 mm; **Longitud de la Cola** = 211-242 mm; **Pata Posterior** = 58-61 mm; Longitud Oreja = 30-31 mm. Esta especie presenta una variación notable a lo largo de su distribución, en cuanto a la coloración del pelaje y el tamaño. Los individuos más grandes pueden encontrarse en las poblaciones de las zonas bajas del margen derecho del río Magdalena, a la altura del municipio de Barrancabermeja, en el departamento de Santander, mientras que los individuos más pequeños se pueden encontrar en las poblaciones situadas a mayor altitud, en el flanco occidental de la cordillera Oriental. Al norte de la distribución de la especie, a la altura del municipio de La Gloria,

en Cesar, las poblaciones tienen rasgos similares a los de las poblaciones de *Notosciurus granatensis*, con un dorso rojizo, abundante negro en la región posterior, y un vientre totalmente blanco. Esta región resulta interesante puesto que, de cuatro individuos recolectados en una misma localidad, tres fueron recuperados en el clado de *Notosciurus variabilis* y uno en el clado de *Notosciurus granatensis*. Es posible que allí se esté presentando algún fenómeno de hibridación entre individuos de ambas especies. Las restantes poblaciones de la especie se caracterizan por tener una coloración dorsal con un patrón agutí marcado (pelos bandeados), una tonalidad general café olivácea y un manto anaranjado en los hombros y la región escapular; el vientre es usualmente anaranjado (pálido o brillante), con líneas o puntos blancos entre la garganta y la zona inguinal o localizados en axilas o pecho.

**Sinónimos:** se listan solo los nombres de las subespecies reconocidas en las propuestas de Thorington *et al.*, (2012) y de de Vivo y Carmignotto (2015), y de las cuales se incluyeron muestras en el presente trabajo:

- *Sciurus granatensis variabilis* (Geoffroy, 1862)
- *Sciurus granatensis norosiensis* Hershkovitz, 1947
- *Notosciurus granatensis chrysuroides*: de Vivo y Carmignotto, 2015

**Comentarios:** a pesar de que la variación fenotípica de las ardillas de Colombia ha sido bien documentada (p. ej. Allen, 1915), y en especial en el norte del país por Hershkovitz (1947), las poblaciones las zonas bajas de la cuenca del Magdalena, en el margen del río derecho e inmediaciones del municipio de Barrancabermeja nunca habían sido caracterizadas. Por tal razón, estas poblaciones, que tienen características particulares (como el marcado tono anaranjado en hombros y zona escapular), no pudieron ser asignadas en el presente trabajo, mediante el fenotipo a ninguna de las subespecies que se han descrito históricamente dentro del complejo *granatensis*.

Esta especie posiblemente se puede encontrar en simpatría con *Notosciurus granatensis* al norte de su distribución, y con *Notosciurus chrysuros* a lo largo del flanco occidental de la Cordillera Oriental, lo que podría implicar casos de hibridación.

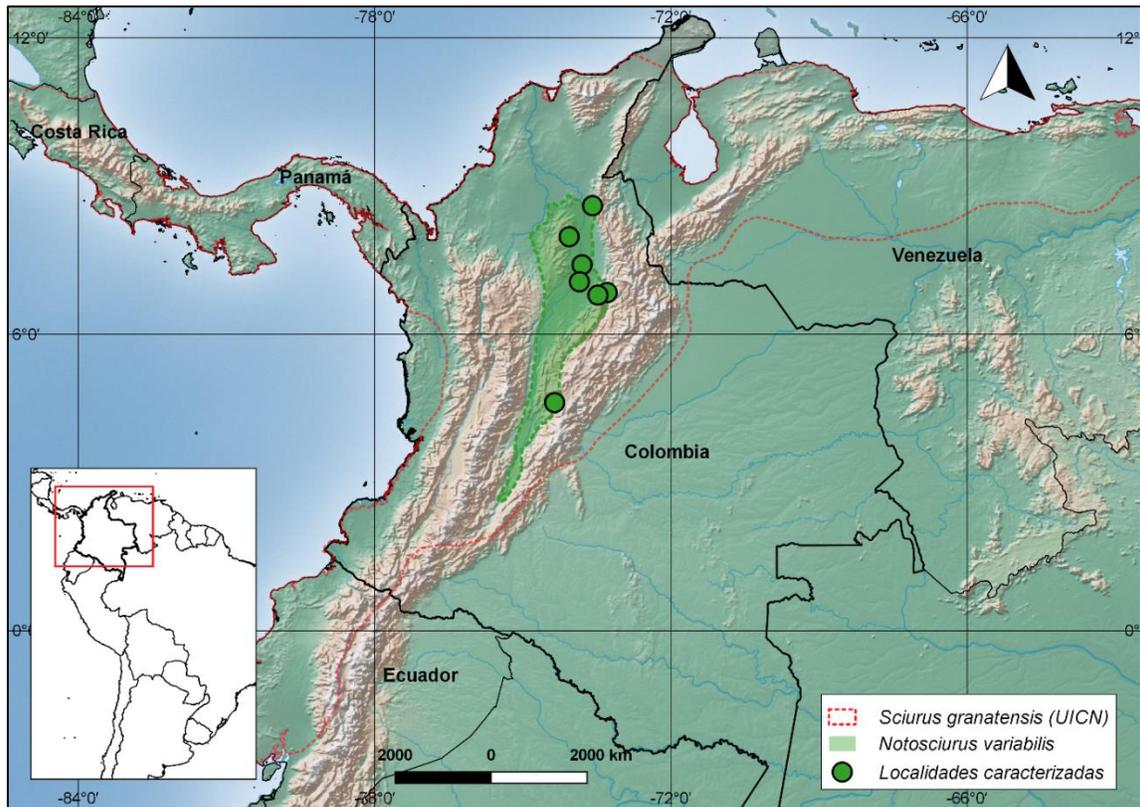


Figura 28. Distribución hipotética de la especie *Notosciurus variabilis*.



Figura 29. Individuos de *Notosciurus variabilis* de diferentes poblaciones..

**a y b.** tomadas de <http://colombia.inaturalist.org/taxa/46010-Sciurus-granatensis>. Los fenotipos de estas poblaciones, Barrancabermeja, Santander y San Antonio de Tequendama, Cundinamarca, respectivamente, no concuerdan con las descripciones de ninguna de las subespecies que se han reconocido históricamente dentro del complejo *granatensis*

### Historia evolutiva hipotética del “complejo *granatensis*”

Tal y como se mencionó anteriormente, la historia de diversificación del “complejo *granatensis*” tiene implicaciones importantes para descifrar el contexto evolutivo de toda la tribu Sciurini en el Neotrópico. Hasta el momento se hipotetizaba que las ardillas de este grupo llegaron a Sudamérica desde el norte mediante un único evento de dispersión (hace 5.6 millones de años según el presente trabajo), el cual seguramente fue propiciado por el establecimiento de una masa de tierra continua y cubierta de bosques a lo largo del istmo de Panamá (Mercer y Roth, 2003; Pecnerová *et al.*, 2015). No obstante, en el presente trabajo se establece por primera vez la existencia de un evento adicional, ocurrido mucho después por este mismo corredor, que permitió una recolonización desde Centroamérica por parte del ancestro común del “complejo *granatensis*”. Los análisis de datación efectuados sitúan este evento en un intervalo entre 4.78 y 2.53 millones de años (media de 3.2 m.a.), en el Plioceno, durante un periodo de tiempo en el que también hubo intercambio en sentido norte-sur, y viceversa, en otros grupos de vertebrados con requerimientos ecológicos similares a los de las ardillas. Jansa *et al.* (2013), por ejemplo, encontraron que el paso

de marsupiales de los géneros *Marmosa* y *Didelphis* desde Sudamérica a Centroamérica posiblemente sucedió hace unos 3.3 y 2.9 millones de años, respectivamente; Voss *et al.*, 2013 estiman que la llegada a Centroamérica desde Sudamérica por parte del ancestro del puercoespín *Coendou mexicana* pudo haber ocurrido hace 5 a 2.5 millones de años; Helgen *et al.* (2013) sugieren que la colonización de Centroamérica por parte de la especie de olingo *Bassaricyon medius* fue hace aproximadamente 1.0 millones de años; y Lynch-Alfaro *et al.* (2014) reportan que la llegada de varios géneros de primates a Centroamérica desde Sudamérica ocurrió entre 3.7 (*Alouatta*) y 1.0 (*Saimiri*) millones de años. Si se tiene en cuenta el carácter principalmente arbóreo de todos estos taxa, incluyendo las ardillas, se puede inferir que su desplazamiento en cualquier sentido a través del istmo de Panamá tuvo que darse bajo un paisaje dominado por bosques, probablemente muy similares a los que se encuentran hoy en día. La distribución transandina y altitudinal del “complejo *granatensis*” (hasta  $\pm$  2500 según Thorington *et al.*, 2012) respaldan la idea de una reciente colonización del norte de Sudamérica por parte de su ancestro. A su llegada a los ecosistemas de la región la cordillera Oriental ya alcanzaba sus elevaciones actuales, lo que muy seguramente restringió la dispersión hacia las tierras bajas del oriente (la región amazónica, por ejemplo) (Gregory-Wodzicki, 2000). Sin embargo, el hecho de que existan poblaciones asentadas en el flanco oriental de la cordillera (*Sciurus granatensis griseimembra*, en Villavicencio y alrededores) (Thorington *et al.*, 2012), evidencia que algunos individuos lograron sortear esta barrera, pero que posiblemente no prosperaron en la Amazonía debido a la competencia con otras ardillas (géneros *Guerlinguetus*, *Microsciurus* y *Hadroskiurus*, según de Vivo y Carmignotto, 2015). Esta dispersión hipotética pudo haber ocurrido a través de zonas de menor elevación a lo largo de la Cordillera Oriental, como, por ejemplo, el paso de Andalucía (Cadena *et al.*, 2016). De igual forma, las poblaciones que se encuentran en la región del

Catatumbo, tierras bajas de la cuenca del Zulia, alrededores del lago Maracaibo y el resto de Venezuela (no caracterizadas aquí), pudieron haber rodeado la cordillera Oriental por su extremo norte gracias a la existencia de bosques exuberantes en esta región durante periodos húmedos del Pleistoceno (Haffer, 1967).

Los análisis del presente trabajo sitúan la diversificación del “complejo *granatensis*” en el Pleistoceno, época durante la cual no ocurrieron eventos geológicos importantes en el norte de Sudamérica y la geografía era muy parecida a la que predomina actualmente (Defler, 2000). En cambio, hubo fluctuaciones climáticas drásticas asociadas a los periodos glaciares e interglaciares que alteraron los niveles del mar y las coberturas vegetales en el Neotrópico, fenómenos que se han asociado con la especiación en varios grupos de vertebrados (Haffer, 1967, Defler, 2000). Esto sugiere que la divergencia de los linajes o especies putativas que aquí se proponen fue modulada principalmente por factores de tipo ecológico-ambiental, lo cual se ve respaldado por el hecho de que sus rangos hipotéticos hoy en día no estén separados por barreras o accidentes del paisaje, tales como ríos, montañas, etc. La alternancia entre periodos secos y húmedos pudo haber desencadenado cambios en la distribución de los ecosistemas boscosos idóneos para las ardillas, lo cual en conjunto con introgresiones marinas periódicas posiblemente generó un efecto vicariante sobre la distribución continua del ancestro del “complejo *granatensis*”. Este patrón alopátrico, conocido como la hipótesis de refugios, ha sido propuesto también como uno de los principales causantes de la diversidad actual de otros mamíferos con hábitos arbóreos, principalmente primates (Defler, 2000).

Los eventos de divergencia que dieron origen a las cuatro especies dentro del “complejo *granatensis*” ocurrieron casi que simultáneamente hace aproximadamente 1.4 millones de años. Es posible que la separación entre estos linajes haya sido el resultado de dos factores típicos de un

periodo interglaciar seco: **1.** La expansión de ecosistemas áridos de tipo sabana, con la subsecuente contracción de los bosques húmedos tropicales (idóneos para las ardillas) (Haffer, 1967); **2.** IncurSIONES del mar Caribe y el océano Pacífico hacia varias zonas en el norte (llegando hasta la cuenca media del Magdalena) y el occidente de Colombia (Nores, 2004). Ambos factores debieron convertirse en barreras importantes que en últimas limitaron las condiciones idóneas para las ardillas a ciertos refugios, promoviendo entonces el aislamiento genético de diferentes poblaciones. *Notosciurus granatensis* pudo haberse originado a partir de poblaciones que quedaron aisladas en el norte de Colombia, incluyendo la Sierra Nevada de Santa Marta (refugio Santa Marta) (Prance, 1979), o en el extremo norte de las cordilleras Occidental y Central (refugio Nechí) (Haffer, 1967); *Notosciurus variabilis* a partir de poblaciones aisladas en parte del refugio Nechí (Haffer, 1967) o el refugio Río Magdalena (Prance, 1979); y *Notosciurus chrysueros* a partir de poblaciones que se refugiaron en ecosistemas de bosque andino o subandino de la cordillera Oriental y posiblemente también en los bosques de la región del Catatumbo (Refugio Catatumbo) (Haffer, 1967). En el caso de *Notosciurus gerrardi*, los resultados del presente trabajo revelan detalles adicionales sobre su historia evolutiva. Es posible que esta especie haya derivado de poblaciones aisladas en el refugio Nechí, al norte de las cordilleras Occidental y Central (Haffer, 1967), o en un gran refugio boscoso que se extendía por todo el Chocó biogeográfico de Colombia (parte del refugio Chocó), Panamá y parte de Costa Rica (**figura 30**). No obstante, un evento vicariante reciente revelado por los análisis biogeográficos, y que comenzó hace unos 0.5 millones de años, ha promovido una ligera separación genética entre el rango norte (Costa Rica y Panamá) y el rango sur (Colombia) de estas poblaciones. Puede que la razón de este patrón haya sido una nueva incursión del océano Pacífico, menos drástica que las sucedidas previamente, que inundó parte de Panamá (Nores, 2004).

Los conjuntos de datos mitocondriales de tres de las cuatro especies propuestas aquí exhiben valores negativos en análisis de neutralidad adicionales (D de Tajima), que no se muestran en la sección de resultados. Aunque en ningún caso las pruebas estuvieron asociadas con probabilidades significativas, esto en cierta medida sería un indicio de una reciente expansión demográfica de las poblaciones, en últimas consistente con la hipótesis de evolución a partir de refugios pleistocénicos. Para *Notosciurus granatensis* (norte de Colombia), particularmente, se obtuvieron valores de diversidad haplotípica y nucleotídica inferiores si se les compara con los de las otras tres especies del complejo, así como un valor positivo en la D de Tajima, lo que en conjunto podría considerarse como un rastro de un cuello de botella reciente. De acuerdo con los mapas de incursiones marinas de Nores (2004) y de refugios de Prance (1979), se puede hipotetizar que las poblaciones que dieron origen a esta especie debieron quedar aisladas en una franja boscosa casi que limitada a la Sierra Nevada de Santa Marta y alrededores, la cual posiblemente no tuvo la capacidad de albergar una gran cantidad de individuos. No obstante, el hecho de que la prueba de Tajima para este clado no fuese significativa, indica que estos resultados deben tomarse con precaución.

La hipótesis de refugios planteada aquí tiene un sustento adicional si se analiza la historia evolutiva de grupos con hábitos parecidos a los de las ardillas. Los primates del “complejo *Cebus albifrons*”, por ejemplo, exhiben un patrón filogenético muy similar al del “complejo *granatensis*”, en el cual los eventos de divergencia sucedieron también en el Pleistoceno (Martins-Junior *et al.*, 2018). Esto indicaría que ambos complejos fueron influenciados por los mismos cambios climáticos-ecológicos de esta época, y que posiblemente las especies que albergan hoy en día derivaron de poblaciones aisladas en los mismos remanentes boscosos que presentaron las condiciones acordes a sus hábitos arbóreos. Poblaciones aisladas en el refugio Santa Marta o parte

del Nechí (Haffer, 1967; Prance, 1979) pudieron dar origen a la especie *Cebus cesarae*, las poblaciones del refugio Río Magdalena (Prance, 1979) a la especie *Cebus versicolor*, las poblaciones del refugio Chocó o parte de Nechí (Haffer, 1967) a *Cebus capucinus*, y las poblaciones del refugio Catatumbo a *Cebus leucocephalus* (Rylands y Mittermeier, 2013).

