

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

A circular phylogenetic tree (cladogram) showing the relationships within the tribe Abrotrichini. The tree is centered around a small circle, with numerous branches radiating outwards to the perimeter. The branches are represented by lines of varying thickness, indicating different levels of support or evolutionary distance. The overall structure is complex and dense, typical of a large-scale molecular phylogenetic analysis.

***Sistemática molecular de la tribu
Abrotrichini (Rodentia: Cricetidae)***

Informe de Pasantía

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Genética y Evolución

Autor: Daiana Mir

Orientador: Dr. Enrique P. Lessa

Noviembre, 2010

Agradecimientos

A Enrique P. Lessa por darme la oportunidad de realizar ésta pasantía y sobretodo porque no importando sus coordenadas geográficas, sus respuestas a mis dudas evolutivas siempre llegaron de una manera sorprendentemente rápida y amena.

A mis compañeros del laboratorio, Carolina Abud la cual me brindó su ayuda desde mi primer día de laboratorio hasta hoy, Alejandro "Passer" D'Anatro muchas veces un amparo vespertino, Sabrina Riverón mas que nada por su amistad, Cecilia Da Silva por sus valiosos aportes y su elegancia de persona, Ivanna H. Tommasco (un referente) por sus imprescindibles correcciones a éste informe y su alegría contagiosa y muy especialmente a Matias Feijoo, por su aporte diario a éste trabajo, por su estímulo y fuente de confianza, por ser brújula y pilar...no hay palabras Mati, gracias.

A mis amigos, por su aliento y amistad. En particular a Laura, por sus aportes a éste trabajo, pero mas que nada porque siempre me tuvo fe.

A mi familia, por su eterno apoyo, paciencia y respaldo a mi carrera y a mi vida. En especial a mi madre, que me legó la pasión por el estudio y una fuerza movilizadora de montañas y miedos, sin la cual nunca hubiera llegado a ésta meta.

Hay gente que estuvo durante todo el proceso, y hay otra que estuvo en etapas concretas del mismo. Todos fueron importantes, si alguno de ellos faltara, ésta realidad que se me presenta, seguro hubiera sido diferente y sin embargo, el camino que tomó, no lo cambiaría

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1 La tribu <i>Abrotrichini</i> : Generalidades y Sistemática	2
Objetivos.....	8
1 Objetivo general	8
2 Objetivos específicos	8
Materiales y Métodos	9
1 Especímenes estudiados.....	9
2 Trabajo de laboratorio.....	9
3 Análisis de datos.....	10
3.1 Análisis de secuencias.....	10
3.2 Análisis filogenético.....	11
Resultados	15
1 Porcentajes de divergencia	15
2 Análisis filogenético con FGB-I7.....	16
3 Análisis filogenético con Adh1I2.....	17
4 Análisis filogenético con Ins1.....	17
5 Evidencia total	18
Discusión.....	23
1 Relaciones entre especies de <i>Abrothrix</i>	23
2 Unidades principales dentro de <i>Abrothrix</i>	24
3 Los abrotriquinos fosoriales	25
4 Metodologías	26
5 Consideraciones finales	26
Bibliografía	28
Apéndice 1	36
Apéndice 2	38

Resumen

A partir del nuevo esquema de clasificación de los géneros de roedores sigmodontinos sudamericanos en el que se identificó por primera vez un grupo supragenérico (Smith y Patton 1999) al cual se diagnosticó formalmente como tribu Abrotrichini (D'Elía 2007), varias contribuciones han ido mejorando la sistemática de éste clado.

Sin embargo aún existen muchas incongruencias en todos los géneros que componen dicha tribu, por lo que se requiere de análisis que permitan resoluciones más detalladas del estatus taxonómico de sus miembros.

Por tal motivo, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de intrones de los genes *Adh1*, *FGB* e *Ins1* de veintinueve roedores pertenecientes a la subfamilia Sigmodontinae. Los individuos incluidos en el estudio comprenden representantes de los cinco géneros de la tribu Abrotrichini y de otras tres agrupaciones supragenéricas.

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas mediante análisis Bayesiano y por el criterio de Máxima Verosimilitud para cada uno de los marcadores individualmente. También se realizó un análisis Bayesiano para la matriz de secuencias concatenadas.

Se obtuvieron reconstrucciones filogenéticas en su mayoría con buenos apoyos estadísticos y concordantes con las reportadas en la bibliografía, así como evidencia a favor de nuevas relaciones entre especies de la tribu Abrotrichini no incluidas en análisis filogenéticos previos.

Los resultados sugieren una futura revisión sistemática del género *Abrothrix*, ya que si bien es monofilético, presenta una marcada división en dos linajes que podrían representar dos géneros independientes. En lo que respecta a los géneros fosoriales del clado abrotriquino, queda planteada la necesidad de una futura evaluación de la posible coespecificidad entre *Pearsonomys* y *Geoxus*. Particularmente en lo que respecta a *Geoxus*, se obtuvieron grandes porcentajes de divergencia entre individuos colectados al norte y al sur de la Patagonia, que apoyarían hipótesis planteadas en análisis previos de una subdivisión del género (Lessa et al. 2010).

Dado que ha sido propuesta una larga asociación entre la historia evolutiva de la tribu Abrotrichini y el continente sudamericano (Lessa et al. 2010), el presente trabajo espera contribuir desde un punto de vista sistemático, al conocimiento de la diversidad de especies de nuestra región y sus relaciones evolutivas.

Introducción

1 *La tribu Abrotrichini: Generalidades y Sistemática*

La familia Cricetidae comprende un grupo de roedores de distribución mundial, siendo la subfamilia Sigmodontinae un linaje que se diferenció de modo independiente en Sudamérica (Reig 1981; Lanzone y Ojeda 2005). Con aproximadamente 74 géneros (Musser y Carleton 2005), la subfamilia Sigmodontinae es el conjunto más diverso y complejo de mamíferos del Nuevo Mundo y el segundo a nivel global luego de la subfamilia Murinae que comprende las ratas y ratones del Viejo Mundo (D'Elía et al. 2007a).

Hace ya más de una década desde que Smith y Patton (1999) presentaron, a partir de secuencias del gen mitocondrial del citocromo b, un nuevo esquema de clasificación de los géneros de roedores sigmodontinos sudamericanos. A través del mismo se identificó por primera vez un nuevo grupo supragenérico al cual denominaron en ese entonces Clado Andino (Smith y Patton 1999). El Clado Andino reunía taxones distribuidos principalmente en el centro y sur de los Andes, a los cuales clásicamente se los había considerado parte de la tribu Akodontini (Reig 1987; Musser y Carleton 1993). Fue a partir del estudio de Smith y Patton (1999) que quedó sugerido el reordenamiento de este grupo de géneros a nivel de tribu y que se propuso que Abrotrichini sería el nombre apropiado para la misma.

La tribu Abrotrichini formada por los géneros *Abrothrix* (Waterhouse 1837); *Chelemys* (Thomas 1916); *Notiomys* (Thomas 1890); *Geoxus* (Thomas 1919); y *Pearsonomys* (Patterson 1992), ha sido recientemente diagnosticada como una tribu válida de roedores sigmodontinos (D'Elía et al. 2007b).

En los últimos años varias contribuciones han ido mejorando la sistemática de Abrotrichini (Rodríguez-Serrano et al. 2008a; Feijoo et al. 2010; D'Elía et al.