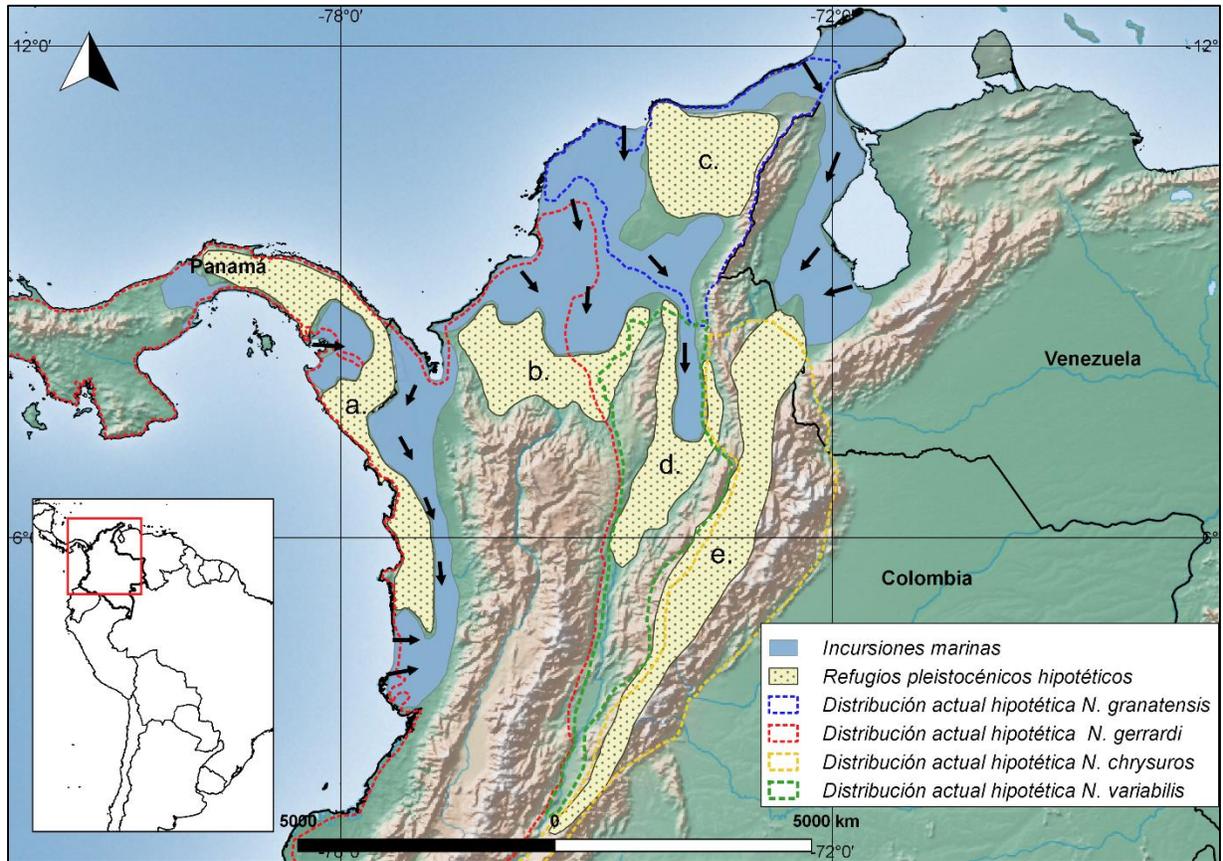


Figura 30. Refugios pleistocénicos hipotéticos que pudieron haber albergado las poblaciones ancestrales de las especies del “complejo granatensis”

Modificado a partir de Haffer (1967), Prance (1979) y Nores (2001). **a.** Parte del refugio Chocó (Haffer, 1967; Prance, 1979); **b.** Refugio Nechí (Haffer, 1967); **c.** Refugio Santa Marta (Prance, 1979); **d.** Parte del refugio Río Magdalena (Prance, 1979); **e.** Posible refugio en los bosques andinos de la Cordillera Oriental + parte del refugio Catatumbo (Prance, 1979).

### El *MCIR* y la coloración del pelaje en el “complejo *granatensis*”

La coloración del pelaje es uno de los rasgos fenotípicos más llamativos en los mamíferos, y uno de los más utilizados en la taxonomía del siglo anterior. Por tal razón, no es de sorprender que los grupos con mayor variación hayan inspirado propuestas en las que se nombran gran cantidad de unidades (especies o subespecies), aún a partir de ligeras diferencias, lo cual en últimas ha causado una explosión nomenclatural. En el Nuevo Mundo, y buena parte en el Neotrópico, existen algunos de los ejemplos más sorprendentes, incluso rozando los límites de la exageración: En el género *Thomomys* (topos de abazones), dentro de especies como *T. umbrinus*, *T. bottae* y *T. talpoides* se han llegado a describir 229, 133 y 54 subespecies, respectivamente, todas ellas diferenciables por cambios mínimos en la coloración del pelaje; en la especie *Dipodomys ordii* (ratón canguro) se han descrito hasta 32 subespecies; en *Microtus pennsylvanicus* (ratones de campo/campañoles) hasta 27 subespecies; en el género *Peromyscus* (ratones ciervo), dentro de las especies *P. maniculatus* y *P. leucopus* se han descrito 17 y 50 subespecies; en los conejos del género *Sylvilagus*, dentro de las especies *S. floridanus* y *S. brasiliensis* 31 y 19 subespecies, respectivamente; y en el género de primates *Cebus*, dentro del “complejo *C. albifrons*” se han llegado a describir hasta siete subespecies (Defler, 2000; Wilson *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2017); Las ardillas no se quedan atrás, y muchas especies exhiben patrones de coloración del pelaje sumamente variables. Algunos de los casos más extremos alrededor del mundo son: *Callosciurus erythraeus* (26 subespecies), *Glaucomys sabrinus* (25 subespecies), *Tamias minimus* (21 subespecies), *Heliosciurus rufobanchium* (21 subespecies), y dentro de la tribu Sciurini, *Tamiasciurus hudsonicus* (21 subespecies) y *Sciurus vulgaris* (22 subespecies) (Wilson *et al.*, 2017). El “complejo *granatensis*”, sujeto del presente estudio, posiblemente representa la ardilla con mayor variación fenotípica en todo el mundo, por lo que es el miembro más politípico de la

familia Sciuridae con hasta 32 subespecies reconocidas actualmente (Thorington *et al.*, 2012). Muchas de estas subespecies se distribuyen entre Ecuador, Venezuela, y la mayoría en Colombia (hasta 15), por lo que podría considerarse también uno de los mamíferos sudamericanos más polítipos.

A pesar de que se ha documentado muy bien la variación en algunos de los grupos mencionados, y de que se han discretizado todas estas unidades fenotípicas, principalmente subespecies, son pocos los esfuerzos que se han hecho para comprender la raíz de los cambios en la coloración del pelaje. De acuerdo con esto, aunque el fenotipo constituye una excelente oportunidad para dilucidar aspectos sobre la evolución de las especies en diferentes latitudes, altitudes, ecosistemas y ambientes, solo con el advenimiento de la era molecular es que se han podido responder algunas preguntas relacionadas (Nigenda-Morales *et al.*, 2017). Las primeras preguntas se han abordado desde una perspectiva taxonómica y sistemática, mediante el uso predominante de marcadores neutrales. Existen numerosas investigaciones en las que se han tratado de relacionar las diferencias genéticas en estos marcadores con las diferencias que existen entre subespecies o especies, es decir, establecer si las variantes fenotípicas constituyen linajes con historias independientes (Wilson *et al.*, 2017). En la mayoría de los grupos mencionados anteriormente se han realizado este tipo de acercamientos (Wilson *et al.*, 2017). No obstante, son contados los casos en los que se ha intentado descifrar los cambios concretos que causan la variación fenotípica mediante el uso de marcadores directamente involucrados en la maquinaria que altera la coloración del pelaje, y con esto abordar algunas preguntas desde el punto de vista evolutivo. Los pocos trabajos disponibles se han enfocado en grupos de roedores pequeños, principalmente en Norteamérica (*Thomomys umbrinus*, *Peromyscus polionotus*, *Chaetodipus intermedius*) (Wlasiuk y Nachman, 2007; Mullen *et al.*, 2009; Hoekstra y Nachman, 2003,

respectivamente), y solo uno en Sudamérica (género *Ctenomys*; Goncalves *et al.*, 2012). En cuanto a las ardillas, la información disponible es aún más escasa, y proviene del estudio de tan solo tres especies, todas de la tribu Sciurini (*Sciurus carolinensis*, *S. niger* y *S. vulgaris*; McRobie *et al.*, 2009; McRobie *et al.*, 2014). Las dos primeras son especies con una variación fenotípica ligera, mientras que la última, así como el “complejo *granatensis*”, representa uno de los taxa más politépicos de la tribu y de la familia Sciuridae en general. A pesar de esto, en el trabajo en el que se abordaron cuestiones sobre la variación en el pelaje de esta especie se incluyeron escasas muestras que no representan todo el rango de patrones que se observan (McRobie *et al.*, 2014).

De acuerdo con todo lo anterior, el presente trabajo constituye una de las pocas iniciativas para estudiar la amplia variación fenotípica en un mamífero sudamericano desde dos perspectivas: una taxonómica, mediante marcadores neutrales, y otra evolutiva, mediante marcadores candidatos que influyen directamente en la coloración del pelaje (no neutrales o sujetos a selección). En ardillas, particularmente, se trata del tercer trabajo en el que se utilizan este tipo de marcadores no neutrales, no obstante, se trata del primero en el que se caracterizan individuos que representan un amplio rango de fenotipos, y que provienen de diferentes localidades y ecosistemas.

Las secuencias obtenidas demuestran que el gen *MC1R*, que consta de un solo exón, está conformado por 945 pares de bases en las ardillas del “complejo *granatensis*”. La longitud de este marcador es equivalente a la de otras especies de Sciurini (*Sciurus vulgaris*, *S. niger*, *S. carolinensis*), y permite la codificación de una proteína de 314 aminoácidos (McRobie *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que la longitud consenso del *MC1R* en vertebrados es de 954 pares de bases (Wlasiuk y Nachman, 2007), esta información sugiere que los miembros de la tribu, y quizás ardillas de otras tribus, han experimentado una delección de aproximadamente 9 pb en este gen. Tal y como se ha demostrado en otros roedores, es posible que esta delección haya ocurrido en una

región con pocas constricciones funcionales, como la primera región extracelular (Wlasiuk y Nachman, 2007). Las pocas diferencias que existen entre todas las secuencias del “complejo *granatensis*” y las secuencias de las otras especies de Sciurini dejan claro que a nivel de la tribu hay muy poca variación en este marcador. Los porcentajes de similitud entre especies están, en cambio, relacionados con el patrón de relaciones filogenéticas revelado por otros marcadores, lo que en últimas implica mayor afinidad de acuerdo con la cercanía geográfica (Pecnerová *et al.*, 2015). En las filogenias mitocondriales y combinadas, el “complejo *granatensis*” aparece más cercano a otras ardillas centroamericanas y norteamericanas, lo que explica una mayor similitud a nivel del *MC1R* con *Sciurus carolinensis* y *Sciurus niger* (de Norteamérica). El menor porcentaje, en cambio, se da con respecto de *S. vulgaris*, especie de origen Euroasiático y que representa uno de los linajes más basales en la filogenia. En concordancia con la poca variación interespecífica, las mutaciones no sinónimas encontradas entre todas estas ardillas en general conllevan a cambios de aminoácidos que pueden considerarse conservativos, en cuanto al tamaño, polaridad y/o carga.

Así como hay una variación interespecífica relativamente baja en este marcador dentro de la tribu Sciurini, en el “complejo *granatensis*” se evidenció un patrón similar. El nivel general de diversidad o variabilidad nucleotídica encontrada ( $\pi = 0.00191 = 0.19\%$ ) está por debajo de la que se ha encontrado en otros roedores (por ejemplo, ratón de abazones, *Chaetodipus intermedius*,  $\pi = 0.21\%$ ; topo de abazones, *Thomomys bottae*,  $\pi = 0.25\%$ ) y es similar a la que se ha encontrado en otros mamíferos, como los humanos ( $\pi = 0.1\%$ ) (Wlasiuk y Nachman, 2007). No obstante, un nivel de variabilidad bajo en el *MC1R* podría considerarse como algo común, esto debido a que se trata de una región codificante y potencialmente sometida a altas presiones selectivas (Dobson *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, cualquier mutación en el exón puede ser letal si la función del gen es alterada (Dobson *et al.*, 2012).

En la red haplotípica del *MCIR* no se evidencia un patrón filogeográfico o de estructuración definido, es decir, no se recuperan grupos discretos que tengan relación con los clados o especies putativas recuperados con el *Cytb* y el *D-loop*. Sin embargo, esta discordancia era de esperarse como consecuencia de los tamaños poblacionales pequeños que exhiben los marcadores nucleares con relación a los mitocondriales (Dobson *et al.*, 2012). La organización de los haplotipos tampoco refleja las propuestas taxonómicas adoptadas en el presente trabajo (Nitikman, 1985; de Vivo y Carmignotto, 2015). Si se tiene en cuenta que las subespecies de dichas propuestas han sido descritas con base en el fenotipo, este resultado sería un primer indicio de que no existe una relación de causalidad entre el *MCIR* y la variación en la coloración del pelaje dentro del “complejo *granatensis*”. Prácticamente ninguno de los haplotipos de la muestra se encuentra exclusivamente en alguna subespecie o variante fenotípica, salvo algunas excepciones. Por ejemplo, en la población de Puerto Santander, Norte de Santander, la cual alberga los individuos más melánicos de todo el rango de recolectas, se encontró un haplotipo que no está presente en las demás poblaciones, incluyendo otras donde también hay individuos relativamente oscuros. No obstante, este haplotipo no debe considerarse como típico de ese fenotipo oscuro, sino más bien como consecuencia del aislamiento de estas poblaciones, las cuales en los análisis con marcadores mitocondriales se recuperan como un subgrupo discreto (monofilético) dentro de la especie putativa *Notosciurus chrysuros* (cordillera Oriental). La totalidad de los haplotipos encontrados están separados por escasos pasos mutacionales, esto en concordancia con la escasa variabilidad cuantificada en el *MCIR*. La configuración de la red haplotípica es desordenada, y se puede destacar la existencia de un haplotipo muy común alrededor del cual se disponen los demás haplotipos. Esto en cierta medida refleja el llamado patrón en estrella, el cual se ha asociado, bien sea con una expansión demográfica luego de un cuello de botella, o con un barrido selectivo en la

historia evolutiva reciente de una especie (Dobson *et al.*, 2012). El haplotipo más común que se encontró puede estar presente en casi todas las poblaciones, especies putativas o fenotipos/subespecies. En este sentido, dos individuos con coloraciones muy contrastantes pueden tener el mismo haplotipo del *MC1R*, lo que evidencia aún más que los cambios en este marcador no son los que determinan los cambios en la coloración del pelaje en el “complejo *granatensis*”. Todo lo anterior se ve respaldado por los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), en los cuales la variación en el *MC1R* que existe en toda la muestra se reparte mejor entre poblaciones que en cualquier otro nivel jerárquico (clados/especies putativas o subespecies/variantes fenotípicas).

Respecto de la escasa variabilidad en el *MC1R* dentro del “complejo *granatensis*”, se puede decir también que las mutaciones no sinónimas encontradas son casi todas conservativas, ya que conllevan a cambios entre aminoácidos con propiedades muy similares (tamaño, polaridad y/o carga). Prácticamente ninguno de estos cambios resulta estar asociado con algún fenotipo/subespecie en particular, es decir, ninguno parece promover o causar alteraciones en la coloración del pelaje. Más bien, estos cambios podrían ser consecuencia del aislamiento y posible deriva génica que han experimentado algunas poblaciones, las cuales aparecen como subgrupos discretos en los análisis filogenéticos (dentro de los clados o especies putativas antes mencionadas). El cambio de la Treonina 25 por una Alanina es exclusivo de algunos individuos de los clados hermanos C (*Notosciurus chrysuros*) y D (*N. variabilis*), los cuales llevan una historia evolutiva independiente de los clados A (*N. granatensis*) y B (*N. gerrardi*) desde hace unos 1.9 millones de años; el cambio de la Prolina 30 por una Serina se encontró solo en individuos de la población de Choachí, Cundinamarca, la cual pertenece al clado C (*N. chrysuros*) y ha experimentado cierta diferenciación genética dentro del mismo (se recupera como subgrupo monofilético); el cambio del Valina 155 por una Alanina solo fue detectado en un individuo de la

población de San Antonio de Tequendama, Cundinamarca, la cual pertenece al clado D (*N. variabilis*), y también parece haberse diferenciado de las demás poblaciones (aparece como una rama divergente en la filogenia).

En el presente trabajo se logró amplificar la región codificante completa del *MC1R* en casi todos los individuos del “complejo *granatensis*”, incluyendo todos los sitios que tradicionalmente se han asociado con alteraciones en la coloración del pelaje en mamíferos o en otros grupos de vertebrados. La mayoría de las sustituciones que se dan en esos sitios conllevan a cambios estructurales y funcionales en la proteína, principalmente en favor de una sobreproducción de eumelanina (pigmento oscuro) en los melanocitos. Por ejemplo, el cambio puntual del Ácido Glutámico 94 por una Lisina es el causante del melanismo en la perdiz japonesa (*Coturnix japonica*) (Nadeau *et al.*, 2006), el platanero o reinita (*Coereba flaveola*) (Theron *et al.*, 2001), los pollos comunes (*Gallus gallus*) (Ling *et al.*, 2003) y los ratones (*Mus spp.*) (Robbins *et al.*, 1993); el cambio de la Cisteína 125 por una Arginina provoca el melanismo en zorros (*Vulpes vulpes*) (Vage *et al.*, 1997); los cambios de la Metionina 73 por una Lisina y del Ácido Aspártico 121 por una Asparagina están asociados con el melanismo en ovejas (Lu *et al.*, 1998; Vage, 1999); los cambios de la Valina 92 por una Metionina y de la Leucina 99 por una Prolina están relacionados con el melanismo en cerdos (*Sus scrofa*) (Kijas *et al.*, 1998). En otros mamíferos, en lugar de sustituciones, son deleciones en la secuencia del *MC1R* las que están vinculadas con cambios estructurales drásticos en la proteína y una mayor producción de Eumelanina. Por ejemplo, deleciones de 24 (8 aminoácidos) y 6 pares de bases (3 aminoácidos) son las causantes del melanismo en yaguarundís (*Puma yagouaroundi*) y jaguares (*Panthera onca*), respectivamente (Eizirik *et al.*, 2003), y una deleción, también de 6 pares de bases, la causante del melanismo en conejos gigantes (*Oryctolagus cuniculus*) (Fontanesi *et al.*, 2006). De las únicas tres especies de

ardillas en las que se ha estudiado la relación del *MC1R* con cambios fenotípicos, solo en *Sciurus carolinensis* pudieron establecer que una delección de 24 pares de bases trae como consecuencia una activación constitutiva de la proteína y por ende la eumelanogénesis y melanismo completo en los individuos (McRobie *et al.*, 2009). Por el contrario, en las variantes melánicas de *S. niger* y *S. vulgaris* no se encontró esta delección, ni asociación alguna entre mutaciones puntuales y cualquier cambio en la coloración del pelaje (McRobie *et al.*, 2014). Este mismo patrón se evidenció prácticamente en todas las secuencias del “complejo *granatensis*”, incluyendo las obtenidas a partir de los individuos más melánicos de la muestra (Puerto Santander, Norte de Santander, en la cuenca del Zulia, región del Catatumbo). En estos últimos no se encuentra ninguna de las mutaciones puntuales o delecciones mencionadas anteriormente, lo que termina de confirmar que el *MC1R*, o por lo menos su región codificante, no es la causante directa de la amplia variación fenotípica observada, ni de la eumelanogénesis que hace que algunos individuos sean prácticamente negros. Sin embargo, no se puede descartar del todo la existencia de melanismo dentro de este complejo, ni la influencia del *MC1R* en la condición, por las siguientes razones: en primer lugar, a pesar de que algunos de los individuos recolectados en el presente trabajo son bastante oscuros, estos no alcanzan a ser totalmente melánicos. En este sentido, sus pelos pueden tener bandas de diferentes colores y en algunos de ellos predominar la banda negra, mientras que en el melanismo en ardillas los pelos son totalmente negros (McRobie *et al.*, 2009). En segundo lugar, Hershkovitz (1947), quien realizó amplias recolectas en Colombia, reportó en su trabajo la existencia de individuos totalmente melánicos en los alrededores de Bogotá, en lo que sería el rango geográfico de la especie putativa *Notosciurus chrysuros*. Además de esto, en el presente trabajo se encontraron indicios de una mutación en un sitio del *MC1R* que se ha asociado con el melanismo en cerdos (*Sus scrofa*) (Kijas *et al.*, 1998). Particularmente, tres individuos del clado

D (*Notosciurus variabilis*) son heterocigotos para dicha posición, y ambas variables alélicas podrían codificar aminoácidos diferentes en la proteína (Treonina o Alanina). Aunque ninguno de estos tres individuos exhibe un pelaje melánico, es posible que la expresión de la condición sea reprimida por el alelo dominante. Si se tiene en cuenta que todos los demás individuos del “complejo *granatensis*”, los cuales tampoco son melánicos, tienen una Guanina en dicha posición (lo que da como resultado una Alanina), se puede inferir que muy seguramente este sea el alelo dominante. De acuerdo con esto, los individuos que sean homocigotos para el alelo recesivo, es decir, que lleven una Adenina en lugar de la Guanina (lo que da como resultado una Treonina en la proteína), podrían ser melánicos. No obstante, el hecho de que el único reporte de melanismo dentro del complejo se basa en la observación de un individuo (Hershkovitz, 1947), y de que ningún espécimen en colecciones de Colombia o el exterior refleja un pelaje totalmente negro, quiere decir que la condición es sumamente rara, contrario a lo que sucede en otras especies de ardillas de la tribu Sciurini como *S. vulgaris*, *S. carolinensis* y *Sciurus niger*. Allen (1915) menciona que en general el melanismo es raro en ardillas sudamericanas, y que solo se han reportado avistamientos en algunas especies, como *Sciurus flammifer* (*Hadrosociurus igniventris flammifer*) (de Vivo y Carmignotto, 2015) del valle del Orinoco.