2006b). Todas coinciden en la primera dicotomía que revela al género *Abrothrix* como hermano del resto de los géneros de la tribu. Dentro del grupo monofilético que contiene al resto de los abrotrichinos, se ubican *Geoxus*, *Notiomys* y *Pearsonomys*, formando un clado del cual *Chelemys* es su grupo hermano. Estos últimos géneros también llamados “de garras largas” son considerados fosoriales. Dado que de las 380 especies de la subfamilia Sigmodontinae sólo 7 son fosoriales, la pertenencia de 4 de ellas a la tribu Abrotrichini le brinda una característica única (Rodríguez-Serrano et al. 2008b).

Actualmente el género *Pearsonomys* comprende sólo una especie, *P. annectens* (Patterson 1992) descrita en base a un sólo individuo obtenido en 1970 en la X Región de Chile. En su descripción del género, Patterson lo presenta como una especie primitiva de ratón dentro de los de “garras largas”, dado que sus especializaciones para la vida fosorial son incipientes o rudimentarias

En el año 2006, D’Elía et al. presentan una descripción de cariotipo, dentición y morfología de pene y estómago de *P. annectens*. En el mismo trabajo se muestra un análisis filogenético basado en secuencias de ADN nuclear enfocado a comprobar la posición filogenética del taxón. Los autores concluyen que *Pearsonomys* es similar morfológicamente a *Geoxus*, su hipotético taxón hermano (Smith y Patton 1999). Ambos tienen una capucha dorsal en la glándula peneal, carácter notable conocido únicamente para dichos dos taxones. También comparten un cariotipo $2n=56$ y sus dientes y estomago son de la misma clase (D’Elía et al. 2006b). Por lo anterior, presentan sus dudas acerca de la validez de *Pearsonomys* como género, indicando que *P. annectens* podría representar una especie de *Geoxus*. Aunque en ese entonces no se sugirió formalmente el cambio taxonómico, se consideró que la cuestión debería ser analizada en el contexto de una revisión general de la tribu.

Con el fin de contribuir a la comprensión de la diversidad, distribución e historia biogeográfica de los mamíferos de la Patagonia, Lessa et al. (2010), profundizan en el estudio de la fragmentación y colonización postglacial durante la historia biogeográfica de los roedores de la Patagonia y Tierra del Fuego. En dicho trabajo se utilizan secuencias de ADN mitocondrial de 14 especies de roedores sigmodontinos. De dichas especies, nueve apoyan hipótesis de expansión demográfica desde un lugar fuente restringido, representando una unidad filogeográfica continua. Otras cuatro presentan fragmentación dentro de la región, teniendo más de una unidad filogeográfica bien diferenciada. *Geoxus valdivianus* (Philippi 1858) es una de las cuatro especies para las cuales se encuentra fragmentación filogeográfica. Para ella se advierten dos clados diferentes (al norte y al sur de la Patagonia) los cuales no son hermanos y difieren en un 10%, planteándose la posibilidad de que los mismos representen especies diferentes.

Chelemys es un género en el que actualmente se consideran tres especies (Musser y Carleton 2005) cuyos linajes no están adecuadamente evaluados. El número cromosómico diploide de individuos de *C. macronix* (Thomas 1894) colectados en Mendoza fue $2n=54$ (Ojeda et al. 2005). Sin embargo, individuos de la misma especie de la provincia de Río Negro (Argentina) presentaban $2n=52$ (Pearson 1984). Es necesaria la realización de estudios adicionales con el fin de dilucidar si esta variación implica diferencias a nivel específico.

Notiomys es un género monotípico, siendo *Notiomys edwardsii* (Thomas 1890) su única especie representante. Contando con escaso número de registros, es una de las especies cuya biología y taxonomía es todavía muy pobre. Actualmente se ha reconocido su distribución geográfica entre los 41°S y 50°S, abarcando las provincias argentinas de Santa Cruz, Chubut y Río Negro (Pardiñas et al. 2008). Dado el escaso número de muestras, no existen estudios sobre la variabilidad geográfica intrapoblacional de esta especie que, a juzgar por sus aptitudes fosoriales y su extensa distribución, posiblemente

involucre más de una entidad taxonómica (Pardiñas 2003). Los resultados presentados por Pardiñas et al. (2008) estarían indicando que *N. edwardsii* exhibe variabilidad geográfica tanto a nivel molecular como morfológico, aunque estudios adicionales serían necesarios para establecer límites a nivel de especie entre sus poblaciones.

El género *Abrothrix* ha sido clásicamente considerado como subgénero de *Akodon* [Osgood (1943), Thomas (1916), Waterhouse (1837)] pero subsiguientes revisiones han elevado su rango a género. Actualmente se consideran 8 especies dentro de *Abrothrix*. De las mismas, 6 se incluyen en este trabajo. *Abrothrix jelskii* (Thomas, 1894) y *Abrothrix herskovitzi* (Patterson, Gallardo y Freas, 1984), son las dos especies que restaría incluir para tener una cobertura completa del género.

Abrothrix olivaceus (Waterhouse 1837), es una de las formas más abundantes dentro del Clado Andino (Reig 1986) presentando un rango de distribución a lo largo de la mayor parte de Chile y de la Patagonia Argentina (18°S a 54°S) desde el nivel del mar hasta los 1.000m de altura sobre el mismo (Serrano et al. 2006).

Abrothrix andinus (Philippi 1858) se presenta desde el sur de Perú hasta el noroeste de Argentina y Chile hasta los 34°S (Muñoz-Pedreros 2000) y usualmente sólo se encuentra por encima de los 3.500m de altura sobre el nivel del mar en el Altiplano Andino (Woods y Kilpatrick 2005).

Ha sido propuesto que la diferenciación de *A. olivaceus* ha ocurrido vía especiación peripátrida a partir de *A. andinus* (Palma et al. 2005). La hipótesis postulada, propone que *A. olivaceus* comenzó a diferenciarse a partir de *A. andinus* en las regiones de la Puna y pre-Puna Andina, dispersándose hacia alturas al nivel del mar y que las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, habrían impulsado la formación de refugios locales, restringiendo los rangos de

distribución y finalmente provocando la especiación.

El apoyo para ésta hipótesis de aislamiento periférico, se basa en el hecho de que *A. andinus* y *A. olivaceus* son taxones hermanos y que trabajos filogeográficos recientes muestran a *A. andinus* como taxón basal de *A. olivaceus* (Smith et al. 2001)

En lo que respecta a *Abrothrix lanosus* (Thomas 1897), el mismo se encuentra geográficamente distribuido al extremo sur del continente en Tierra del Fuego y el oeste de la Provincia de Santa Cruz. Feijoo et al. (2010) dejaron planteada la dualidad de su ubicación filogenética como grupo hermano de *Abrothrix jelskii* (Thomas 1894) utilizando datos de citocromo b, mientras que el uso de secuencias nucleares de genes de IRBP sitúa esta especie junto a *Abrothrix longipilis* (Waterhouse 1837). Serían necesarios trabajos adicionales con otros marcadores nucleares para dilucidar el estado taxonómico de *A. lanosus* dentro del género.

A. longipilis es la especie tipo del género *Abrothrix* y a lo largo de su rango geográfico de ocupación (30°S a 52°S), se reconocen una variedad de subespecies (Palma et al. 2010). Angel E. Spotorno (1992) reporta que tanto *A. longipilis* como *Abrothrix sanborni* (Osgood 1943) presentan morfología peniana simple, sin báculo distal, en contra de la hipótesis dicotómica mantenida en ese entonces, contraponiendo a los cricétidos de América del Norte, de pene simple con los de América del Sur y América Central de pene complejo (Carleton 1980). La morfológica peniana simple, junto a varias características craneodentales homólogas (Spotorno 1992) y análisis filogenéticos basados en marcadores mitocondriales (Spotorno 2000), plantearon también dudas de la posible coespecificidad entre *A. longipilis* y *A. sanborni*. Recientemente se ha presentado por primera vez una validación molecular en base a marcadores nucleares y mitocondriales de *A. sanborni* como especie (Palma et al. 2010).