Si se comprueba la influencia del *MC1R* en el melanismo total dentro del “complejo *granatensis*”, esto soportaría la hipótesis de que este gen está involucrado en cambios discretos o drásticos en la coloración del pelaje, más no en cambios continuos o ligeros. En algunos reptiles, aves y mamíferos que exhiben un espectro continuo de coloración en la piel/plumaje/pelaje, como los lagartos del género *Liolaemus* (Corso *et al.*, 2012), la urraca australiana (*Cracticus tibicen*) (Dobson *et al.*, 2012), el petrel norteño (*Fulmarus glacialis*) (Kerr y Dove, 2013), las currucas (*Phylloscopus*) (McDougall-Shackleton *et al.*, 2003), algunos mustélidos (Sato *et al.*, 2005), el

topo de abazones (*Thomomys bottae*) (Wlasiuk y Nachman, 2007), y algunos tuco tucos (*Ctenomys* spp.) (Goncalves *et al.*, 2012), se ha descartado que este gen sea el causante de las diferencias fenotípicas. Con relación a esto, en el “complejo *granatensis*” la amplia variación fenotípica que ha causado la proliferación de subespecies no estaría influenciada por el *MC1R*, pero el melanismo total en algunos individuos probablemente sí. Es posible que, en este complejo, así como en los demás vertebrados mencionados, la variación continua en la coloración del pelaje tenga una base poligénica (Wlasiuk y Nachman, 2007), por lo que se precisa del estudio de múltiples genes, tales como *TRP1*, *ENDRB2*, *PMEL17*, *ASIP* y *SLC45A2*, para determinar con certeza cuáles participan en el proceso (Dobson *et al.*, 2012). El papel del *MC1R* en los cambios de coloración del pelaje ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, la popularidad de este marcador puede estar relacionada con su relativa facilidad de amplificación y análisis, en tanto que se trata de un gen sin intrones (McRobie *et al.*, 2009; McRobie *et al.*, 2014). En cambio, otros genes envueltos en la pigmentación, tales como el *ASIP*, representan un desafío metodológico más grande, puesto que constan de tres exones codificantes (McRobie *et al.*, 2014). Por otro lado, el estudio de porciones no codificantes del *MC1R*, como las regiones reguladoras “downstream”, también podría arrojar pistas sobre la variación en la coloración del pelaje. Recientemente, se ha propuesto que mutaciones en estas regiones son un mecanismo de “sintonización a fina escala”, ya que pueden alterar la expresión de una proteína en tejidos específicos, mientras la preservan intacta en otros (Corso *et al.*, 2012).

El que exista el vínculo entre los cambios en el *MC1R* y el melanismo en algunas ardillas (*Sciurus carolinensis*, complejo *granatensis*), pero no en otras (*S. vulgaris*, *S. niger*), sumado al hecho de que el melanismo en *S. carolinensis* es causado por una delección, mientras que en el “complejo *granatensis*” podría ser causado por una mutación puntual, son evidencias de evolución

fenotípica convergente en una escala temporal corta, la cual se ha dado a través de mecanismos genéticos independientes (Nachman *et al.*, 2003).

Finalmente, los análisis de neutralidad efectuados con las secuencias del *MC1R* revelaron aspectos importantes sobre la evolución del “complejo *granatensis*”. Por un lado, el valor negativo de la *D* de Tajima para toda la matriz podría señalar un exceso de alelos raros en este marcador, lo cual se puede interpretar como un reflejo de un barrido selectivo (reducción de la variabilidad), una expansión demográfica reciente posterior a un cuello de botella, o presencia de selección purificante, todo esto en concordancia con la red haplotípica en patrón de estrella (un haplotipo frecuente central). Sin embargo, el nivel de significancia de la prueba no permite rechazar del todo la hipótesis nula de evolución neutral, lo que finalmente debe tomarse como evidencia de que este marcador no está sujeto a presiones selectivas a lo largo del rango geográfico total muestreado. Como soporte de esto último, los resultados de la prueba de McDonald-Kreitman muestran que la proporción de cambios no sinónimos y sinónimos entre el “complejo *granatensis*” y otras especies de Sciurini (*S. niger*, *S. vulgaris* y *S. carolinensis*) es consistente con las expectativas de la evolución neutral. Teniendo en cuenta que la coloración del pelaje puede representar un mecanismo de adaptación al entorno (funcionalmente importante), se esperaría encontrar rastros de presiones selectivas en los genes que estuviesen involucrados en cualquier cambio en este rasgo fenotípico, lo cual sería consecuencia de mutaciones no neutrales que pueden comprometer el fitness de un organismo (Caro, 2005; Nigenda-Morales, 2017). El caso contrario se vería en un marcador que no está involucrado en el comportamiento del rasgo, ya que muy posiblemente las mutaciones presentes no afectarían el fitness. De acuerdo con esto, la ausencia de selección sobre las secuencias del *MC1R* del “complejo *granatensis*” ratifican la idea de que este marcador no

tiene influencia en la variación en la coloración del pelaje observada en las diferentes poblaciones caracterizadas.

### **Relación entre ambiente y fenotipo en el “complejo *granatensis*”**

La variación geográfica clinal puede surgir como adaptación local dentro de gradientes ambientales a lo largo del rango distribucional de una especie, y puede contribuir a la divergencia fenotípica de las poblaciones (Chavez y Kenagy, 2014). Una de las características con mayor respuesta potencial a los cambios en el ambiente es la coloración del pelaje, especialmente en taxa con distribuciones amplias (Nigenda-Morales *et al.*, 2017). Por tal razón, el estudio de las variables ambientales asociadas a la variación geográfica en esta característica puede resultar determinante a la hora de elucidar los procesos evolutivos y mecanismos subyacentes al cambio fenotípico (Nigenda-Morales *et al.*, 2017). En el caso del “complejo *granatensis*”, la caracterización molecular tanto de marcadores neutrales, como de marcadores no neutrales que participan en la maquinaria de la coloración del pelaje (McRobie *et al.*, 2014), no deja claro el papel de los factores intrínsecos en la amplia variedad de fenotipos observada en el rango geográfico muestreado. No obstante, el estudio de la relación ambiente-fenotipo ofrece una visión alternativa sobre el papel de los factores extrínsecos.

Los análisis de Componentes Principales (ACP) y de Agrupamiento, con las variables ambientales medidas a lo largo del rango geográfico del “complejo *granatensis*”, son consistentes en demostrar la ausencia de asociación entre localidades en las que se encuentra la misma subespecie, o localidades en las que hay subespecies muy parecidas. Esto quiere decir que condiciones ambientales idénticas no necesariamente inducen la manifestación de un mismo fenotipo, sino que más bien, un mismo fenotipo puede presentarse en un amplio espectro de condiciones, en concordancia con el concepto de plasticidad fenotípica (Nigenda-Morales *et al.*,

2017). De acuerdo con esto, puede haber subespecies (variantes fenotípicas) muy parecidas en condiciones medioambientales disímiles (*S. g. chrysuros* y *S. g. meridensis*; *S. g. gerrardi* y *S. g. zuliae*), o subespecies diferentes en condiciones idénticas (*S. g. gerrardi*, *S. g. variabilis*, *S. g. splendidus* y *S. g. norosiensis*). Esto se ve respaldado en las observaciones de Philip Hershkovitz, quien colectó numerosos especímenes en el norte de Colombia y se cuestionó sobre las causas de la variación en la coloración del pelaje dentro del “complejo *granatensis*”. Este autor mencionó en su trabajo la presencia de subespecies (variantes fenotípicas) marcadamente diferenciadas en áreas del país sujetas a las mismas condiciones ambientales (*S. g. splendidus*, *S. g. variabilis* y *S. g. norosiensis*) (Hershkovitz, 1947).

Una posible excepción en los dos análisis mencionados la constituyen varias subespecies distribuidas en las tierras bajas del norte de Colombia (región Caribe), las cuales exhiben una coloración dorsal en general rojiza y una coloración ventral siempre blanca (Por ejemplo, *S. g. splendidus*, *S. g. granatensis*, *S. g. bondae*, *S. g. saltuensis* y *S. g. agricolae*). Varias de las localidades de recolecta de dichas subespecies conforman un grupo discreto, lo que podría representar evidencia de que los fenotipos con estos rasgos si están influenciados por condiciones de temperatura y precipitación más específicas. El análisis de Correspondencias Canónicas (ACC) confirma en cierto modo estos hallazgos, ya que tanto la coloración dorsal rojiza uniforme, como la coloración ventral blanco puro, son determinadas por valores altos en variables como el Rango Anual de Temperatura, la Estacionalidad en la Precipitación y la Radiación Solar. Al mapear el comportamiento de estas tres variables en el contexto geográfico de Colombia es evidente que los mayores valores se presentan en el norte del país (región Caribe), coincidiendo especialmente con las zonas de distribución del bosque seco tropical. Esto permite inferir que el fenotipo más claro de todo el “complejo *granatensis*” (dorso rojizo y vientre blanco) debe jugar un papel adaptativo

importante a las condiciones de este ecosistema. Si se tiene en cuenta que en el bosque seco el dosel es más abierto y la incidencia de luz es mayor, un fenotipo más claro, tanto a nivel dorsal como ventral, podría funcionar en principio como una ventaja en términos de camuflaje, ya que disminuiría el contraste de los individuos con relación a su entorno. Chavez y Kenagy (2014) demostraron este principio a lo largo de un gradiente ecológico en la distribución de la ardilla norteamericana *Tamiasciurus douglassi*. Los análisis de estos autores muestran una asociación significativa entre la coloración del pelaje ventral y la cobertura vegetal, siendo esta menos oscura a medida que el dosel es más abierto y permite una mayor entrada de luz. En este sentido, es posible que la selección esté favoreciendo una coloración ventral más oscura en bosques con una estructura del dosel más densa, la cual crea un fondo con menos luz que hace menos conspicuas a las ardillas ante los depredadores, en este caso los que están por debajo. Contrariamente, la selección puede estar favoreciendo una coloración ventral más clara en los bosques con estructura del dosel menos densa, ya que esta coincide con un fondo más brillante o iluminado. En el bosque seco tropical de Colombia las ardillas podrían ser depredadas desde arriba por diferentes aves de presa, y desde abajo principalmente por miembros del orden Carnivora (como triguillos, tayras, etc.) (Koprowski *et al.*, 2016). Por tal razón, un fenotipo claro en el dorso y el vientre podría resultar favorecido por la selección, ya que facilita el camuflaje en un entorno con dosel típicamente abierto y, por ende, mejor iluminado. Por otra parte, la coloración rojiza en el dorso también podría funcionar como un mecanismo para reflejar la radiación solar, la cual es particularmente elevada en la región Caribe de Colombia y bastante incidente en el bosque seco tropical, esto debido a un dosel más abierto. De esta forma, este rasgo fenotípico también sería favorecido por la selección, puesto que permite un mejor balance térmico en condiciones donde el calor puede resultar mortal (Caro, 2005). El hecho de que la coloración ventral blanca es exclusiva de ardillas del norte de Colombia,

y de que las poblaciones de esta región conformen un grupo monofilético en los análisis moleculares (Clado A: *Notosciurus granatensis*), sugiere de alguna forma que la acción de la selección sobre este rasgo fenotípico ha sido lo suficientemente fuerte como para promover la divergencia de este linaje con respecto de los demás linajes del complejo (*N. gerrardi*, *N. variabilis*, *N. chrysuros*). No obstante, se necesita una mayor cantidad de evidencia para llegar a una conclusión al respecto.

Aunque los fenotipos más oscuros de la muestra no forman grupos discretos en los Análisis de Componentes Principales (ACP) ni de Agrupamiento, en el análisis de Correspondencias Canónicas si se evidencia la influencia de algunas variables ambientales sobre determinados rasgos. La coloración dorsal general dorsal muy oscura, coloración dorsal café oscura y la banda media dorsal negra están presentes en localidades con valores altos de Precipitación en el Cuarto más Cálido, Precipitación en el Mes más Seco, Precipitación en el Cuarto más Seco y Precipitación en el Cuarto más Frío. En concordancia con esto, las subespecies del “complejo *granatensis*” que exhiben estos rasgos, como *S. g. tarrae* y *S. g. morulus*, *S. g. maracaibensis* y *S. g. norosiensis* se distribuyen en zonas con bosques húmedos y por ende altas precipitaciones, como la región del Catatumbo, las tierras bajas del Chocó colombiano y la cuenca media del valle del río Magdalena. Contrario a lo que sucede con las subespecies con fenotipos claros (dorso rojizo y vientre blanco) de las tierras bajas del Caribe, es posible que un dorso más oscuro en las subespecies de bosques húmedos también confiera una ventaja en términos de camuflaje ante depredadores aéreos en un entorno en el que la incidencia de luz es menor, esto como consecuencia de un dosel más cerrado. Además, teniendo en cuenta que estas subespecies exhiben una coloración ventral rojiza, esta ventaja también se daría en contra de los depredadores terrestres (Chavez y Kenagy, 2014). Así mismo, la manifestación de fenotipos oscuros también podría constituir una adaptación en

términos fisiológicos, puesto que en ambientes con mayor humedad esto permitiría una mayor absorción de radiación solar y por ende un secado más rápido del pelaje (Caro, 2005). Complementariamente, considerando que en ambientes húmedos y cálidos hay mayor incidencia de patógenos, no se puede descartar que los fenotipos oscuros confieran una mayor resistencia ante cualquier infección, tal y como se ha hipotetizado para otros mamíferos (Nigenda-Morales, 2018). Aparte de la coloración ventral blanco puro, prácticamente ninguno de los rasgos fenotípicos que se observan dentro del “complejo *granatensis*” es exclusivo de uno u otro linaje. El dorso café oscuro, dorso café oliváceo, la línea media dorsal, el vientre rojizo o combinado y la cola con dos segmentos, por ejemplo, suelen converger en diferentes poblaciones, bien sea de un mismo linaje, o de diferentes linajes, lo cual quiere decir que la presión selectiva sobre estos rasgos no ha sido lo suficientemente fuerte como para promover la especiación o divergencia.

De acuerdo con todo lo anterior, es posible afirmar que la variación en la coloración del pelaje dentro del “complejo *granatensis*” se ajusta a un patrón ecogeográfico denominado la regla de Gloger (Caro, 2005). Esta regla sostiene que un pelaje o plumaje dorsal más oscuro está asociado a especies que viven en ambientes más húmedos (Caro, 2005), como los que se presentan de manera general en el Neotrópico, y a una escala geográfica más reducida, en algunas regiones habitadas por miembros del “complejo *granatensis*” (Chocó biogeográfico, Catatumbo, cuenca media del Magdalena). En soporte de tal afirmación, es posible encontrar en otros grupos de mamíferos una variación fenotípica equiparable a la del “complejo *granatensis*”; por ejemplo, los primates del complejo *Cebus albifrons*, que también son diurnos y arbóreos, exhiben tonalidades más claras en la región del Caribe colombiano (*Cebus cesarae*) y coloraciones más oscuras en las regiones del Catatumbo (*Cebus leucocephalus*) y del Chocó (*Cebus capucinus*), lo que en últimas quiere decir que el fenotipo en ambos complejos de especies responde de manera muy similar a

las condiciones ambientales, en este caso en concordancia con la regla de Gloger. Además, los análisis de Kamilar y Bradley (2011), en los cuales se incluyen datos del género *Cebus*, comprueban que la coloración del pelaje en el orden Primates se ajusta a esta regla.