Más allá de la determinación de *A. lanosus* y *A. sanborni* como especies y no como subespecies de *A. longipilis* (Mann 1978), se aprecia que estas tres

especies se apartan en varias características del resto de las especies consideradas dentro del género *Abrothrix* (Feijoo 2010).

Abrothrix illuteus (Thomas 1925), tiene un escaso rango de distribución en el noroeste argentino, abarcando las provincias de Tucumán y Catamarca (Díaz 1999; Mares *et al.* 1997). Es la especie con la distribución geográfica más al norte dentro del género *Abrothrix*. Hasta el momento se sigue a la espera de estudios moleculares que la incluyan.

Por lo expuesto anteriormente se hace necesaria una revisión general de la sistemática de la tribu Abrotrichini con miras a una mayor comprensión de su diversidad e historia evolutiva.

Objetivos

1 Objetivo general

Evaluación de la sistemática de la tribu Abrotrichini a partir de análisis genéticos basados en tres marcadores nucleares.

2 Objetivos específicos

- Extracción de ADN.
- Puesta a punto de la técnica de amplificación por PCR de regiones del genoma nuclear, específicamente intrones de genes codificantes para proteínas.
- Amplificación por PCR.
- Alineamiento y comparación secuencias de ADN (obtenidas de servicios de secuenciación automática).
- Análisis de los niveles de variación de las secuencias de ADN.
- Análisis filogenético.
- Interpretación de resultados en el contexto de la información disponible.

Materiales y métodos

1 Especímenes estudiados

Las muestras fueron obtenidas de la colección de tejidos del Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias, a las cuales se sumaron donaciones específicas. Los detalles de procedencia se encuentran en la Tabla 1 y grafican en la Figura 1.

Se utilizaron 29 especímenes que incluyen representantes de cada uno de los cinco géneros que comprende la tribu Abrotrichini. Individuos de otros tres clados de sigmodontinos fueron empleados como grupo externo. Los individuos utilizados como grupo externo representan al grupo monogénico Reithrodontini y a dos tribus clásicas de sigmodontinos, como son Akodontini y Phyllotini.

2 Trabajo de laboratorio

Las extracciones de ADN fueron realizadas a partir de tejidos conservados en alcohol 95%. Dichas muestras fueron sometidas a digestión por proteinasa K, precipitación salina (NaCl) de proteínas y precipitación alcohólica (isopropanol) de ADN, siguiendo un protocolo modificado de Miller *et al.* (1988) (ver Apéndice1).

Se amplificaron por PCR (Saiki *et al.*, 1988) fragmentos de tres loci nucleares: Adh1, Ins1 y FGB (ver Recuadro 1). Los detalles y secuencias de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 2.

Las condiciones generales de ciclado y las concentraciones de reactivos que se utilizaron, se detallan en las Tablas 3 y 4. Dichos valores fueron modificados en las especies que así lo requirieron. Se corroboró la intensidad de amplificación así como el tamaño de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% en TBE 1X, los cuales fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados con luz UV (ver Apéndice). La

secuenciación (únicamente en sentido 5'-3') fue llevada a cabo por Macrogen Inc.

3 *Análisis de datos*

3.1 *Análisis de secuencias*

Se obtuvieron un total de 66 secuencias repartidas entre los tres intrones, a las cuales se le sumaron 11 más gracias a la colaboración del Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción, Chile. Las 77 secuencias totales de ADN se editaron usando el programa Proseq3 (Filatov 2002).

La separación de haplotipos para aquellas secuencias con un solo polimorfismo se hizo a ojo, mientras que para aquellas con mayor número de sitios polimórficos fueron probadas todas las combinaciones posibles de alelos y se corroboró si alguno de ellos cambiaba de lugar en la filogenia final obtenida para su correspondiente intrón. Una vez confirmada la ausencia de diferencias en las filogenias obtenidas para dichas combinaciones de alelos, se utilizó el código IUPAC en los sitios polimórficos de la secuencia original. Dada la gran complejidad presentada por la secuencia obtenida de *A. sanborni* (a) para el intrón de Adh (10 sitios polimórficos), sus haplotipos fueron modelados mediante un criterio de Parsimonia, minimizando el número de alelos. Dicho criterio, fue basado en los sitios polimórficos compartidos con *A. sanborni* (b) y en los estados de carácter del resto de las secuencias del alineamiento, para aquellos sitios en los que *A. sanborni* (a) presentaba un polimorfismo.

El alineamiento se realizó mediante el programa ClustalX (Thompson et al. 1997) con los parámetros por defecto y se corroboró la identidad de las secuencias mediante BLAST (Altschul et al. 1990). Los caracteres constantes, polimórficos y filogenéticamente informativos se visualizaron utilizando el programa MEGA versión 4.0 (Tamura. et al. 2007).

3.2 Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas separadamente para cada uno de los intrones según el criterio de Máxima Verosimilitud (MV) (Felsenstein 1981). Se realizaron también análisis Bayesianos (AB) por separado para cada uno de los intrones y para la matriz concatenada de los mismos (evidencia total o congruencia de carácter) (Rannala y Yang 1996).

El análisis filogenético según MV fue realizado mediante el programa MEGA 5.0 vBeta 6.1 (Tamura. et al. 2010). El modelo estadístico HKY85 (Hasegawa et al. 1985) + Gamma fue el usado para la corrección de las sustituciones múltiples de las secuencias para los alineamientos de Fibrinógeno y Adh. Para el alineamiento correspondiente al intrón de Insulina se utilizó el modelo K80 (Kimura, 1980) + Gamma. Dichos modelos fueron elegidos de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike (AIC; Akaike 1974) mediante ModelGenerator v. 0.85 (Keane et al. 2006).

En todos los casos los espacios fueron eliminados antes del comienzo del análisis y los caracteres fueron tratados como no ordenados y de igual peso. Los árboles obtenidos fueron enraizados según el criterio del grupo externo y se determinó la confianza estadística de cada uno de sus nodos calculando los valores de “bootstrap” con 1.000 réplicas (Felsenstein 1985).

El análisis Bayesiano fue llevado a cabo con MrBayes v3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para la matriz concatenada se determinaron particiones correspondientes a cada uno de los loci.

Para las tres particiones se ajustó la estructura del modelo evolutivo mediante $\gamma=4$ y $Iset=2$, cuya ejecución abarca tanto el modelo HKY como el K80.

La probabilidad posterior de cada uno de los árboles filogenéticos (así como de otros parámetros del modelo de sustitución) fue estimada por MCMCMC (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo) en dos corridas independientes, cada una con tres cadenas de Markov calientes y una fría (usando valores de temperatura por defecto).

Tabla 1. Especímenes utilizados, con sus respectivas coordenadas de muestreo, lugar de colecta, y voucher.

(a, b, c) Corresponden a diferentes individuos de la misma especie.

(*) Individuos cuyas secuencias fueron donaciones del Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción, Chile.