El “complejo *granatensis*” constituye un claro ejemplo en el que se presenta variación fenotípica continua compartida entre poblaciones filogeográficamente estructuradas. Este patrón puede mantenerse gracias a varios procesos evolutivos, entre los que se encuentran la retención de polimorfismos ancestrales, la selección balanceadora, la adaptación paralela a condiciones locales cambiantes y la plasticidad fenotípica (Zamudio *et al.*, 2016)

## 6. Conclusiones

- El esquema taxonómico que se utiliza actualmente para la tribu Sciurini no concuerda con la realidad evolutiva. Se deben reevaluar las propuestas bajo una visión integrativa (morfología y molecular), sobre todo con relación a la circunscripción de categorías supraespecíficas.
- Dos eventos de dispersión fueron fundamentales durante la diversificación de la tribu Sciurini en el Neotrópico: una primera llegada a Sudamérica hace unos 5.6 millones de años, antes de la fecha más aceptada para cierre del istmo de Panamá, y una recolonización por parte del ancestro común del “complejo *granatensis*” hace unos 3.2 millones de años.
- La problemática taxonómica de la tribu Sciurini afecta notablemente al “complejo *granatensis*”, en cuanto a que no es posible saber con exactitud cuál es la asignación

genérica más adecuada. A la espera de análisis bajo una visión integrativa, el tratamiento provisional debe ser bajo el género *Notosciurus*.

- El “complejo *granatensis*” hace parte de un clado de ardillas netamente centroamericanas, y su especie hermana más probable, según información molecular y morfológica, es *Microsciurus alfari*.
- La ardilla de cola roja, como actualmente está definida, representa cuatro linajes evolutivos independientes con una divergencia tan grande entre sí que amerita su reconocimiento como especies diferentes: *Notosciurus granatensis*, *Notosciurus gerrardi*, *Notosciurus chysuros* y *Notosciurus variabilis*.
- La diversificación de las especies dentro del “complejo *granatensis*” inició en la edad Gelasiense del Pleistoceno, hace unos 1.9 millones de años, y fue influenciada principalmente por las fluctuaciones climáticas y la subsecuente formación de refugios de vegetación en el norte de Sudamérica.
- Las propuestas taxonómicas clásicas que existen en torno al “complejo *granatensis*” no reflejan la realidad evolutiva, en cuanto que las múltiples subespecies reconocidas no representan unidades independientes, sino más bien variantes fenotípicas locales.
- Debido a que las múltiples subespecies que se han descrito dentro del “complejo *granatensis*” se basan en la coloración del pelaje, es preciso concluir que la historia evolutiva del mismo no ha propiciado la diferenciación en este rasgo.
- El “complejo *granatensis*” exhibe una variación fenotípica continua tan amplia que ha resultado en la descripción de numerosas subespecies, causando esto un caos nomenclatural. Por esta razón, se trata de uno de los mamíferos más politípicos del Neotrópico, y posiblemente de la ardilla más politípica del mundo

- El presente trabajo constituye una de las pocas iniciativas por estudiar dicha variación, no solo desde el punto de vista taxonómico, como se ha hecho en múltiples taxa, sino también desde el punto de vista evolutivo. Así mismo, para el caso particular de las ardillas, constituye el primer estudio de este tipo en el que se incluye información de numerosas localidades, fenotipos/subespecies y ambientes, abarcando prácticamente todo el rango geográfico de un taxón.
- El marco del presente trabajo representa una ventana importante para la evaluación de los mecanismos genéticos involucrados en la variación fenotípica de la ardilla con mayor cantidad de subespecies reconocidas actualmente, así como en general de los mamíferos. Aunque el *MC1R* es un importante gen candidato por su papel en los cambios de coloración del pelaje en una amplia gama de vertebrados, no se encontró una asociación consistente entre mutaciones en este marcador y fenotipos específicos dentro del “complejo *granatensis*”, lo cual en últimas se sustenta por la ausencia de presiones selectivas en las secuencias analizadas.
- En muchos vertebrados el *MC1R* parece estar involucrado en cambios drásticos en la coloración del pelaje, tales como el melanismo. Aunque en los fenotipos más oscuros de la muestra no se observan cambios en este marcador, la presencia de una mutación en un sitio relacionado con el pelaje melánico en cerdos abre la posibilidad de que también se presente la condición en ardillas del “complejo *granatensis*”, tal y como se ha reportado previamente en algunas poblaciones.
- El *MC1R* es uno de muchos genes involucrados en la maquinaria que regula la coloración del pelaje en vertebrados. Posiblemente el estudio de las regiones reguladoras “downstream” en este gen, así como el estudio de otros genes como el *ASIP*, ofrezcan una

idea más clara sobre los mecanismos genéticos que causan la variación fenotípica continua en el “complejo *granatensis*”.

- El presente trabajo también constituye una de las pocas iniciativas en la que además de estudiar las posibles bases genéticas de la variación fenotípica en un vertebrado politípico, se analizan las posibles causas ambientales-ecológicas.
- Las condiciones ambientales y ecológicas parecen jugar un papel importante en la manifestación de diferentes fenotipos dentro del “complejo *granatensis*”. En lugares en los que hay gran variabilidad en la precipitación y temperatura, una alta radiación solar y un dosel más cerrado, como el bosque seco tropical, predomina una coloración clara, rojiza en el dorso y blanca en el vientre, la cual funciona como una ventaja adaptativa en términos fisiológicos (como reflector), y de camuflaje (menor contraste en un entorno iluminado). El caso contrario se da en lugares con altas precipitaciones, mucha humedad y un dosel más cerrado, como en bosques húmedos tropicales, a lo que el fenotipo responde mediante la presencia de un pelaje más oscuro a nivel dorsal y rojizo en el vientre, que funciona como una superficie de absorción de radiación y secado rápido, al tiempo que ofrece un menor contraste en un entorno menos iluminado. En este sentido, la variación en la coloración del pelaje del “complejo *granatensis*” se ajusta al patrón ecogeográfico conocido como la regla de Gloger.
- En Colombia los fenotipos más oscuros del “complejo *granatensis*” se manifiestan en los bosques húmedos del Catatumbo, cuenca media del Magdalena y Chocó biogeográfico, tal y como sucede con los primates del complejo “*Cebus albifrons*”. Así mismo, los fenotipos más claros están presentes en las poblaciones de las tierras bajas del Caribe.

- El patrón de variación fenotípica del “complejo *granatensis*” posiblemente resulta de la combinación de varios fenómenos evolutivos, tales como la retención de polimorfismos ancestrales, la selección balanceadora, la adaptación paralela a condiciones locales cambiantes y la plasticidad fenotípica

### Referencias Bibliográficas

- Allen, J. A. (1914). Review of the South American Sciuridae. Bulletin of the American Museum of Natural History, XXXIV, 147-209.
- Allendorf, F. W. y Luikart, G. H. (2007). Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. Oxford. 529 pp.
- Altschul, S.F., Gish, W., Willer, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403-410.
- Arango, C., Bueno, M. L. y Chacón, M. N. (2007). Variación cariológica en diferentes fenotipos de *Sciurus granatensis* (Rodentia: Sciuridae). Acta Biológica Colombiana, 12S, 3-12.
- Arbogast, B. S., Schumacher, K. I., Kerhoulas, N. J., Bidlack, A. L., Cook, J. A. y Kenagy, G. J. (2017). Genetic data reveal a cryptic species of new world flying squirrel: *Glaucomys oregonensis*. Journal of Mammalogy, 98(4), 1027-1041.
- Bacon, C. D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B. T., Chakrabarty, P. y Antonelli, A. (2015). Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panamá. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(19), 6110-6115.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16(1), 37-48.
- Barrat, E. M., Gurnell, J., Malarky, G., Deaville, R. y Bruford, M. W. (1999). Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. Molecular Ecology, 8, S55-S63.
- Black, C. C. (1972). Holartic evolution and dispersal of squirrels (Rodentia: Sciuridae). Evolutionary Biology, 6, 305-322.

- Bradley, R. D. y Baker, R. J. (2001). A test of the genetic species concept: Cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82,960-973.
- Bonnet, E. y Van de Peer, Y. (2002). *zt*: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical Software*, 7, 1-2.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Chieh-His, Wu, C., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A. y Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A software platform for evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology* 10(4), e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Cabrera, A. (1961). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (Ciencias Zoológicas)*, 4, 309-732.
- Cadena, C. D., Pedraza, C. A. y Brumfield, R. T. (2016). Climate, habitat associations and the potential distribution of Neotropical birds: implications for diversification across the Andes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 40(155), 275-287.
- Caro, T. (2005). The adaptative significance of coloration in mammals. *BioScience*, 55(2), 125-136.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer programa to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 10, 1657-1659.
- Chavez, A. S., Maher, S. P., Arbogast, B. S. y Kenagy, G. J. (2013). Diversification and gene flow in nascent lineages of island and mainland North American tree squirrels (*Tamiasciurus*). *Evolution*, 68(4), 1094-1109.
- Chavez, A. S. y Kenagy, G. J. (2014). Clinal colour variation within a panmictic population of tree squirrels, *Tamiasciurus douglassi* (Rodentia: Sciuridae), across an ecological gradient. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 536-546.
- Corso, J., Goncalves, G. L. y de Freitas, T. R. O. (2012). Sequence variation in the *melanocortin-1 receptor (MC1R)* pigmentation gene and its role in the cryptic coloration of two South American sand lizards. *Genetics and Molecular Biology*, 35(1), 81-87.

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.
- Defler, T. R. Primates of Colombia. (2000). Conservation International Tropical Field Guide Series. Panamericana Formas e Impresos S. A. Bogotá, Colombia.
- de Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886.
- de Vivo, M. y Carmignotto, M. P. (2015). Family Sciuridae G Fisher, 1817. Pp: 1-48 en: Patton, J. L., Pardiñas, U. F. J. y D'Elía, G. (Eds). *Mammals of South America. Volume 2: Rodents*. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 1336 pp.
- Dobson, A. E., Schmidt, D. J. y Hughes, J. M. (2012). Sequence variation in the *melanocortin-1 receptor (MC1R)* does not explain continent-wide plumage color differences in the Australian Magpie (*Cracticus tibicen*). *Journal of Heredity*, 103(6), 769-780.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Eizirik, E., Yuhki, N., Johnson, W. E., Menotti-Raymond, M., Hannah, S. S. y O'Brien, S. J. (2003). Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Current Biology*, 13, 448-453.
- Ellerman, J. R. (1940). The families and genera of living rodents. Vol. 1. Rodents other than Muridae. Trustees of the British Museum (Natural History). London. 689 pp.
- Emmons, L. y Feer, F. (1997). *Neotropical Rainforest Mammals. Second Edition*. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 307 pp.
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. (1992). Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fick, S. E. y Hijmans, R. J. (2017). Worldclim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, DOI: 10.1002/joc.5086
- Fontanesi, L., Tazzoli, M., Beretti, F. y Russo, V. (2006). Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).
- Goncalves, G. L., Hoekstra, H. E. y Freitas, T. R. O. (2012). Striking coat colour variation in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae): a role of the melanocortin-1 receptor? *Biological Journal of the Linnean Society*, 105, 665-680.
- Gutiérrez, E. E., Helgen, K. M., McDonough, M. M., Bauer, F., Hawkins, M. T. R., Escobedo-Morales, L. A., Patterson, B. D. y Maldonado, J. D. (2017). A gene tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. *Zookeys*, 697, 87-131.
- Gregory-Wodzicki, F. M. (2000). Uplift history of the central and northern Andes: a review. *GSA Bulletin*, 112(7), 1091-1105.
- Haffer, J. (1967). Speciation in Colombian forest birds west of the Andes. *American Museum Novitates*, 2294, 57 pp.
- Hajibabaei, M., deWaard, J. R., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Mackie, P. M. y Hebert, D. N. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360: 1959-1967.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistical Software Package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*, 4(1), 9 pp.

- Harding, L. D. y Drago, J. W. (2012). Out of the tropics: a phylogeographic history of the long-tailed weasel, *Mustela frenata*. *Journal of mammalogy*, 93(4), 1178-1194.
- Helgen, K. M., Pinto, C. M., Kays, R., Helgen, L. E., Tsuchiya, M. T. N., Quinn, A., Wilson, D. E. y Maldonado, J. E. (2013). Taxonomic revision of the olingos (*Bassaricyon*), with description of a new species, the Olinguito. *ZooKeys*, 324, 1-83.
- Herron, M. D., Castoe, T. A. y Parkinson, C. L. (2004). Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*).
- Hershkovitz, P. (1947). Mammals of northern Colombia, preliminary report N° 1: Squirrels (Sciuridae). *Proceedings of the United States National Museum*, 97, 1-46.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. y Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.
- Ho, S. Y. W., Saarma, U., Barnett, R., Haile, J. y Shapiro, B. (2008). The effect of inappropriate calibration: three case studies in molecular ecology. *PLOS ONE*, 3(2), e1615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001615>
- Ho, S. Y. W. y Phillips, M. J. (2009). Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology*, 58(3), 367-380.
- Ho., S. Y. W., Tong, K. J., Foster, C. S. P., Ritchie, A. M., Lo, N. y Crisp, M. D. (2015). Biogeographic calibrations for the molecular clock. *Biology Letters*, 11, 20150194. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0194>.
- Hoekstra, H. E. y Nachman, M. W. (2003). Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Molecular Ecology*, 12, 1185-1194.
- Hung Sun, KOH., Minghai, Z., Jinxing, W., Dong Sun, S. y Bae Geun, L. (2006). Mitochondrial DNA variation in the red squirrel (*Sciurus vulgaris mantchuricus*) from Korea and northeast China. *Acta Theriologica Sinica*, 26(1), 1-7.

- Jansa, S. A., Barker, F. K. y Voss, R. S. (2013). The early diversification history of didelphid marsupials: a window into South America's "splendid isolation". *Evolution*, 68(3), 684-695.
- Kamilar, J. M. y Bradley, B. J. (2011). Interspecific variation in primate coat colour supports Gloger's rule. *Journal of Biogeography*, 38(12), 2270-2277.
- Kijas, J. M. H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M. y Andersson, L. (1998). Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, 150, 1177-1185.
- Kerr, K. C. R. y Dove, C. J. (2013). Delimiting shades of gray: phylogeography of the northern Fulmar, *Fulmarus glacialis*. *Ecology and Evolution*, 3(7), 1915-1939.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. y Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6196-6200.
- Koprowski, J. L., Goldstein, E. A., Bennett, K. R. y Pereira-Mendes, C. (2016). Family Sciuridae (tree, flying and ground squirrels, chipmunks, marmots and prairie dogs). Pp 648-837 en: Wilson, D. E., Lacher, T. E. Jr. y Mittermeier, R. A. eds. (2016). *Handbook of the mammals of the world*. Vol. 6. Lagomorphs and Rodents I. Lynx Edicions, Barcelona, España.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijine, G. y Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.

- Ling, M. K., Lagerström, M. C., Fredriksson, R., Okimoto, R., Mundy, N. I., Takeuchi, S. y Schiöth, H. B. (2003). Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *European Journal of Biochemistry*, 7, 1441-1449.
- Liu, Z., Li, Bo., Ma, J., Zheng, D. y Xu, Y. (2014). Phylogeography and genetic diversity of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in China: implications for the species' postglacial expansion history. *Mammalian Biology*, 79, 247-253.
- Lu, D., Vague, D. I. y Cone, R. D. (1998). A ligand-mimetic model for constitutive activation of the *melanocortin-1 receptor*. *Molecular Endocrinology*, 12(4), 592-604.
- Lucas, J. M. y Galián, J. (2009). Análisis molecular de *Sciurus vulgaris hoffmanni* Valverde, 1967 (Rodentia: Sciuridae) e implicaciones para su conservación. *Anales de Biología*, 31, 81-91.
- Lynch-Alfaro, J. W., Cortés-Ortiz, L., Di Fiore, A. y Boubli, J. P. (2015). Special issue: comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82(Part B), 518-528.
- Madsen, C. L. (2011). Population genetics of red and black squirrels in Denmark: prospects for conservation. Master's Thesis. Faculty of Science, University of Copenhagen. 81 pp.
- Martins-Junior, A. M. G., Carneiro, J., Sampaio, I., Ferrari, S. F. y Schneider, H. (2018). Phylogenetic relationships among Capuchin (Cebidae, Platyrrhini) lineages: an old event of sympatry explains the current distribution of *Cebus* and *Sapajus*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), 699-712.
- Masters, B. V., Fan, V. y Ross, H. A. (2011). Species delimitation-a geneious plugin for the exploration of species boundaries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 154-157.
- Mathis, V. L., Hafner, M. S. y Hafner, D. J. (2014). Evolution and phylogeography of the *Thomomys umbrinus* species complex (Rodentia: Geomyidae). *Journal of Mammalogy*, 95(4), 754-771.
- McDonald, J. H. y Kreitman, M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, 351(6328), 652-654.

- McDougall-Shackleton, E. A., Blanchard, L. y Gibbs, L. (2003). Unmelanized plumage patterns in old world leaf warblers do not correspond to sequence variation in the melanocortin-1 receptor locus (MC1R). *Molecular Biology and Evolution*, 20(10), 1675-1681.
- McRobie, H. R., Thomas, A. P. y Kelly, J. (2009). The genetic basis of melanism in the gray squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Journal of Heredity*, 100(6), 709-714.
- McRobie, H. R., King, L. M., Fanutti, C., Coussons, P. J., Moncrief, M. D. y Thomas, A. P. M. Melanocortin I Receptor (MC1R) gene sequence variation and melanism in the gray (*Sciurus carolinensis*), Fox (*Sciurus niger*), and red (*Sciurus vulgaris*) squirrel. (2014). *Journal of Heredity*, 105(3), 423-428.
- Mercer, J. M. y Roth, L. (2003). The effect of Cenozoic global change on squirrel phylogeny. *Science*, 299, 1568-1572.
- Moore, J. C. (1959). Relationships among living squirrels of the Sciurinae. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 118 (4): 153-206.
- Mullen, L. M., Vignieri, S. N., Gore, J. A. y Hoekstra, H. E. (2009). Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations. *Proceedings of The Royal Society*, 276(1674), 3809-18.
- Nachman, M. W., Hoekstra, H. E. y D'Agostino, L. D. (2003). The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 100 (9), 5268-5273.
- Nadeau, N. J., Minvielle, F. y Mundy, N. I. (2006). Association of a Glu92Lys substitution in *MC1R* with extended brown in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Genetics*, 3, 287-289.
- Nagorsen D. W. y Peterson, R. L. (1980). *Mammal collector's manual: A guide for collecting, documenting and preparing mammal specimens for scientific research*. Life science miscellaneous publications, Royal Ontario Museum. Toronto, Canada. 79 pp.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. United States of America.