	ESPECIE	LATITUD SUR	LONGITUD OESTE	PROCEDENCIA GEOGRÁFICA	VOUCHER
1	<i>Chelemyx macronix a</i>	48.37	72.09	Estancia La Ensenada, Sta. Cruz, Argentina.	PNG 627
2	<i>Chelemyx macronix b</i>	42.16	68.27	Estancia Talagapa, Chubut, Argentina.	PNG 195
3	<i>Abrothrix olivaceus a</i>	48.99	70.27	Estancia Cerro Ventana, Sta. Cruz, Argentina.	PNG 805
4	<i>Abrothrix olivaceus b</i>	53.32	68.4	Estancia San Martín, Tierra del Fuego, Argentina.	PNG 361
5	<i>Abrothrix olivaceus c</i>	42.16	68.27	Estancia Talagapa, Chubut, Argentina.	PNG 203
6	<i>Geoxus valdivianus a</i>	48.37	72.09	Estancia La Ensenada, Sta. Cruz, Argentina.	PNG 649
7	<i>Geoxus valdivianus b *</i>	40.15	72.25	Ruta Futrono-Llifén, XIV Región, Chile.	GD 1240
8	<i>Geoxus valdivianus c *</i>	40.78	71.66	Sendero Pla Quetrihué, Neuquén, Argentina	LTU 290
9	<i>Abrothrix longipilis a</i>	45.48	72.66	Aysén, XI Región, Chile.	GD 1005
10	<i>Abrothrix longipilis b</i>	41.45	66.9	Cerro Corona, Río Negro, Argentina.	PNG 165
11	<i>Abrothrix longipilis c</i>			Valle Hermoso, Mendoza, Argentina	RAO 127
12	<i>Abrothrix lanosus a</i>	54.82	68.33	Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.	PNG 458
13	<i>Abrothrix lanosus b</i>	54.82	68.33	Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.	PNG 506
14	<i>Pearsonomys a</i>	39	73.12	Fundo San Martín, Valdivia, XIV Región, Chile.	FML 672
15	<i>Abrothrix andinus</i>	33.35	70.33	Farellones, XIII Región, Chile.	UWBM 49048
16	<i>Notiomys edwardsii a</i>	47.53	68.3	Ea. Laguna Manantiales, Sta. Cruz, Argentina.	G5 T01
17	<i>Notiomys edwardsii b *</i>	41.42	66.957	Somuncura, Río Negro, Argentina.	AA31
18	<i>Abrothrix illuteus a</i>	26.32	65.61	Trancas, Tucumán, Argentina.	JPJ 993
19	<i>Abrothrix illuteus b *</i>	26.32	65.61	Trancas, Tucumán, Argentina.	JPJ 1411
20	<i>Abrothrix sanborni a</i>	43.11	73.94	Chiloé, Parque Tantauco, X Región, Chile.	GD 1147
21	<i>Abrothrix sanborni b</i>	43.12	73.95	Chiloé, Parque Tantauco, X Región, Chile.	GD 1154
22	<i>Reithrodon auritus a</i>	53.32	68.39	Río Grande, Tierra del Fuego, Chile.	PNG 376
23	<i>Reithrodon auritus b</i>	42.67	70.09	Piedra Parada, Chubut, Argentina.	PNG 1344
24	<i>Reithrodon auritus c</i>	42.71	70.07	Campo de Cretón, Chubut, Argentina.	PNG 1319
25	<i>Phyllotis xanthopygus a</i>	41.45	66.9	Cerro Corona, Río Negro, Argentina.	PNG 167
26	<i>Phyllotis xanthopygus b</i>	41.67	67.15	Subida del Naciente, Río Negro, Argentina.	PNG 173
27	<i>Phyllotis xanthopygus c</i>	43.71	70.35	Estancia Quichaura, Chubut, Argentina.	PNG 325
28	<i>Akodon iniscatus a</i>	43.62	66.38	Piedra Grande, Chubut, Argentina.	PNG 1003
29	<i>Akodon iniscatus b</i>	43.73	67.27	Las Plumas, Chubut, Argentina.	PNG 1037

Tabla 2. Descripción de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de ADN.

locus	oligonucleótido	secuencia	origen
Adh1-I2	2340-I	5'-GTAATCAAGTGCAAAGCAGCTG-3'	Amman et al. (2006)
	2340-II	5'-TAACCACGTGGTCATCTGAGCG-3'	
FGB-I7	FGB_17 ma mmL	5'-ACCCCAGTAGTATCTGCCGTTTGGATT-3'	Matocq et al. (2007)
	Wb-mammU	5'-CACAAACGGCATGTTCTTCAGCAC-3'	Wickliffe et al. (2003)
Ins1-I2	InsB-F	5'-TGGTGTGTGGGGAGCGTGGCTTCTTCTACA-3'	E. P. Lessa (com. personal)
	InsA-R	5'-GAGCGAGCAGATGCTGGTGCAGCACTGATC-3'	

Tabla 3. Condiciones generales de ciclado para la amplificación de los loci. El número de ciclos de amplificación para cualquiera de los tres intrones fue de 30. *10 ciclos 54°C - 10 ciclos 52°C - 5 ciclos 48°C - 5 ciclos 47°C

Ciclado	Adh1-I2	FGB-I7	Ins1-I2
Desnat. inicial	95	95	95
Desnat.	94	94	94
Asociación	Touch down *	60	55
Extensión	72	72	72
Ext. final	72	72	72

Tabla 4. Concentraciones sugeridas de reactivos para la reacción de PCR .

	Reactivo	Conc. final deseada	Vol. en mezcla de 30ml
Adh1-I2	dNTPs	0.2	0,3
	oligo F	0.3	0,45
	oligo R	0.3	0,45
	MgCl2	2.5	1,5
	ADN polimerasa	0.08	0,24
FGB-I7	dNTPs	0.2	0,6
	oligo F	0.2	0,6
	oligo R	0.2	0,6
	MgCl2	2.5	3
	ADN polimerasa	0.08	0,48
Ins1-I2	dNTPs	0.2	0,6
	oligo F	0.3	0,9
	oligo R	0.3	0,9
	MgCl2	2.5	3
	ADN polimerasa	0.08	0,48

FGB-I7

Wickliffe et al. (2003) exploraron la utilidad del intrón 7 del locus del beta fibrinógeno presentando evidencia de que la variación en este locus entre especies de mamíferos cercanamente relacionadas sería adecuada para contribuir al entendimiento de las relaciones evolutivas a nivel intragenérico. Las secuencias de ADN de FGB-I7 obtenidas por Wickliffe et al. presentaron un largo comprendido entre 511 a 628pb. y formaron filogenias con índices de consistencia que indicaron poca homoplasia.

Ins1-I2

En contraste con otros mamíferos estudiados en los cuales fue encontrada sólo una copia del gen Insulina, el gen de Insulina en ratas y ratones forma un sistema de dos genes. El sistema de dos genes de Insulina está compuesto por la preproinsulina 2 (Ins2), gen ortólogo al gen de la insulina en otros mamíferos, y la preproinsulina 1 (Ins1) un retrogen específico de roedores. Tanto Ins1 como Ins2 son expresados en el páncreas y ambos codifican péptidos de preinsulina compuestos por cuatro partes: péptido señal, cadena B, péptido C y cadena A. (Meng-Shin Shiao et al. 2008).

Los oligonucleótidos diseñados por E. P. Lessa corresponden al locus Ins1 específico de roedores, asociándose el oligo directo con la región de la cadena B y el oligo reverso con la cadena A, estimándose un largo de secuencia amplificada del segundo intrón de unos 600pb.

Adh1-I2

Los genes de Adh en mamíferos codifican para una enzima que cataliza la oxidación de alcoholes a aldehídos y cetonas. En roedores existen 4 clases de Adh controladas por 6 genes (Adh1, Adh2, Adh3, Adh4, Adh5a y Adh5b). El gen de Adh1 tiene 9 exones y 8 intrones. Los oligos para el segundo intrón del gen de Adh1 (Adh1-I2) fueron diseñados de regiones conservadas de los exones 2 y 3 del gen y amplifican un fragmento de ADN de aproximadamente 650pb. Ha sido probado que el intrón 2 de Adh1 presenta niveles bajos de variación, acompañados por poca homoplasia, lo cual indica que éste marcador podría ser útil para la resolución de relaciones filogenéticas de niveles taxonómicos bajos a intermedios en mamíferos (Amman et al. 2006).

Las corridas fueron de 1.000.000 de generaciones con muestreos a intervalos de 100 generaciones para cada uno de los intrones. Para la concatenación con particiones la corrida fue de 5.000.000 de generaciones con muestreos cada 500 generaciones.

Al análisis de la concatenación le fue ajustada la variabilidad entre las particiones para las tasas de evolución por sitio y se estableció la independencia interparticional para la razón entre las tasas de transiciones y transversiones, el parámetro de forma de la distribución gamma y para las frecuencias estacionarias de los nucleótidos.

El primer 25% de los árboles muestreados fue descartado de todos los análisis y los árboles restantes fueron usados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores para cada clado. Finalmente los árboles fueron graficados en FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

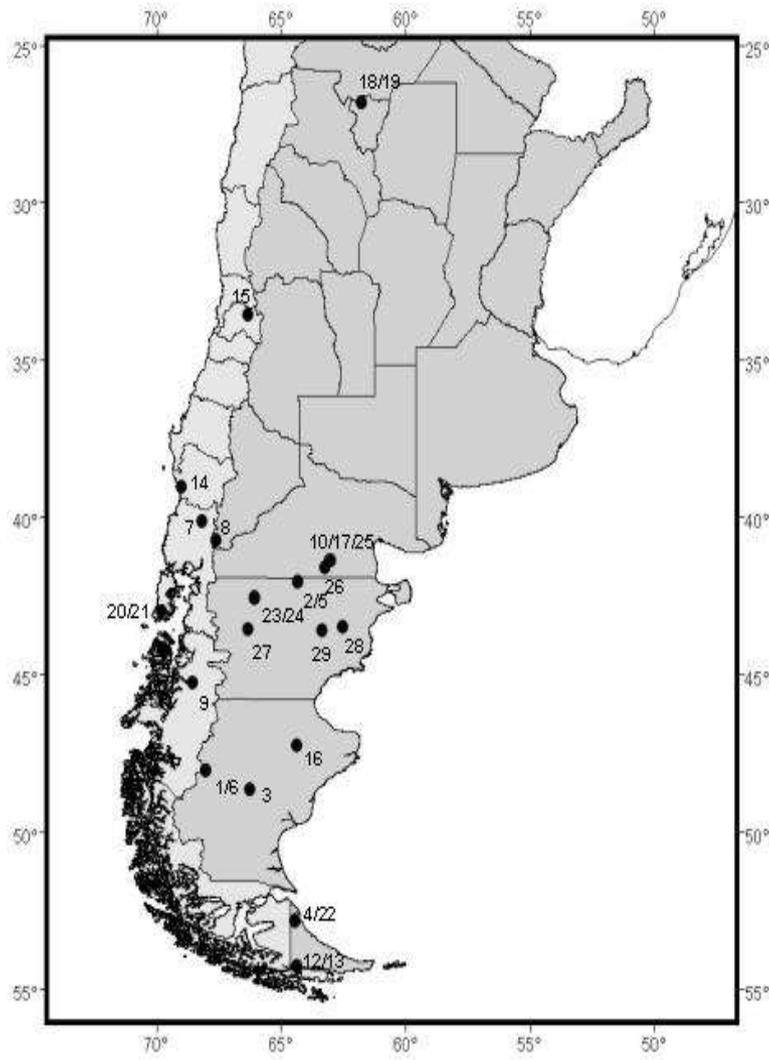
Resultados

1 Porcentajes de divergencia

Se recuperaron hipótesis filogenéticas altamente concordantes entre los dos métodos implementados en éste estudio para cada uno de los marcadores utilizados. El análisis de evidencia total reporta una divergencia evolutiva máxima de 4,2% entre las especies de la tribu Abrotrichini (ver Apéndice 2).

Los porcentajes de divergencia promedio intra tribu Abrotrichini, para el análisis individual de los intrones de Fibrinógeno, Adh e Insulina fueron de: 2,7%, 1,6% y 1,5% respectivamente.

Fig. 1. Ubicación geográfica de los especímenes utilizados.



- ESPECIE
- 1) *Chelemyx macronix* a
 - 2) *Chelemyx macronix* b
 - 3) *Abrothrix olivaceus* a
 - 4) *Abrothrix olivaceus* b
 - 5) *Abrothrix olivaceus* c
 - 6) *Geoxus valdivianus* a
 - 7) *Geoxus valdivianus* b *
 - 8) *Geoxus valdivianus* c *
 - 9) *Abrothrix longipilis* a
 - 10) *Abrothrix longipilis* b
 - 11) *Abrothrix longipilis* c
 - 12) *Abrothrix lanosus* a
 - 13) *Abrothrix lanosus* b
 - 14) *Pearsonomys* a
 - 15) *Abrothrix andinus*
 - 16) *Notiomys edwardsii* a
 - 17) *Notiomys edwardsii* b *
 - 18) *Abrothrix illuteus* a
 - 19) *Abrothrix illuteus* b *
 - 20) *Abrothrix sanborni* a
 - 21) *Abrothrix sanborni* b
 - 22) *Reithrodon auritus* a
 - 23) *Reithrodon auritus* b
 - 24) *Reithrodon auritus* c
 - 25) *Phyllotis xanthopygus* a
 - 26) *Phyllotis xanthopygus* b
 - 27) *Phyllotis xanthopygus* c
 - 28) *Akodon iniscatus* a
 - 29) *Akodon iniscatus* b

2 Análisis filogenético con FGB-17

Para el intrón de Fibrinógeno, se alinearon un total de 31 secuencias nucleotídicas con un largo total de 679 caracteres. De éstos, 528 caracteres fueron constantes, 151 variables y 141 filogenéticamente informativos.

Las relaciones filogenéticas sugeridas tanto por el criterio de MV (Fig.2A) como por el análisis Bayesiano (Fig.2B) para éste intrón, recuperan fuertemente la monofilia de la tribu Abrotrichini y marcan la dicotomía principal de la misma entre el grupo fosorial y el género *Abrothrix*.

Tanto la probabilidad *a posteriori* como el apoyo de bootstrap son mayores para la agrupación monofilética del género *Abrothrix* que para la que comprende los linajes fosoriales.

Dentro del género *Abrothrix* se establecen las conocidas afinidades entre *A. lanosus* /*A. longipilis* /*A. sanborni* con un 94% de apoyo de bootstrap y Pp=1. La unión entre las especies de *A. olivaceus*/*A. andinus* /*A. illuteus* no se presenta consistentemente resuelta bajo ninguno de los dos análisis.

Para el grupo fosorial según los dos análisis, se obtienen las agrupaciones reconocidas desde la diagnosis de la tribu (D'Elía et al. 2007b) que consisten en *Notiomys* /*Geoxus* y *Pearsonomys* (57%, Pp=0,82) por un lado y *Chelemys* como grupo hermano (64%, Pp=0,83).