- Nigenda-Morales, S. F., Harrigan, R. J. y Wayne, R. K. (2018). Playing by the rules? Phenotypic adaptation to temperate environments in an American marsupial. *PeerJ*, 6:e4512; DOI 10.7717/peerj.4512.
- Nitikman, L. Z. (1985). *Sciurus granatensis*. *Mammalian Species*, 246, 1-8.
- Nores, M. (2004). The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13(2), 149-161.
- Olson, D. M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E. D., Burgess, N. D., Powell, G. V. N., Underwood, E. C., D'Amico, J. A., Itoua, I., Strand, H. E., Morrison, J. C., Loucks, C. J., Allnutt, T. F., Ricketts, T. H., Kura, Y., Lamoreux, J. F., Wettengel, W. W., Hedao, P. y Kassem, K. R. (2001). Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. *BioScience*, 51(11), 933-938.
- Oshida, T. y Masuda, R. (2000). Phylogeny and zoogeography of six squirrel species of the genus *Sciurus* (Mammalia, Rodentia), inferred from Cytochrome b gene sequences. *Zoological Science*, 17: 405-409.
- Patterson, B. D., Solari, S. y Velazco, P. M. (2012). The role of the Andes in the diversification and biogeography of Neotropical mammals. Pp 351-378, en: Patterson, B. D. y Costa, L. P. eds. (2012). *Bones, Clones and Biomes: the history and geography of recent Neotropical mammals*. The University of Chicago Press. Chicago, United States of America.
- Patwardhan, A., Ray, S. y Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Journal of Phylogenetic Evolutionary Biology*, 2, 131.
- Pecnerová, P. y Martinková, N. (2012). Evolutionary history of tree squirrels (Rodentia, Sciurini) based on multilocus phylogeny reconstruction. *Zoologica Scripta*, 41: 211-219.
- Pecnerová, P., Moravec, J. C. y Martinková, N. (2015). A skull might lie: modelling ancestral ranges and diet from genes and shape of tree squirrels. *Systematic Biology*, 64 (6): 1074-88.

- Phuong, M. A., Lim, M. C. W., Wait, D. R., Rowe, K. C. y Moritz, C. (2014). Delimiting species in the genus *Otospermophilus* (Rodentia: Sciuridae), using genetics, ecology and morphology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 1136-1151.
- Pierre-Henri, F. Hautier, L., Dimitrov, D. y Douzery, E. J. P. (2012). A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evolutionary Biology*, 12:88, <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-88>.
- Prance, G. T. (1979). Forest refuges: evidence from woody angiosperms. Pp. 137-158, en: Prance, G. T. ed. (1982). *Biological diversification in the Tropics*. Columbia University Press.
- QGIS Development Team. (2018). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project, <http://qgis.osgeo.org>.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D. y Drummond, A. J. (2014). Tracer v 1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ridgway, R. (1912). *Color standards and color nomenclature*. Published by the author. Washington D. C. 44 pp.
- Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Jhonson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Rehffuss, L., Baak, E., Mountjoy, K. G. y Cone, R. D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 72, 827-834.
- 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.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Rull, V. (2006). Quaternary speciation in the Neotropics. *Molecular Ecology*, 15, 4257-4259.

- Ruedas, L. A., Marques-Silva, S., French, J. H., Platt, R. N. II, Salazar-Bravo, J. Mora, J. M. y Thompson, C. W. (2017) A prolegomenon to the systematics of South American cottontail rabbits (Mammalia, Lagomorpha, Leporidae: *Sylvilagus*): designation of a neotype for *Sylvilagus brasiliensis* (Linnaeus, 1758), and restoration of *Sylvilagus andinus* (Thomas, 1897) and *Sylvilagus tapetillus* Thomas, 1913. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology*, 205, 67 pp. University of Michigan.
- Rylands, A. B. y Mittermeier, R. A. (2013). Family Cebidae (Squirrel Monkeys and Capuchins). Pp. 348-413, en: Mittermeier, R. A., Rylands, A. B. y Wilson, D. E. eds. (2013). *Handbook of the Mammals of the World. Vol. 3. Primates*. Lynx Edicions, Barcelona, España.
- Sikes, R. S. (2016). 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97(3), 663-688
- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), versión 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Stephens, M., Smith, N. J. y Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978-989.
- Stephens, M. y Scheet, P. (2005). Accounting for decay in linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76(3), 449-462.
- Steppan, S. J., Storz, B. L. y Hoffmann R. S. (2004). Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from *c-myc* and *RAG1*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 703-719.
- Sukumaran, J. y Holder, M. T. (2010). DendroPy: A Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics*, 26(12), 1589-1571.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-460.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

- Theron, E., Hawkins, K., Bermingham, E., Ricklef, R. E. y Mundy, N. I. (2001). The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: A *melanocortin-1-receptor* point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Current Biology*, 11(8), 550-557.
- Thorington, R. W. y Hoffmann R. S. (2005). Family Sciuridae. Pp 754-818 en: Wilson, D. W. & Reeder, D. M. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Volume 2. Third Edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, United States of America.
- Thorington, R. W., Koprowski, J. L., Steele, M. A. y Whatton, J. F. (2012). *Squirrels of the World*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, United States of America. 472 pp.
- Trouessart. (1880). Revision du genre Écureuil (*Sciurus*). *La Naturaliste*, 37, 290-293.
- Vague, D. I., Lu, D., Klungland, H, Lien, S., Adalsteinsson, S. y Cone, R. D. (1997). A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes Vulpes*. *Nature Genetics*, 15(3), 311-315.
- Villalobos, F. y Cervantes-Reza, F. (2007). Phylogenetic relationships of Mesoamerican species of the genus *Sciurus* (Rodentia: Sciuridae). *Zootaxa*, 1525, 31-40.
- Villalobos, F. y Gutiérrez-Espeleta, G. (2014). Mesoamerican tree squirrels evolution (Rodentia: Sciuridae): a molecular phylogenetic analysis. *Revista de Biología Tropical*, 62(2), 649-657.
- Voss, R. S., Hubbard, C. y Jansa, S. A. (2013). Phylogenetic relationships of new world porcupines (Rodentia, Erethizontidae): implications for taxonomy, morphological evolution, and biogeography. *American Museum Novitates*, 3769, 1.13.
- Voss, R. S., Lim, B. K., Díaz-Nieto, J. F. y Jansa, S. A. (2013). A new species of *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae) from the Pakaraima highlands of Guyana, with remark on the origin of the endemic Pantepui mammal fauna. *American Museum Novitates*, 3778, 27 pp.
- Wauters, L. A., Amori, G., Aloise, G., Gippoliti, S., Agnelli, P., Galimberti, A., Casiraghi, M., Preatoni, D. y Martinoli, A. (2017). New endemic mammal species for Europe: *Sciurus*

*meridionalis* (Rodentia, Sciuridae). *Hystrix*, the Italian Journal of Mammalogy, 28(1), 1-8.

Wilson, D. E., Lacher, T. E. Jr. y Mittermeier, R. A. eds. (2016). Handbook of the Mammals of the World. Vol. 6. Lagomorphs and Rodents I. Lynx Edicions. Barcelona, España.

Wilson, D. E., Lacher, T. E. Jr. y Mittermeier, R. A. eds. (2017). Handbook of the Mammals of the World. Vol. 7. Rodents II. Lynx Edicions. Barcelona, España.

Wilson, E. O. y Brow, W. L. Jr. (1953). The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology*, 2(3), 97-111.

Wlasiuk, G. y Nachman, M. W. (2007). The genetics of adaptative coat color in Gophers: coding variation at *MC1R* is not responsible for dorsal color differences. *Journal of Heredity*, 98(6), 567-574.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics Society*, 4, 323-354.

Xia, X. (2013). DAMBE 5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30(7), 1720-1728.

Yang, Z. y Rannala, B. (2006). Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 212-226.

Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C. y He, X.J. (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87, 46-49.

Zamudio, K. R., Bell, R. C. Mason, N. A. (2016). Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *PNAS*, 113(29), 8041-8048.

Zwickl, D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological datasets under the Maximum Likelihood criterion. Ph.D. dissertation. University of Texas at Austin.

## Apéndices

### Apéndice A. Consideraciones éticas para la recolecta de especímenes

Los individuos de *N. granatensis* fueron sacrificados en su entorno natural con una pistola neumática calibre 5.5 de referencia Crosman 2240. De acuerdo con los lineamientos de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres en investigación y educación, la recolecta con armas neumáticas garantiza la muerte inmediata de cada individuo, minimizando así el sufrimiento y estrés (Sikes *et al.*, 2016). Por tal razón, esta metodología cumple con lo dispuesto en el literal b del artículo 30 del capítulo VIII, consignado en la ley 84 de 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los animales en Colombia. El arma utilizada fue adquirida legalmente en un establecimiento comercial autorizado y su porte o tenencia están permitidos según el artículo 25 del diario oficial N° 41.142 del 17 de diciembre de 1993, el cual corresponde al decreto 2335 de 1993 expedido por el Ministerio de Defensa Nacional.

La recolecta de especímenes para el presente proyecto se realizó bajo el amparo del permiso marco otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) de Colombia a la Universidad Industrial de Santander, según lo estipula la resolución 0260 del 11 de marzo de 2016. Dicho documento se ajusta a las especificaciones del decreto 1376 del 27 de junio de 2013 expedido por el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. Así mismo, conforme al parágrafo 5 de este decreto,

el presente proyecto no configura un permiso especial de acceso a material genético, pues involucra actividades de investigación en las áreas de sistemática molecular, ecología molecular, evolución y biogeografía.

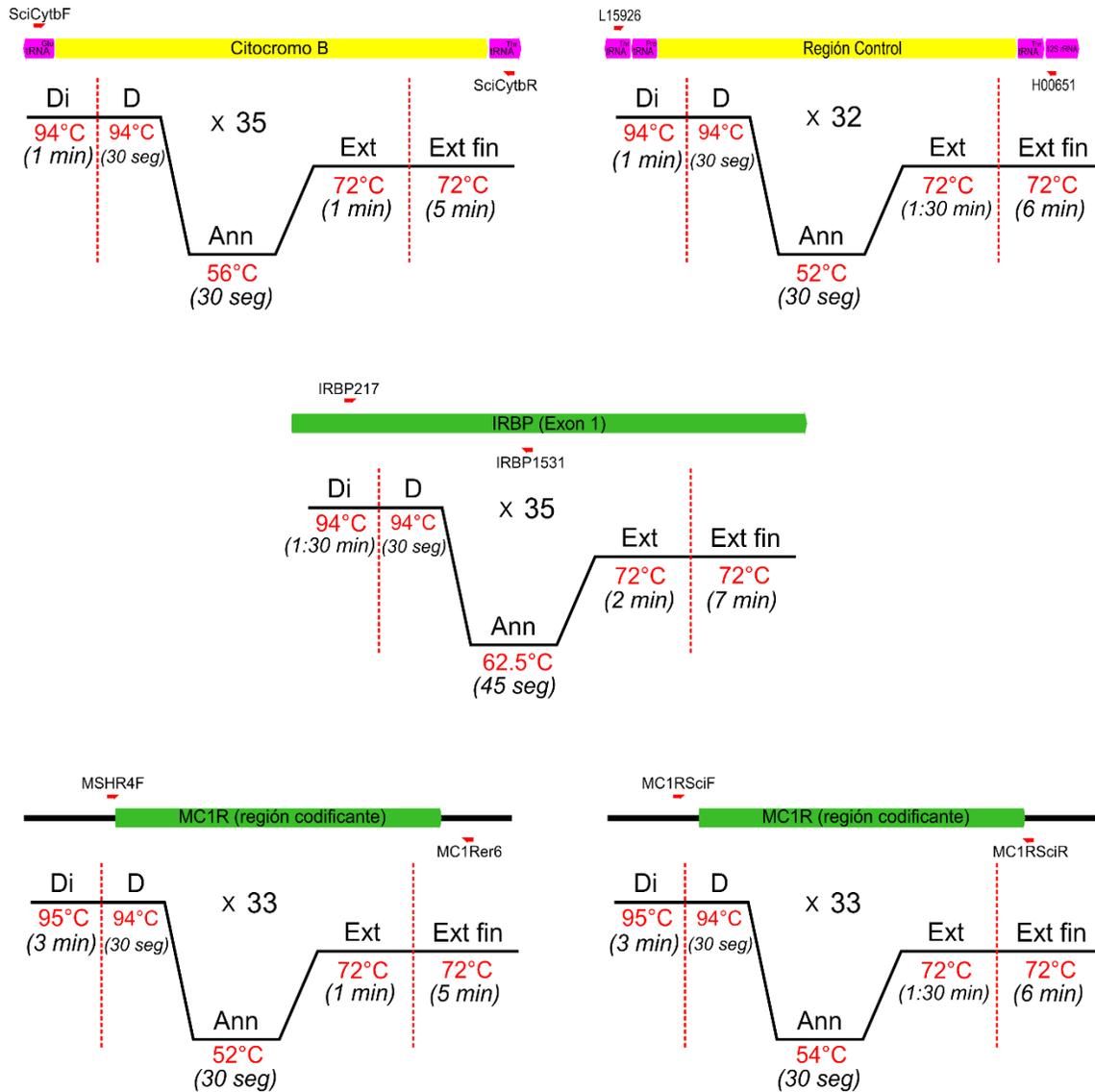
La ardilla de cola roja, *Notosciurus granatensis*, no se encuentra registrada en el listado de especies silvestres amenazadas de la diversidad biológica colombiana consignado en la resolución N° 1912 de 2017 (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible). Así mismo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) considera que se trata de una especie ampliamente distribuida, con poblaciones estables y con tolerancia a una gran variedad de hábitats, razón por la cual no se incluye en la lista roja de especies amenazadas a nivel mundial. Según lo anterior, se presume que el impacto generado por las recolectas del presente proyecto fue mínimo para las poblaciones de las localidades visitadas en Colombia.

Sobre los individuos obtenidos se tomaron datos cualitativos, tales como patrón de coloración del pelaje, sexo y estado reproductivo, así como las respectivas medidas morfométricas estándar definidas para mamíferos [Longitud Cabeza Cuerpo (LCC); Longitud Cola (LC); Longitud Pata (LP); Longitud Oreja (LO), Peso (Pe)]. Paralelamente, se realizó la extracción de tejido fresco a partir del hígado, corazón y músculo esquelético, garantizando unas condiciones mínimas de esterilidad en el entorno; los fragmentos extraídos fueron debidamente almacenados en etanol al 96 %. Posteriormente se realizó el montaje en seco o en líquido de todos los especímenes resultantes, para su disposición final en la Colección de Mamíferos del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander. Esta colección se encuentra registrada ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt” de acuerdo con el procedimiento establecido en el artículo 7 del decreto 1375 del 27 de junio de 2013, expedido por

el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, en el cual se reglamentan las colecciones biológicas.

La preparación de especímenes, la extracción y la fijación de tejidos se realizaron siguiendo los procedimientos estándar para mamíferos definidos y consignados en el trabajo de Nagorsen y Peterson (1980). Estos se llevaron a cabo en los laboratorios de la Escuela de Biología, ubicados en el edificio de Livianos de la Universidad Industrial de Santander. Para garantizar las condiciones de bioseguridad se siguieron las recomendaciones del trabajo de Mills *et al.* (1998) para la manipulación de pequeños mamíferos en el contexto de estudios virológicos. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta las especificaciones del Manual de Laboratorios de la Universidad Industrial de Santander, con especial atención al manejo, tanto de residuos biológicos (vísceras y pedazos de músculo), como de residuos cortopunzantes (cuchillas quirúrgicas y jeringas). Con todo lo anterior se dio cumplimiento a las disposiciones del diario oficial N° 47.186, correspondiente a la ley 1252, expedido por el Congreso de la República el 27 de noviembre de 2007, y por el cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental referentes a los residuos y desechos peligrosos, y se dictan otras disposiciones. Así mismo, se considera que los espacios de trabajo mencionados cumplen con las condiciones de bioseguridad necesarias para la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, según lo consignado en el título IV de la resolución 8430 de 1993, expedida por el Ministerio de Salud.