3 Análisis filogenético con Adh1-l2

El estudio para el intrón de Adh abarcó 23 secuencias nucleotídicas y 614 caracteres. Se observaron 541 caracteres constantes, 73 variables y 49 filogenéticamente informativos.

El análisis por MV señala una gran politomía basal de todas las especies de *Abrothrix* rescatando únicamente las afinidades intraespecíficas de *A. lanosus* (Fig. 3A). Con respecto al clado fosorial el mismo se presenta con un sólido apoyo de 98% de bootstrap al contrario de lo que ocurre para el intrón de Fibrinógeno, el cual presenta mayor apoyo para la monofilia del clado *Abrothrix*. Las relaciones sugeridas por el análisis Bayesiano para Adh1-l2, son muy similares a las presentadas por el criterio de MV, con poca resolución a nivel de las especies de *Abrothrix* y probabilidades a posteriori en el clado fosorial con fuertes apoyos (Fig. 3B).

4 Análisis filogenético con Ins1

Se obtuvieron 23 secuencias para el intrón de Insulina y un alineamiento de 557 nucleótidos de largo. En el alineamiento se identificaron 413 caracteres constantes, 120 variables y 48 filogenéticamente informativos. Las estimaciones filogenéticas bajo los dos criterios utilizados convergieron en topologías esencialmente idénticas (Fig.4 A y 4B), presentando mejor soporte

para el nodo que une los géneros fosoriales el análisis Bayesiano ($Pp=0.94$) que el criterio de MV (78% de apoyo de bootstrap). El linaje *Abrothrix* se muestra con bajos valores de apoyo en su base; sin embargo las agrupaciones *A. andinus*/ *A. illuteus*/ *A. olivaceus* y *A. longipilis*/ *A. lanosus*/ *A. sanborni*, presentan fuerte apoyo en cualquiera de los dos análisis.

5 Evidencia total

El análisis Bayesiano de la concatenación llevado a cabo con 29 secuencias nucleotídicas de 1850 pb de largo, recupera relaciones muy bien resueltas y fuertemente apoyadas en la mayoría de los casos (Fig.5).

El alineamiento cuenta con 1486 caracteres constantes, 340 variables y 236 filogenéticamente informativos.

La dicotomía principal de la tribu (géneros fosoriales vs género *Abrothrix*) se obtiene con alto apoyo ($Pp=1$) para ambas ramas. En un nivel más inclusivo, dentro del clado *Abrothrix* se muestran con fuerte apoyo las relaciones de *A. sanborni* y *A. lanosus* formando un clado con *A. longipilis* como grupo hermano y por otro lado *A. olivaceus* junto a *A. andinus* teniendo como grupo hermano a *A. illuteus*. Para el clado fosorial se presenta mediante éste análisis (así como en el resto de las filogenias obtenidas) a *Geoxus* que es parafilético con respecto a *Pearsonomys*.

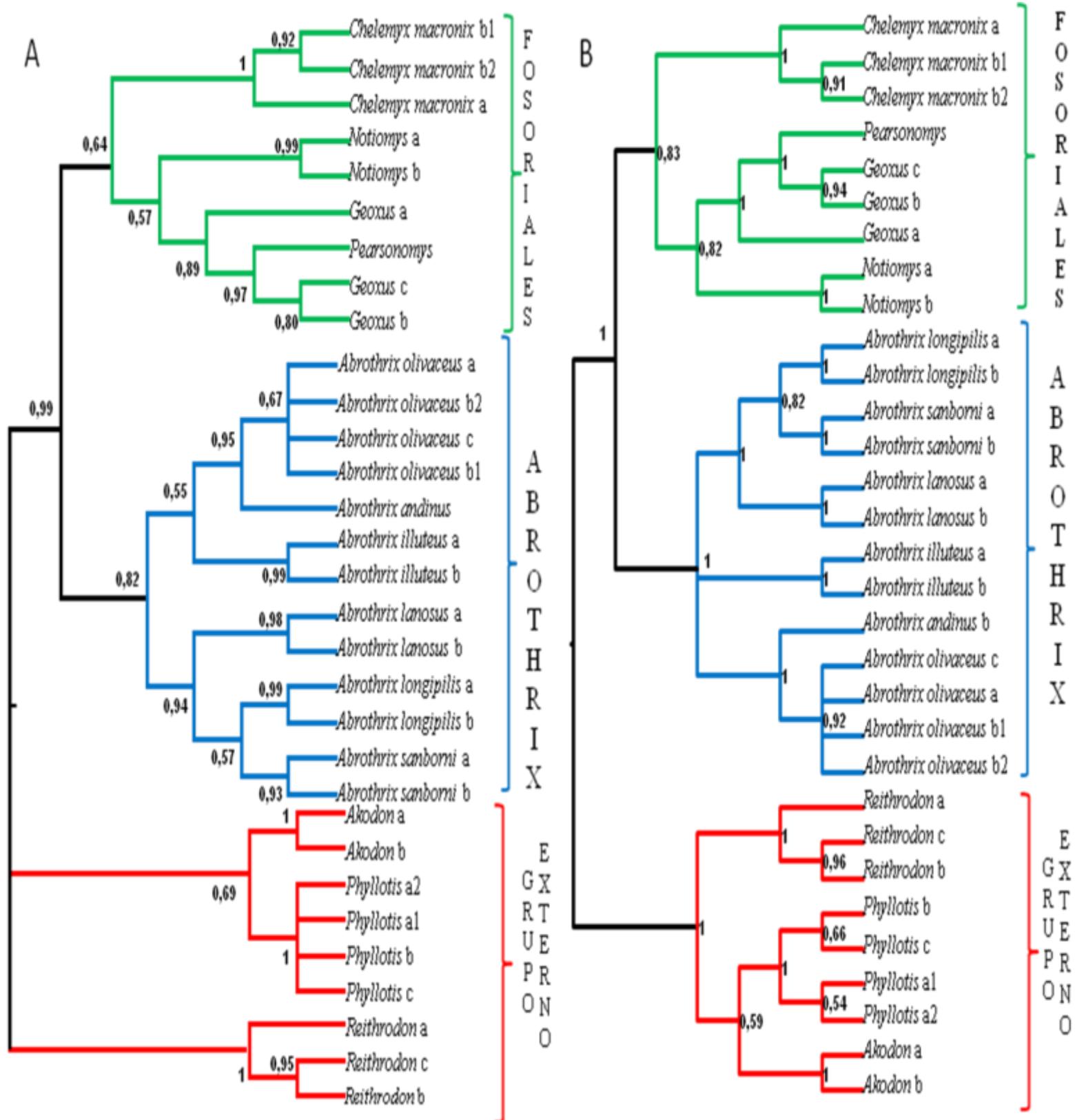


Fig.2. Filogenias estimadas con el intrón de Fibrinógeno. (A) Según criterio de Máxima verosimilitud bajo el modelo HKY+G. Los números indican valores de 1.000 réplicas de bootstrap. Sólo valores de bootstrap mayores al 50% son mostrados. (B) Según Análisis Bayesiano con 1.000.000 de generaciones y muestreos a intervalos de 100. Los números sobre los nodos indican probabilidades posteriores.