**Apéndice B. Marcadores moleculares amplificados, posición relativa de los cebadores y perfiles de termociclado empleados en las reacciones de PCR.**



**RONDA 1**

**RONDA 2**

**Di.** Desnaturalización inicial; **D.** Desnaturalización; **Ann.** Annealing; **Ext.** Extensión; **Ext fin.** Extensión final

Extensión final

**Apéndice C. Puntos de calibración fósil y secundaria utilizados para la construcción de las filogenias escaladas en tiempo.**

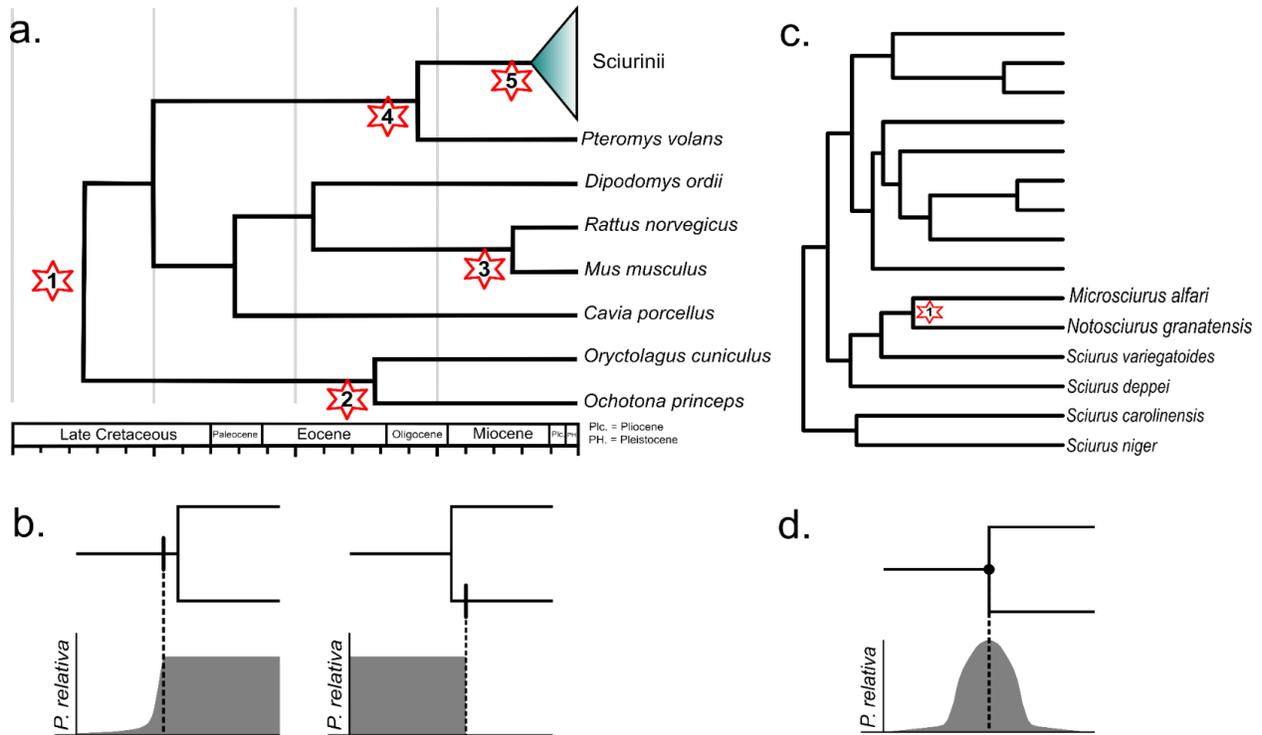
<b>Filogenia interespecífica (Rodentia/Lagomorpha)</b>					
<b># Nodo</b>	<b>Nodo</b>	<b>Límite inferior estricto (Ma.)</b>	<b>Justificación fósil del límite inferior</b>	<b>Límite superior suave (Ma.)</b>	<b>Justificación del límite superior</b>
1	Glires	61.5	<i>Heomys</i> (Rodentia)	131.5	Ausencia de Glires durante el Cretáceo. Fecha basada en la máxima estimación paleontológica para <i>Eomaia</i> y <i>Sindelphys</i> (Archontoglires).
2	Lagomorpha	30	<i>Vastan calcanei</i> (Leporidae, Lagomorpha)	65.8	Ausencia de Lagomorfos en el Paleoceno temprano.
3	Mus/Rattus	10.4	Karnimata (linaje que originó Rattus)	14.0	Ausencia de roedores murinos en el Mioceno temprano.
4	Sciuridae	26.9	<i>Douglassciurus jeffersoni</i> (primer Sciuridae)	65.8	Ausencia de Sciúridos en el Paleoceno temprano.
5	Sciurini	7.5	<i>Sciurus olsoni</i> (primer Sciurini)	13.6	Ausencia de Sciúridos en el Mioceno temprano

---

<b>Filogenia intraespecífica (<i>Notosciurus granatensis</i>)</b>				
<b># Nodo</b>	<b>Nodo</b>	<b>Límite inferior suave (Ma.)</b>	<b>Justificación de los límites inferior y superior suaves</b>	<b>Límite superior suave (Ma.)</b>
<b>1</b>	<i>N.granatensis</i> / <i>M. alfari</i>	2.33	Punto de calibración secundario obtenido a partir de la filogenia interespecífica. Intervalo de edades (95% HDP) del nodo que representa la divergencia entre <i>N. granatensis</i> y su especie hermana candidata <i>M. alfari</i>	4.38

---

**Apéndice D. Nodos calibrados en los análisis filogenéticos con estimación simultánea de tiempos de divergencia.**



**a.** Filogenia interespecífica (modificada de Chaves *et al.*, 2013); **b.** Estrategia de modelamiento de los priores de calibración: límite superior suave (izquierda) y límite inferior estricto (derecha); **c.** Filogenia intraespecífica (modificada de Pecnerová *et al.*, 2015); **d.** Modelamiento del prior de calibración secundario de la filogenia intraespecífica mediante una distribución normal (modificado de Ho y Philips, 2009).

**Apéndice E. Descripciones y fotografías de los individuos recolectados en las diferentes localidades.**

**Localidad 1 (Piojón, Atlántico):** Pelaje de las partes superiores relativamente corto, liso y lustroso, con un tono general naranja-rojizo que se extiende desde la frente hasta el final de la cola; los pelos individuales pueden aparecer uniformemente coloreados de naranja, o tener una base grisácea, una porción medial naranja clara, una porción siguiente más rojiza, e incluso algunos tener una porción distal negra. La entremezcla de estos patrones les confiere a algunas regiones del dorso una apariencia más oscura que la de otras (configuración que puede variar entre individuos de una misma población). Las partes laterales del cuerpo y las extremidades presentan una coloración más clara que la del dorso debido a la predominancia de pelos uniformemente coloreados con naranja, o con una mínima cantidad de tonos rojizos más oscuros. Las partes inferiores exhiben un color blanco puro que se extiende desde la garganta hasta la base de la cola, alcanzando casi la totalidad de la región ventral de las extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad ante-amarillenta. La cola aparece uniformemente coloreada, sin embargo, en vista ventral se distingue que la región medial es de un naranja pálido, que distalmente se convierte en un tono más rojizo; la cantidad de estos dos tonos puede variar entre individuos, por lo que en algunos la cola puede apreciarse más clara que en otros.



Espécimen de *N. granatensis* recolectado cerca de la localidad tipo (localidad 1 en **figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 2 (Minca, Magdalena):** En la localidad 2, los individuos tienen el pelaje de las partes superiores relativamente corto y liso, con un patrón agutí (Hershkovitz, 1947:11) y una tonalidad general no uniforme en la que predomina un naranja-amarillento, el cual se extiende desde la frente hasta la base de la cola; los pelos individuales en su mayoría presentan un patrón de bandas (anulado), con la porción basal grisácea, seguida por una banda más clara que puede ser de un tono amarillento o un tono naranja, luego una banda negra, otra naranja-amarillenta y en algunos casos, una porción apical negra. En algunas partes de la región dorsal se encuentran pelos sin este patrón de bandas en los que el color naranja está más extendido y hay ausencia de partes negras. La entremezcla de ambos tipos de pelos hace que la coloración general del dorso no sea uniforme; usualmente las extremidades anteriores y los hombros aparecen con tonos más naranjas, mientras que el resto exhibe un efecto oliváceo producto del patrón agutí (Hershkovitz, 1947:11). La extensión del tapete naranja de la región escapular y de los hombros varía entre individuos de la misma localidad. Una línea de pelos totalmente anaranjados divide la región dorsal de la ventral; esta última exhibe un color blanco puro que se extiende desde la garganta hasta la base de la cola,

y que cubre buena parte de las extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico, las mejillas, la frente y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo y presenta una tonalidad ante-amarillenta. La base de la cola presenta el mismo patrón agutí de la mayoría de la región dorsal, mientras que en el resto de su extensión aparece uniformemente coloreada de un tono naranja rojizo; en vista ventral la base de los pelos es de un naranja claro, mientras que la región distal de los mismos es más rojiza. En la punta de la cola puede haber pelos totalmente negros, lo que confiere la apariencia de un mechón oscuro.



Especimen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 2 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 3 (Pueblo Bello, Cesar) (sin foto):** Los especímenes de esta localidad son, en apariencia general, similares a los de la localidad 1, en cuanto a que exhiben una tonalidad rojiza casi uniforme desde la frente hasta la punta de la cola. Sin embargo, el pelaje dorsal es más largo, lanoso, menos brillante y a lo largo de la línea media predominan pelos con una amplia banda terminal negra que le confiere a esta región una apariencia mucho más oscura. Las partes laterales, las extremidades y la base de la cola aparecen más claras debido a que esta banda terminal

desaparece y los pelos en su mayoría tienen tonos naranja-rojizos. La región ventral está coloreada de blanco puro, desde la garganta hasta la base de la cola y buena parte de las extremidades, tal y como ocurre en los especímenes de las localidades 1 y 2. El pelaje de la barbilla, el hocico y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-amarillenta a naranja. Las  $\frac{3}{4}$  partes terminales de la cola son de apariencia rojiza, al igual que la línea media del dorso, sin embargo, en vista ventral se distingue que la región medial es más clara, debido a que es más evidente la banda color naranja de los pelos; la punta de la cola es un poco más oscura debido a la presencia de una amplia banda de color negro en los pelos individuales.

**Localidad 4 (El Paso, Cesar):** La apariencia de los especímenes de esta localidad es casi idéntica a la de los especímenes de la localidad 1. El pelaje de las partes superiores también es corto, liso y lustroso, con un tono general naranja-rojizo que se extiende desde la frente hasta la punta de la cola. Sin embargo, hay predominio del tono rojizo, casi vinotinto, sobre el naranja, así como regiones de apariencia más oscura debido a la presencia de una amplia banda terminal de color negro en los pelos individuales. Estas bandas están ausentes en las partes laterales, donde el pelaje se nota un poco más naranja que en las partes dorsales. La región ventral está coloreada de blanco puro, el cual se extiende desde la garganta hasta la base de la cola y buena parte de las extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-amarillenta a naranja. La cola tiene una coloración gradual, que es más similar a la región dorsal en la parte basal, con un tono rojizo-vinotinto, y se hace más clara hacia la parte distal, donde el tono es más rojizo-naranja; en vista ventral se distingue que la línea medial es más clara, debido a que se hace más evidente la banda color naranja de los pelos individuales.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 4 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 5 (Curumaní, Cesar):** Los especímenes de esta localidad, de apariencia general más oscura, contrastan notablemente con los descritos anteriormente de localidades adyacentes (localidades 1-4), en los cuales predominan los tonos claros. El pelaje de las partes superiores es corto, liso y lustroso y exhibe un patrón agutí (Hershkovitz, 1947:11) muy marcado; los pelos individuales presentes desde la nuca hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola tienen bandas bien definidas: la base es grisácea, seguida de una porción amarillenta, luego una porción negra y finalmente una porción naranja, la cual en algunos casos puede continuarse en una pequeña banda terminal negra; las bandas claras de los pelos se hacen más amarillentas hacia la región posterior del dorso. En la frente y la corona los pelos son mucho más cortos, tienen la base grisácea, una porción siguiente naranja-amarillenta o totalmente naranja y una pequeña porción terminal negra; debido a esta configuración, esta región de la cabeza aparece más clara que el resto del dorso. Los hombros contrastan con el resto de las partes dorsales y presentan una coloración naranja-rojiza, la cual se extiende hacia las extremidades anteriores, a lo largo de los costados del cuerpo y las extremidades superiores; en estas partes predominan pelos sin el patrón de bandas, con excepción de la base

grisácea, que son casi en su totalidad anaranjados. Las partes inferiores presentan un color blanco puro, desde la garganta hasta la base de la cola, extendiéndose también hacia buena parte de las extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-amarillenta a naranja. La cola en su primer  $\frac{1}{4}$  es similar a la región dorsal, mientras que en el resto de su extensión aparece coloreada de un tono rojizo, casi vinotinto, que se convierte en un naranja-rojizo hacia la punta; en la región ventral de la misma se evidencia una línea media con predominio de pelos bandeados en la primera mitad, mientras que en la segunda mitad hay más pelos de color naranja claro que se hacen más rojizos terminalmente.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 5 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 6 (Ayacucho, Cesar):** La región anterior del cuerpo de los especímenes de esta localidad se asemeja a la de los especímenes de la localidad 5, en cuanto a la tonalidad general. El pelaje es corto, liso, adpreso y lustroso y el dorso presenta una coloración no uniforme con un patrón agutí que se hace mucho más oscuro hacia la parte posterior; esta zona en particular, así

como el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola, luce prácticamente negra debido a que los pelos individuales son casi en su longitud total negros, con pequeñas bandas de un tono naranja que casi no se pueden apreciar. La región de la frente y la corona contrastan con el resto del dorso debido a que en ellas predominan pelos cortos con una amplia banda de color naranja y una pequeña banda de color negro. Los hombros contrastan con el resto de las partes dorsales y presentan una coloración naranja-rojiza, la cual se extiende hacia las extremidades anteriores, a lo largo de los costados del cuerpo y las extremidades superiores; en estas partes predominan pelos sin el patrón de bandas, con excepción de la base grisácea, que son casi en su totalidad anaranjados. Las partes inferiores presentan un color blanco puro, desde la garganta hasta la base de la cola, extendiéndose también hacia buena parte de las extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico y la región que rodea la oreja es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-amarillenta a naranja. La parte superior de la cola, en su primer  $\frac{1}{4}$ , es similar a la región posterior del dorso, mientras que en el resto de su extensión aparece coloreada de un rojizo-naranja; en vista ventral se puede apreciar una coloración negra a lo largo de la línea media, desde la base hasta la punta, mientras que la parte exterior luce de un tono rojizo-naranja.



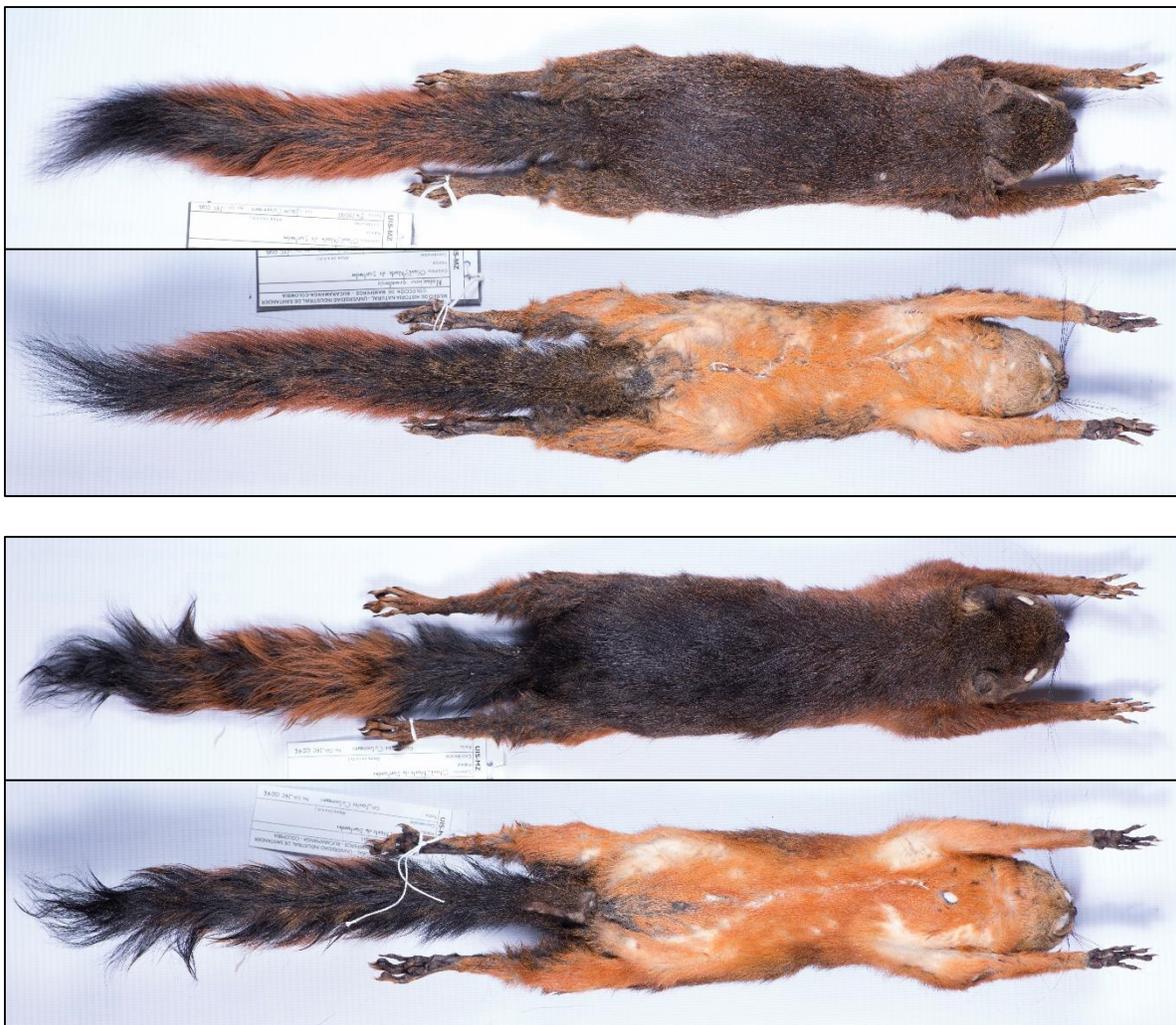
Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 6 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 7 (Otaré, Norte de Santander):** En esta localidad la coloración de las partes superiores varía ligeramente entre individuos. De manera general, en los especímenes recolectados el pelaje es más largo, lanoso, laxo y menos brillante si se compara con el de los especímenes descritos anteriormente; las partes superiores exhiben un patrón agutí en el cual la cantidad y distribución de los pigmentos en los pelos individuales determinan la apariencia general. En algunos especímenes (**primera figura**) se aprecia una coloración olivácea uniforme desde el hocico hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola; dicha tonalidad está dada por la mezcla entre pelos casi totalmente negros, que pueden o no tener una pequeña banda terminal ocrácea, amarillenta o naranja pálido, y pelos con la base gris, seguida de una banda ocrácea, amarillenta o naranja pálido, una amplia banda negra y una banda nuevamente ocrácea, amarillenta o naranja pálido, que puede continuar o no en una pequeña banda terminal negra. La región de los hombros contrasta muy ligeramente y aparece de una tonalidad más anaranjada debido a la disminución del tamaño de la banda negra en los pelos individuales; hacia las extremidades anteriores el contraste se hace mayor ya que predominan pelos con una amplia banda de color naranja pálido. La coloración de los

hombros se extiende por las partes laterales hasta las extremidades posteriores, las cuales no son de apariencia tan anaranjadas como las anteriores. Las partes inferiores, en contraste notable con las de los especímenes descritos anteriormente, están coloreadas uniformemente de un tono naranja pálido, el cual se extiende desde la garganta hasta la base de la cola y buena parte de las extremidades. El pelaje de la barbilla y el hocico es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-amarillenta a naranja muy pálido; se distingue levemente un anillo orbital ocráceo. La cola se puede dividir en 3 porciones diferencialmente coloreadas: el primer  $\frac{1}{4}$  es de apariencia similar a la región dorsal, mientras que la mitad de la cola exhibe una coloración general naranja, mezclada ligeramente con negro, y el  $\frac{1}{4}$  terminal es totalmente negro; en vista ventral, y a lo largo de toda la longitud, se pueden apreciar hacia la línea media pelos con el patrón agutí que hacia las partes exteriores se pintan de un tono naranja encendido.

En otros especímenes (**segunda figura**) de la misma localidad la coloración de las partes superiores es diferente, aunque se conserva en buena medida el patrón agutí. La apariencia general ya no es tan olivácea sino más oscura, sobre todo hacia la línea media de la parte posterior del dorso, donde hay una gran cantidad de pelos individuales totalmente negros. La región de los hombros contrasta notablemente con el resto de la región dorsal por tener una coloración naranja más encendida, la cual resulta de la predominancia de pelos individuales totalmente anaranjados que se extienden también por las extremidades anteriores. El patrón agutí se mantiene desde la frente hasta la parte media del dorso, así como en las partes laterales, siendo estas últimas un poco más anaranjadas. Las partes inferiores están uniformemente cubiertas por pelaje anaranjado, de un tono más encendido que el de los otros especímenes descritos anteriormente para la misma localidad; se pueden apreciar manchas diminutas de pelaje blanco puro en la región abdominal. El pelaje de la barbilla, el hocico es más corto que el del resto del cuerpo, con una tonalidad de ante-

amarillenta a naranja muy pálido; se distingue muy levemente un anillo orbital naranja pálido; en la región supra-auricular se destacan unos parches de color ante-amarillento. La cola también está sectorizada, siendo la porción basal una entremezcla entre pelos totalmente negros y pelos bandeados (lo que da una apariencia general oscura), la porción medial de un tono naranja pálido y la porción terminal totalmente negra; en vista ventral se aprecia el predominio de pelos bandeados con una muy amplia porción negra.



Especímenes de *N. granatensis* recolectados en la localidad 7 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 8 (Puerto Santander, Norte de Santander):** En comparación con los topotipos de la especie (**localidad 1 en figura 3**), los especímenes de esta localidad exhiben el fenotipo más oscuro del total de la muestra recolectada: el pelaje es corto, liso, adpreso y lustroso, en contraste con el pelaje más largo, laxo y lanoso de los especímenes de la localidad anterior, con una coloración no uniforme entre olivácea y negra. En las partes superiores, desde la frente hasta más o menos la región escapular, se aprecia un patrón agutí, el cual está dado por pelos individuales de base oscura, una pequeña banda subterminal amarillenta y una muy pequeña banda terminal negra, que puede o no estar presente. Desde la región escapular hasta la base de la cola estos pelos se vuelven poco frecuentes y se entremezclan con pelos totalmente negros, lo cual confiere a casi todo el espécimen una apariencia negruzca. La región de los hombros contrasta ligeramente y allí predominan pelos bandeados con una porción subterminal de color naranja; esta porción se hace más amplia hacia las extremidades anteriores, dándoles a estas una coloración más anaranjada que la del resto del cuerpo. Por las partes laterales se extiende también el patrón agutí, pero la banda subterminal de los pelos es de color amarillenta, como sucede entre la frente y la región escapular; esta porción de los pelos individuales se torna nuevamente color naranja hacia las extremidades posteriores. El vientre por su parte exhibe una coloración naranja uniforme desde la garganta hasta la base de la cola; hay escasa presencia de pelos totalmente blancos, los cuales no pueden distinguirse a simple vista. La región rostral en general tiene un pelaje muy corto de apariencia entre ante amarillenta a amarillenta, destacándose también un anillo orbital color naranja pálido. El primer  $\frac{1}{4}$  de la cola es de apariencia general oscuro, con pelos bandeados en los que la porción negra predomina; la región medial se aprecia de color naranja pálido entremezclado con negro y la región más distal es totalmente negra. En vista ventral, casi toda la cola se aprecia negra y solo es notable el naranja pálido en la porción terminal de algunos pelos.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 8 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 9 (Santa Rosa del Sur, Bolívar):** La apariencia general es muy similar a la de los primeros especímenes descritos para la localidad 7, en cuanto a que el pelaje tiene un largo y textura similares y se mantiene un patrón agutí casi que uniforme desde la frente hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola. Las partes superiores lucen a simple vista de un tono naranja-rufo, pero la coloración depende de la cantidad y disposición de los pigmentos en los pelos individuales; desde la nuca hacia más o menos la mitad del cuerpo los pelos individuales tienen una base grisácea, una porción siguiente amarillenta, ocrácea o naranja pálido, una porción negra, otra porción amarillenta, ocrácea o naranja pálido y finalmente una banda terminal negra muy pequeña que puede o no estar presente. La región de los hombros y la primera mitad de la línea lateral contrastan ligeramente debido al predominio de un naranja más brillante en la banda subterminal de los pelos; hacia las extremidades anteriores los pelos son casi que completamente anaranjados. Por otro lado, hacia la parte posterior del dorso y la mitad posterior de la línea lateral, la banda subterminal de los pelos es más pálida, generalmente amarillenta, por lo que esta región adquiere una apariencia relativamente olivácea que se mantiene en buena parte de las extremidades posteriores; la porción

terminal de estas es más anaranjada pero no como en las extremidades anteriores. Las partes inferiores están uniformemente cubiertas por pelaje de color naranja intenso desde la garganta hasta casi la base de la cola. La región desde el hocico hasta la nuca es similar a la mitad posterior del dorso, pero con pelaje mucho más corto; así mismo, las mejillas, barbilla y hocico tienen un pelaje más corto de un color ante-amarillento; destaca la presencia de un anillo ocular ocráceo. La cola está dividida en dos secciones bien definidas: el primer  $\frac{1}{4}$  es similar a la región posterior del dorso, sin embargo, la banda de color negro predomina en los pelos individuales; los  $\frac{3}{4}$  terminales son de un color naranja pálido en algunos especímenes o intenso en otros, acompañado de manchones negros que resultan de la banda negra de los pelos individuales. En vista ventral, y a lo largo de toda la longitud, la línea media exhibe un patrón agutí, mientras que el borde exterior tiene un estrato negro subterminal y un estrato naranja intenso terminal; esto da la apariencia de una llamarada.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 9 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 10: (Montelíbano, Córdoba):** Los especímenes de esta localidad tienen el pelaje corto, liso, adpreso y lustroso, con una coloración no uniforme y de apariencia general oscura: en cuanto a las partes superiores, similares a las de los especímenes de la localidad 6 (figura x), hacia la línea media de la región anterior del dorso, entre la nuca y la mitad del cuerpo, predomina un patrón agutí en el que los pelos individuales tienen una base grisácea, una banda siguiente de color amarillento, luego una banda negra y finalmente una de color naranja-rojizo que puede seguirse o no en una pequeña banda de color negro; este patrón se repite hacia la parte exterior de las caderas pero la banda subterminal se hace más pálida, pasando a un tono casi amarillento. La región de los hombros es de un tono naranja-rojizo que contrasta notablemente con el resto del cuerpo; allí predominan pelos individuales totalmente anaranjados. Esta tonalidad contrastante se extiende hacia las extremidades anteriores, las cuales son incluso más rojizas entre los hombros y el codo, y también se extiende hacia las partes laterales, hasta un poco antes de las caderas, donde se vuelve a apreciar el patrón agutí. Desde la mitad del cuerpo hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola se evidencia por la línea media dorsal una especie de banda de color negro con límites poco definidos que está dada por la predominancia de pelos totalmente negros entre pelos bandeados. Las partes exteriores de las extremidades posteriores son de un tono naranja-rojizo similar al de las extremidades anteriores. La región ventral está uniformemente coloreada de un naranja intenso que se extiende desde la garganta hasta casi la base de la cola y las extremidades. El pelaje de la región del hocico, la barbilla y el área que rodea las orejas es más corto y de color ante-amarillento; en la zona de la frente se evidencia un patrón agutí en el que la banda subterminal es amplia y de un tono ocráceo, mientras que, hacia la corona, dicha banda se reduce, lo que le confiere a esta región una apariencia más oscura. La cola luce totalmente negra en su  $\frac{1}{4}$  inicial, naranja pálido en sus  $\frac{2}{4}$  siguientes y nuevamente negra en el  $\frac{1}{4}$  terminal; en la cara ventral se aprecia un patrón agutí por la línea media,

una banda subterminal negra y una banda exterior de un rojizo naranja, exceptuando la región terminal que es totalmente negra.



Especimen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 10 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 11 (El Valle, Chocó):** pelaje corto, liso, adpreso y lustroso, de apariencia general café oscuro. Las partes superiores exhiben una coloración no uniforme, que puede variar ligeramente entre individuos y en la que predomina el patrón agutí; la región entre la frente y la nuca es relativamente homogénea y en ella el patrón agutí está dado por pelos con base grisácea, una banda siguiente de color negro, seguida por una porción subterminal de color entre ocráceo, amarillento y naranja pálido y una banda terminal negra que puede o no estar presente. Este patrón se repite desde la mitad del cuerpo por los flancos hasta las extremidades anteriores, aunque en la región posterior la banda subterminal de los pelos individuales es predominantemente amarillenta. En algunos especímenes, entre la región de la nuca y casi la primera mitad del cuerpo, se puede distinguir un tapete contrastante con una coloración vinotinto que se extiende por los flancos, también hasta la primera mitad del cuerpo, y hacia la región anterior alcanzando las extremidades;

en estas últimas el color vinotinto es más evidente. Un poco después de la región escapular se define claramente una banda media-dorsal negra muy contrastante, de ancho variable, que alcanza prácticamente el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola. Las partes inferiores tienen un tono rojizo-naranja que se extiende desde la garganta hasta casi la base de la cola; se pueden distinguir líneas continuas, manchas o puntos de pelaje de color blanco puro. El pelaje corto que recubre las patas les da una apariencia negruzca. En la región rostral los pelos son más cortos y de un color ante-amarillento; se destaca un anillo orbital con un tono naranja-pálido. La cola es casi que homogéneamente oscura en su primera mitad, con una entremezcla entre pelos totalmente negros y pelos bandeados; la mitad terminal aparece coloreada de un rojizo naranja similar al de la región ventral. Por debajo de la misma predomina el patrón agutí, con una región exterior negruzca en la primera mitad y otra de color rojizo naranja en la segunda mitad.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 11 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 12 (Choachí, Cundinamarca):** los especímenes de esta localidad destacan dentro del total de la muestra por su pelaje muy largo, lanoso, laxo y opaco, el cual tiene un patrón agutí

uniforme que da una tonalidad general olivácea desde el hocico hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola. Los pelos predominantes en las partes superiores tienen una base grisácea muy amplia, seguida de una porción de color ante-amarillento; estos pelos se entremezclan con pelos totalmente negros y con pelos con una base grisácea, una porción siguiente de color negro, otra de color naranja pálido o amarillento y una banda terminal negra que puede o no estar presente. En algunos especímenes, a lo largo de la línea media dorsal hay abundantes pelos negros que confieren una apariencia un tanto más oscura a esta región. Las partes laterales aparecen ligeramente más claras debido a una mayor amplitud de la banda sub-terminal color naranja pálido a amarillento en los pelos individuales. Las extremidades tienen la misma coloración que la región dorsal. En las partes inferiores también se entremezclan pelos de base grisácea amplia y una porción ante-amarillenta, con pelos de base grisácea y el resto de su extensión de color naranja pálido o intenso; la apariencia general de la región ventral es de un tono naranja intenso que va desde la garganta hasta casi la base de la cola. El pelaje de la barbilla, las mejillas y el hocico es más corto y exhibe un color ante; destaca un anillo ocular teñido de naranja pálido. El primer  $\frac{1}{4}$  de la cola es similar en apariencia al resto del dorso, mientras que en el resto de su extensión se aprecia una tonalidad naranja intenso entremezclado de negro; en algunos especímenes la punta de la cola es casi que totalmente negra. En vista ventral predomina el patrón agutí.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 12 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 13 (Ciénaga de Paredes, Santander):** En esta localidad los especímenes exhiben un pelaje corto, liso, adpreso y lustroso, de una apariencia general café oscuro. En las partes superiores predomina el patrón agutí, el cual está dado en su mayoría por pelos de base grisácea, seguida de una banda de color negro, otra de color naranja pálido o naranja intenso y una porción terminal de color negro; estos pelos se entremezclan con pelos totalmente negros, pelos de base negra y ápice de color naranja o naranja intenso, y pelos de base grisácea, una pequeña banda negra y el resto de color naranja intenso. Estos últimos son más frecuentes en la región de los hombros, lo que da la apariencia de un tapete contrastante que se extiende hacia las extremidades anteriores; allí los pelos individuales son en su totalidad de un tono anaranjado intenso. La región posterior del dorso es de una apariencia un tanto más oscura debido a la presencia abundante de pelos totalmente negros, sobre todo hacia la línea media. Las partes laterales son un poco más claras debido a un mayor tamaño de la porción anaranjada en los pelos individuales; en la región anterior el color naranja de dichos pelos es intenso y hacia la región posterior se hace más pálido. Este patrón se extiende hacia gran parte de las extremidades posteriores, las cuales en su porción

terminal son de un tono naranja pálido, en contraste con el tono naranja intenso de las extremidades anteriores. Las partes inferiores son en su mayoría de un color naranja intenso que va desde la garganta hasta la base de la cola y las extremidades; sobresalen algunos pelos largos de color blanco puro dispersos y otros formando una mancha pequeña en la región abdominal y una mancha grande en la región de las axilas, el pecho y la garganta. El pelaje de la barbilla, el rostro y las mejillas es de una tonalidad ante-amarillenta; alrededor de los ojos se evidencia un anillo de color naranja pálido. En la región supra-auricular hay pelos cortos anteados que contrastan con el pelaje de la frente y de la corona. El primer  $\frac{1}{4}$  de la cola es similar en apariencia a la región posterior del dorso, mientras que su extensión restante exhibe un color naranja-amarillento intenso; en vista ventral y a lo largo de toda la longitud predomina el patrón agutí por la línea media, con una banda negra rodeándolo y hacia el exterior una banda de color naranja intenso.

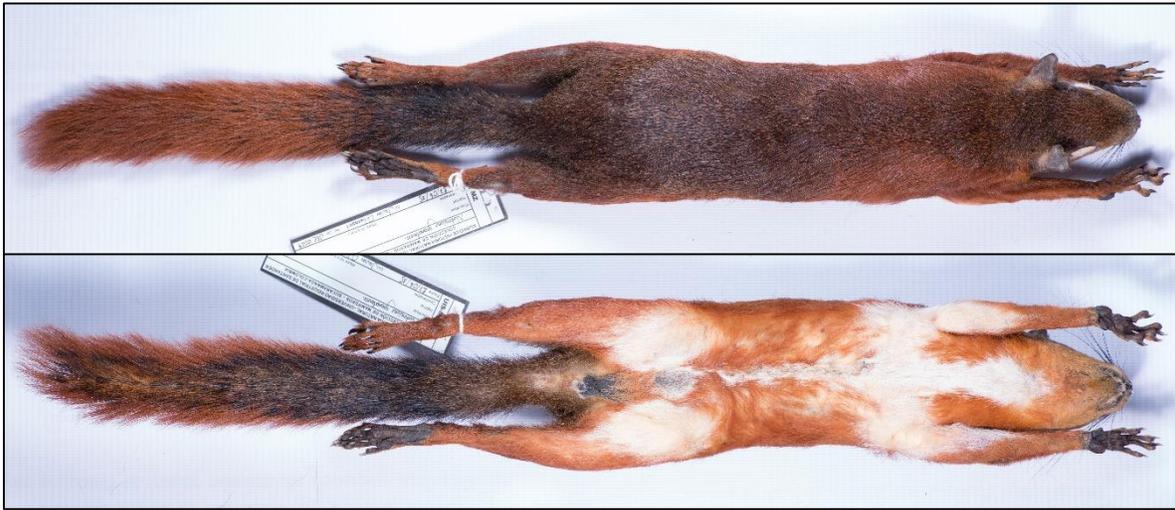


Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 13 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 14 (Barrancabermeja, Santander):** los especímenes de esta localidad tienen un pelaje liso, lustroso, corto y muy adpreso, con un patrón agutí muy marcado (las bandas de los

pelos muy notorias) y una coloración general entre naranja-amarillenta y café-anaranjada. La cantidad y distribución de los pigmentos en los pelos de las regiones superiores difiere entre individuos, tornándose unos un tanto más rojizos que otros. El patrón agutí predomina desde el hocico hasta poco después de la corona, así como en la mitad posterior del dorso, parte de las extremidades posteriores y el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola: en estas regiones los pelos individuales tienen base grisácea, seguida por una banda de color naranja pálido, una de color negro, de nuevo una banda de color naranja pálido y finalmente una banda terminal de color negro que en algunos pelos puede estar ausente. En la región interescapular las bandas de color naranja pálido son reemplazadas por bandas más amplias y de color naranja intenso, lo cual genera un contraste respecto al resto de las partes superiores. Dicho contraste se hace más evidente hacia los hombros y las extremidades anteriores, donde predominan pelos con un tono anaranjado intenso. En la mitad anterior de las partes laterales hay mayor presencia de pelos totalmente anaranjados, mientras que en la mitad posterior predomina un patrón agutí similar al de la región dorsal, aunque las bandas de color naranja pálido son reemplazadas por bandas un tanto más amarillentas. Las partes inferiores son casi en su totalidad de un color naranja intenso que se extiende desde la garganta hasta la base de la cola; sobresalen algunos pelos largos y dispersos de color blanco puro, y otros formando líneas o manchas de extensión y amplitud variable en garganta, pecho, abdomen y extremidades. El pelaje de la barbilla, el hocico y las mejillas es de una tonalidad ante-amarillenta o incluso color salmón en algunos especímenes; alrededor de los ojos se evidencia un anillo de color naranja pálido. En la región supra-auricular hay pelos cortos anteados que contrastan con el pelaje de la frente y de la corona. La cola en vista dorsal exhibe un patrón agutí similar al de la región posterior del dorso en su  $\frac{1}{4}$  proximal; en algunos individuos el  $\frac{1}{4}$  siguiente aparece negro debido a una amplia banda de este color en los pelos individuales, mientras que en el resto de su