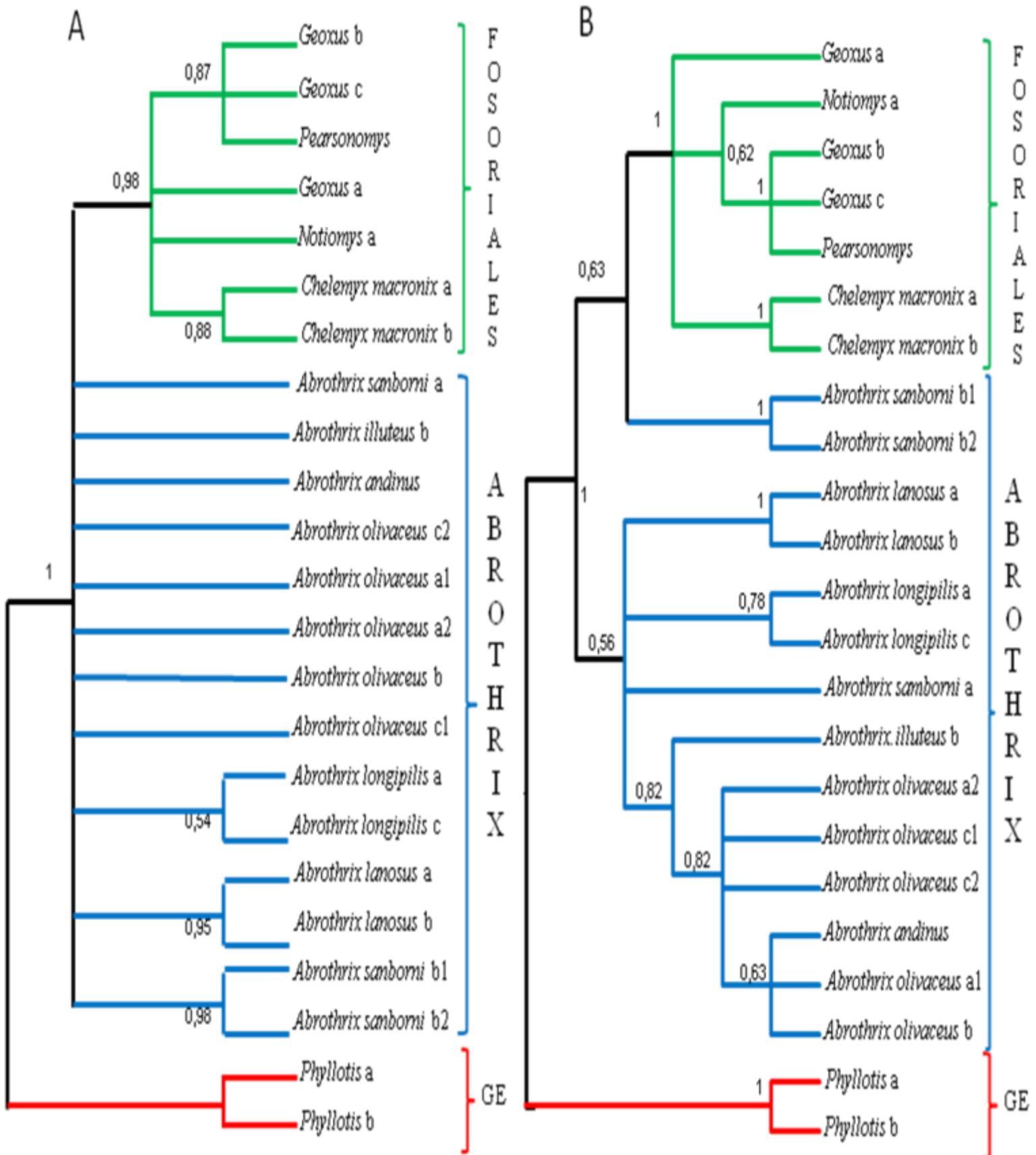


Fig. 3. Filogenias estimadas con el intrón de Adh. (A) Según criterio de Máxima verosimilitud bajo el modelo HKY+G. Los números indican valores de 1.000 réplicas de bootstrap. Sólo valores de bootstrap mayores al 50% son mostrados. (B) Según Análisis Bayesiano con 1.000.000 de generaciones y muestreos a intervalos de 100. Los números sobre los nodos indican probabilidades posteriores.

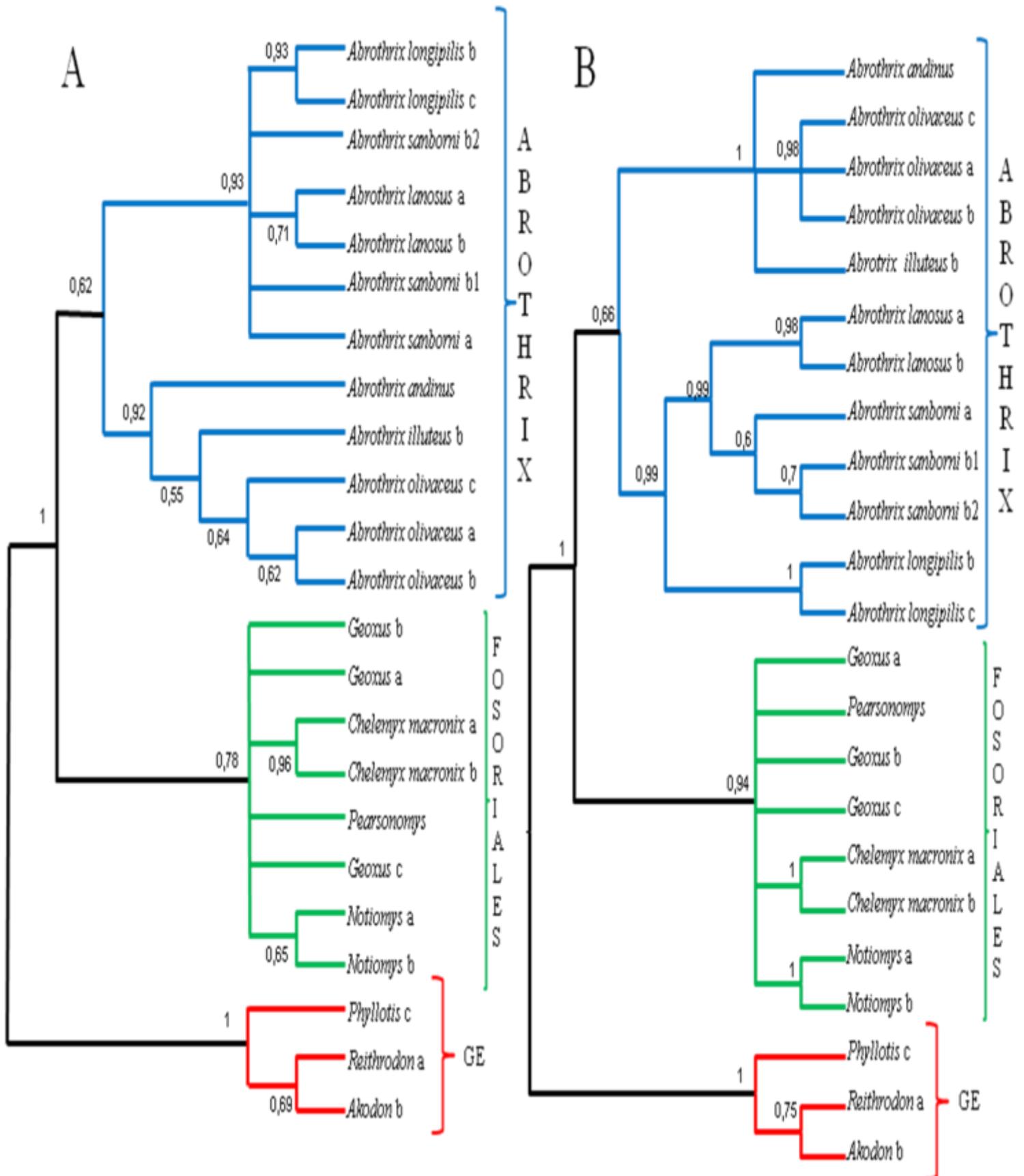


Fig. 4. Filogenias estimadas con el intrón de Insulina. (A) Según criterio de Máxima verosimilitud bajo el modelo K80+G. Los números indican valores de 1.000 réplicas de bootstrap. Sólo valores de bootstrap mayores al 50% son mostrados. (B) Según Análisis Bayesiano con 1.000.000 de generaciones y muestreos a intervalos de 100. Los números sobre los nodos indican probabilidades posteriores.