extensión puede ser de un color naranja pálido o naranja intenso. En vista ventral el patrón agutí se extienden por la línea media a lo largo de toda la longitud y hacia los márgenes se aprecian una banda negruzca seguida por una banda de tonalidad naranja pálido o naranja intenso.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 14 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 15: (Sabana de Torres, Santander):** En esta localidad los especímenes adultos tienen un pelaje corto, liso, adpreso y muy lustroso, con un tono general oliváceo-café no uniforme. En las partes superiores predomina el patrón agutí: desde la frente hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola, la mayoría de los pelos individuales tienen una base grisácea que se continúa con una amplia banda negra, una banda más estrecha de color amarillo-naranja y una banda terminal de amplitud variable y de tonalidad negra. En la mitad posterior del dorso estos pelos bandeados se entremezclan con pelos totalmente negros, formando una banda media-dorsal difusa. La región de los hombros presenta una tonalidad contrastante debido a que las bandas subterminales de los pelos individuales son más amplias y tienen un color naranja intenso, a la vez que hay presencia de pelos totalmente anaranjados que se extienden también hacia las extremidades anteriores. Las partes laterales tienen

la misma apariencia del dorso, y este patrón se extiende hacia buena parte de las extremidades posteriores; la región de los metatarsos es de apariencia anaranjada. Las partes inferiores están uniformemente coloreadas de un naranja intenso. El pelaje de la barbilla, el hocico y las mejillas es de una tonalidad ante-anaranjada y alrededor de los ojos se evidencia un anillo de color naranja pálido. En la región supra-auricular hay pelos cortos anteados que contrastan con el pelaje de la frente y de la corona. En vista dorsal el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola exhibe el mismo patrón agutí que predomina en el dorso, mientras que en el resto de su extensión predomina un tono naranja intenso similar al de las partes inferiores; en el  $\frac{1}{4}$  terminal los pelos individuales tienen una amplia banda negra que da una apariencia general más oscura. En vista ventral el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola es uniformemente agutí, mientras que, en la extensión restante, este patrón solo permanece hacia la línea media bordeado por una banda negruzca y una banda exterior de un color naranja intenso. En un espécimen juvenil recolectado en esta misma localidad, el pelaje es mucho menos lustroso y más uniforme, en tanto que la región de los hombros contrasta en menor medida y no hay indicios de una banda media-dorsal. Así mismo, el tono claro de la cola es más bien un naranja-rojizo y el  $\frac{1}{4}$  terminal de la misma es más negruzco.



Espécimen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 15 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 16 (Uribe Uribe, Santander) (sin foto):** Los especímenes de esta localidad son de apariencia similar a los de la localidad anterior, con un pelaje corto, liso y adpreso, pero menos lustroso, y una coloración general olivácea-café no uniforme. Los pelos bandeados predominan en las partes superiores y en su mayoría constan de una porción basal grisácea, seguida de una banda negra, una banda amarillenta o naranja intenso y una banda terminal negra, que puede estar ausente; este patrón agutí se hace más evidente desde la frente hasta la mitad anterior del dorso. Desde allí, y hasta la base de la cola, hay entremezcla con pelos totalmente negros, lo cual da la apariencia de una banda medial difusa. La región escapular y de los hombros contrasta levemente del resto de las partes superiores, debido al predominio del tono amarillento o naranja intenso en los pelos individuales; este contraste se extiende por las partes laterales, pero se hace más evidente hacia las extremidades anteriores, las cuales están recubiertas casi en su totalidad por pelos unicoloreados y con tonos desde el amarillo-naranja hasta el naranja intenso. En las extremidades posteriores, el pelaje de los muslos mantiene el patrón agutí de las partes laterales, mientras que hacia la región de los metatarsos se hace más uniforme por la presencia de pelos totalmente anaranjados. Las partes inferiores son de un tono anaranjado uniforme y de intensidad variable, que se ve interrumpido por parches o líneas de color blanco puro que se localizan sobre todo hacia la garganta y las axilas. El pelaje de la barbilla y la región rostral es más corto y de un color ante-anaranjado, destacándose un anillo orbital naranja-pálido. En la región supra-auricular hay pelos cortos anteados que contrastan con el pelaje de la frente y de la corona. La cola es similar a la región posterior del dorso en su  $\frac{1}{4}$  inicial, mientras que en la porción siguiente está coloreada de un naranja intenso que termina en un parche negruzco hacia la región apical.

**Localidad 17 (El Playón, Santander):** Los especímenes de esta localidad son de apariencia similar a los de las localidades anteriores, presentando un pelaje corto, liso, y un tanto lustroso,

con una coloración general café-olivácea que varía ligeramente entre individuos; esta variación depende de la cantidad y distribución de los pigmentos en las bandas de los pelos individuales. Las partes superiores son casi que uniformes y en ellas predomina el patrón agutí, el cual está dado por pelos con una base grisácea, que se continua con una banda negra, una banda entre amarillo-naranja y naranja intenso, y una porción terminal negra que puede estar ausente. Hacia la región posterior del dorso hay presencia en menor proporción de pelos totalmente negros, los cuales en entremezcla con los pelos bandeados conforman una región más oscura pero que no alcanza a formar una banda media-dorsal. La región de los hombros es ligeramente más clara y contrastante, ya que allí predominan pelos con una amplia banda de color naranja-amarillento a naranja intenso; este contraste se extiende hacia las extremidades anteriores, en las cuales también se pueden encontrar pelos totalmente anaranjados. En las partes laterales se evidencia un gradiente en la intensidad del color de las bandas sub-terminales de los pelos, siendo estas de un anaranjado intenso en la mitad anterior del cuerpo y de un amarillo-naranja en la mitad posterior y parte de las extremidades posteriores; la región de los metatarsos está forrada tanto por pelos cortos bandeados, como por pelos cortos totalmente anaranjados, y exhibe tonalidades que varían entre especímenes. Las partes inferiores están cubiertas en su totalidad por un pelaje naranja-rojizo, que se extiende desde la garganta hasta la base de la cola y la parte interna de las extremidades. En la barbilla y la región rostral los pelos son muy cortos y tienen una tonalidad ante anaranjada; se evidencia un anillo ocular de un color anaranjado-pálido. En la región supra-auricular hay pelos cortos anteados que contrastan con el pelaje de la frente y de la corona. El  $\frac{1}{4}$  proximal de la cola exhibe, en vista dorsal, el mismo patrón y la misma coloración de la mitad posterior del dorso, mientras que los  $\frac{2}{4}$  siguientes son de un anaranjado intenso y el  $\frac{1}{4}$  terminal es negro. En vista ventral muestra un patrón agutí marcado por la línea media y bordeado por una banda negra y el

margen exterior de un color naranja intenso; en esta vista también se advierte el  $\frac{1}{4}$  terminal de color negro.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 17 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 18: (Bucaramanga, Santander):** Los especímenes recolectados en esta localidad son de apariencia similar a los de las localidades anteriores, con un pelaje liso y lustroso, pero más largo. Entre la corona y la región escapular, así como en las partes laterales y las extremidades posteriores, predomina el patrón agutí, con pelos individuales de base grisácea, que se sigue de una banda negra, una banda sub-terminal de color naranja pálido a naranja-amarillento y una porción apical negra que puede estar ausente; la amplitud de las bandas varía en las diferentes partes del cuerpo. En las partes superiores, entre la región escapular y la primera porción de la cola, la banda sub-terminal de los pelos es muy pequeña, lo cual, en conjunto con abundantes pelos totalmente negros, da la apariencia de una banda media- dorsal, la cual es más marcada que en los especímenes de las localidades anteriores. Hacia los hombros la banda sub-terminal de los pelos individuales es más amplia y tiene una tonalidad anaranjada intensa, lo que le da a esta región un

ligero contraste con el resto de las partes superiores y laterales; este contraste se extiende hacia las extremidades anteriores. En las partes laterales, hasta las extremidades posteriores, el contraste se reduce ya que la banda sub-terminal es más amarillenta; la región de los metatarsos es igual a las partes laterales del cuerpo. La región ventral está cubierta, desde la garganta, hasta la base de la cola y la parte interna de las extremidades, por un pelaje unicoloreado de color naranja-rojizo; se distinguen pelos totalmente blancos formando parches en el pecho, las axilas y la región abdominal, así como una línea que se extiende desde el pecho hasta el vientre. La región de la barbilla y el hocico tiene pelos cortos de un tono ante-amarillento, que también están presentes en la región supra-auricular a manera de parches; se evidencia un anillo ocular de un color anaranjado-pálido. En vista dorsal la base de la cola es negra, como continuación de la banda media-dorsal, seguida de una pequeña porción con el patrón agutí, 2/3 con una tonalidad anaranjada pálida y finalmente el ápice negro. En vista ventral predomina el patrón agutí por la línea media, en casi toda su longitud, con los márgenes teñidos de un color naranja intenso; la porción terminal aparece totalmente negra.



Espécimen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 18 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

**Localidad 20: (Piedecuesta, Santander) (sin foto):** Los especímenes de esta localidad se asemejan a los de las localidades anteriores en cuanto a la apariencia y la tonalidad general café-olivácea; sin embargo, su pelaje es más largo, laxo y menos lustroso. Las partes superiores son relativamente homogéneas, predominando el patrón agutí desde la frente hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola; los pelos individuales tienen una base grisácea, seguida de una banda negra, una banda sub-terminal de naranja-amarillenta a naranja-intenso y una porción apical negra que puede estar ausente. La línea media del dorso aparece ligeramente más oscura que el resto de las partes superiores debido a la entremezcla de pelos totalmente negros con los pelos bandeados, así como a la reducción de la banda sub-terminal en estos últimos. En cambio, esta banda es más amplia en los pelos de los hombros, lo que en últimas le da a esta región un ligero contraste que se extiende también hacia las extremidades anteriores. La mitad anterior de las partes laterales es similar a la región de los hombros, con predominio del tono naranja-intenso, mientras que hacia la mitad posterior la banda sub-terminal de los pelos individuales es más amarillenta; los muslos presentan este mismo patrón, pero en la región metatarsal hay mayor cantidad de pigmento anaranjado. Las partes inferiores están cubiertas por un pelaje naranja-rojizo que se extiende desde la garganta, hasta la base de la cola y la parte interna de las extremidades; sobresalen pelos de color blanco puro que forman parches en las axilas y la región inguinal, así como una línea que va desde la garganta hasta la región inguinal. En la barbilla, el hocico y la región rostral en general los pelos son cortos y de un tono ante-anaranjado, destacándose también un anillo alrededor de los ojos de color naranja-pálido; hacia la región supra-auricular hay abundantes pelos cortos que contrastan por su coloración antea del resto del pelaje de la cabeza. La cola en su  $\frac{1}{4}$  basal exhibe el mismo patrón agutí de la región posterior del dorso, en sus  $\frac{2}{3}$  siguientes manifiesta una coloración anaranjada intensa y en la porción terminal es totalmente negra. En vista ventral predomina el

patrón agutí bordeado por una banda negra y un margen exterior anaranjado intenso. El  $\frac{1}{4}$  terminal se aprecia totalmente negro.

**Localidad 21 (Santa Bárbara, Santander):** Los especímenes de esta localidad se asemejan a los de la **localidad 12** por su pelaje largo, lanoso, laxo, y opaco, el cual exhibe un patrón agutí casi uniforme que confiere una apariencia general olivácea. En las partes superiores, desde la frente hasta el primer  $\frac{1}{4}$  de la cola, predomina el patrón agutí, con pelos individuales de base grisácea, seguida de una banda negra, una banda sub-terminal que puede ser entre anaranjada y amarillenta, y una porción terminal negra que en algunos pelos está ausente. A lo largo de la línea media y en la parte posterior del cuerpo, hay entremezcla con escasos pelos totalmente negros, pero no se alcanza a definir una banda media-dorsal. La región escapular y de los hombros, la mitad anterior de las partes laterales y las extremidades anteriores contrastan ligeramente del resto de las partes superiores, exhibiendo una tonalidad anaranjada que está dada por un mayor tamaño de la banda sub-terminal en los pelos individuales. Esta banda está reducida y exhibe un color amarillento hacia la mitad posterior del dorso y de las partes laterales, así como en las extremidades posteriores. Las partes inferiores están en su mayoría cubiertas por un pelaje de color naranja intenso que se ve interrumpido por parches de pelos totalmente blancos en las axilas, el pecho, el abdomen y la región inguinal. En el hocico, la barbilla, y en general en la región rostral, los pelos son cortos y de una tonalidad crema; se destaca la presencia de un anillo ocular naranja-pálido. En la región supra-auricular también hay presencia de pelos cortos de color crema que contrastan notablemente con el pelaje de la corona. El primer  $\frac{1}{4}$  de la cola mantiene el mismo patrón agutí que la región posterior del dorso, mientras que los  $\frac{2}{3}$  siguientes son de un anaranjado intenso y el  $\frac{1}{4}$  terminal de color negro. En vista ventral predomina el patrón agutí casi a lo largo de toda la longitud de la

cola, bordeado por una banda negruzca y el margen exterior color naranja intenso; en esta vista la porción terminal también se aprecia de color negro.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 21 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

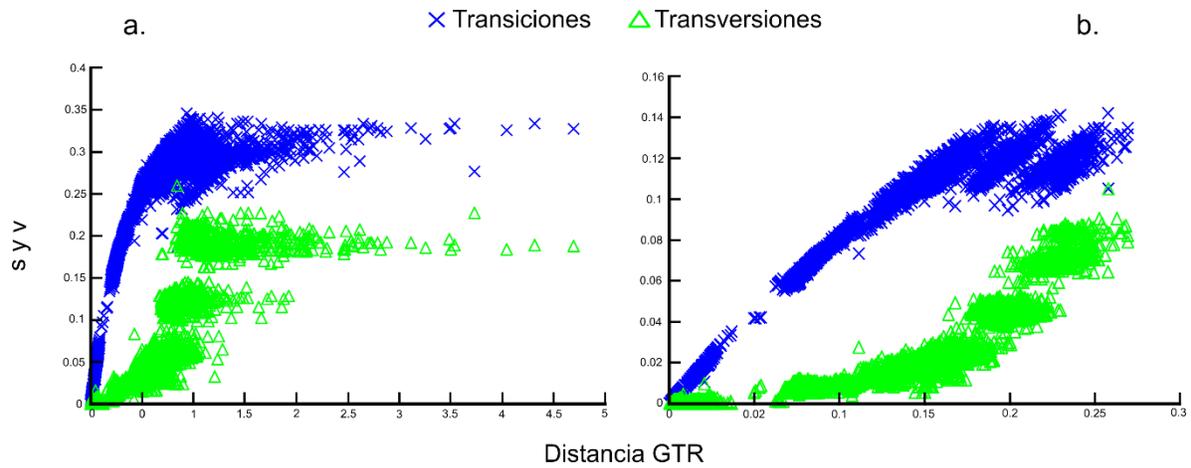
**Localidad 23 (San Vicente de Chucurí, Santander):** Los especímenes de esta localidad se asemejan a los de la **localidad 14**, con un pelaje liso, lustroso, pero un poco más largo, y con una coloración general café-anaranjada. En las partes superiores el pelaje exhibe un patrón agutí muy marcado, pero que no es uniforme, con pelos individuales de base grisácea, seguida de una banda que puede ser entre amarillenta y naranja-rojizo, una banda negra, una banda sub-terminal entre amarillenta y naranja-rojizo y una porción terminal negra que puede estar ausente en algunos pelos. Entre el frente y la nuca, así como en la mitad posterior del dorso, la banda sub-terminal es casi siempre amarillenta y su amplitud está reducida; en cambio, en la región escapular y de los hombros esta banda es más amplia y con un tono anaranjado-rojizo. En esta zona también hay entremezcla de pelos bandeados con abundantes pelos unicolores que exhiben un tono naranja-rojizo, lo que confiere un contraste que puede variar en intensidad entre diferentes especímenes.

Este contraste se extiende también hacia las extremidades anteriores, las cuales difieren notablemente del resto del cuerpo con una coloración naranja-rojiza muy intensa. La mitad anterior de las partes laterales tienen una tonalidad intensa similar a la de la región escapular, mientras que la mitad posterior es más similar a la parte posterior del dorso; las extremidades posteriores mantienen este patrón. Las partes inferiores pueden estar cubiertas en su totalidad por un pelaje naranja-rojizo, o en algunos especímenes pueden apreciarse pelos totalmente blancos dispuestos en parches localizados o formando una línea media entre la garganta y la región inguinal. El pelaje de la barbilla, el hocico y el resto de la región rostral es corto y con una coloración que puede variar entre ante-amarillenta y ante-anaranjada; bordeando el ojo hay un anillo de tonalidad naranja-rojiza. La cola en su porción basal conserva el patrón agutí y la coloración de la región posterior del dorso; a esta porción le sigue una pequeña banda de apariencia negruzca, y el resto de la extensión es de un tono anaranjado-rojizo. En vista ventral se asemeja a una llama, con el patrón agutí extendido por toda la longitud en la línea media y bordeado por una banda negruzca y el margen exterior naranja-rojizo.



Especímen de *N. granatensis* recolectado en la localidad 23 (**figura 3**); **arriba:** vista dorsal; **abajo:** vista ventral

Apéndice F. Gráfico de transiciones y transversiones vs distancia genética GTR para el marcador *Cytb*



**a.** Análisis para el tercer codón; **b.** Análisis general.