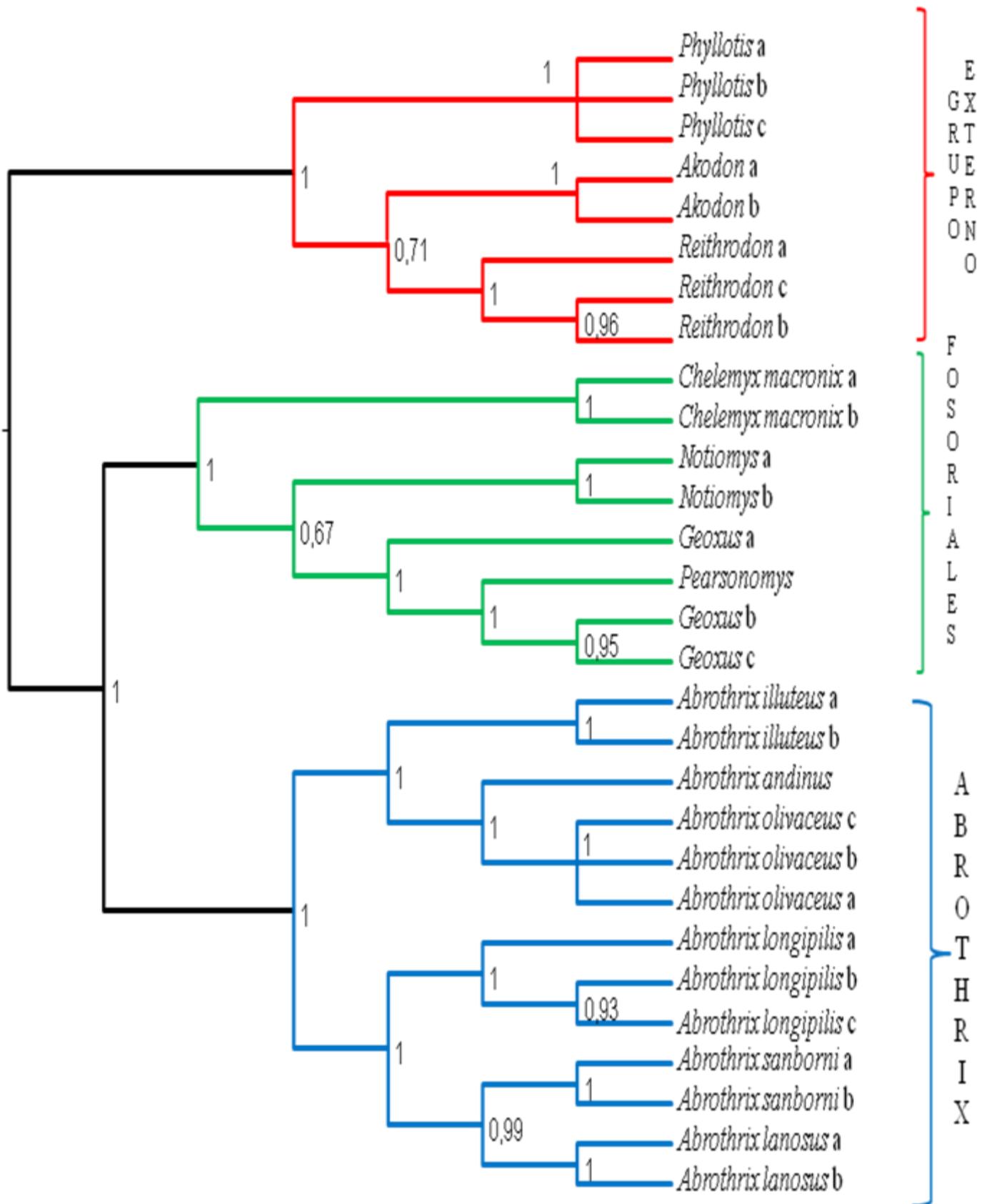


Fig. 5. Filogenia estimada con las secuencias concatenadas según Análisis Bayesiano con particiones y una corrida de 5.000.000 de generaciones con muestreos cada 500. Los números sobre los nodos indican probabilidades posteriores.

Discusión

La variabilidad encontrada en los intrones analizados, aunque no abundante, permitió una evaluación sistemática de los taxa involucrados en su mayoría consistente con análisis previos (Rodríguez-Serrano et al. 2008a; Feijoo et al. 2010; D'Elía et al. 2006b).

Existe un consenso en cuanto a las relaciones topológicas apoyadas por los tres marcadores nucleares. Sin embargo, el apoyo estadístico a los diferentes nodos, cambia dependiendo del marcador.

Agrupaciones fuertemente apoyadas por un intrón, son sugeridas pero no fuertemente apoyadas por otro. La combinación de los conjuntos de datos individuales en una misma matriz de caracteres (análisis de concatenación de secuencias) con el fin de encontrar una hipótesis única que los explique, maximizó la eficiencia descriptiva y el poder explicativo individual teniendo en el 91% de las agrupaciones inferidas probabilidades a posteriori con un rango entre 0,93 y 1.

1 *Relaciones entre especies del género Abrothrix*

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la concatenación de los tres marcadores nucleares y el análisis independiente para el intrón de Insulina plantean con gran apoyo una mayor afinidad de *A. lanosus* con *A. sanborni* que con *A. longipilis*.

Esta relación es reportada por primera vez en este trabajo, ya que el único estudio molecular que profundiza en el estatus taxonómico de *A. sanborni* hasta el momento (Palma et al. 2010) no incluye individuos de la especie *A. lanosus* y dado que las relaciones filogenéticas para *A. lanosus* presentadas recientemente, ubicaban a esta especie como grupo hermano de *A. longipilis* mediante el uso de secuencias codificantes de ADN nuclear (Feijoo et al. 2010).

Al carecer de información sobre *A. jelskii*, es imposible aportar información sobre la inconsistencia de la ubicación filogenética de *A. lanosus* junto a *A. jelskii* mediante marcadores mitocondriales reportada por Feijoo et al. (2010).

La realización de futuros análisis que incluyan a las cuatro especies (*A. lanosus*/*A. longipilis*/*A. jelskii*/*A. sanborni*) sería necesaria para aclarar sus relaciones filogenéticas y diversificación evolutiva.

A. illuteus fue reevaluada en un contexto morfológico y mediante análisis de cariotipo por Liascovich et al. (1989). En dicho estudio se presenta a *A. illuteus* (hasta ese momento considerada *Akodon illuteus*), como especie dentro de lo que en ese entonces era el subgénero *Abrothrix*. Mas allá de esta reevaluación taxonómica, *A. illuteus* nunca había sido incluido en un análisis filogenético hasta ahora. Los resultados aquí obtenidos, según el análisis de evidencia total, sugieren con alto apoyo estadístico, que *A. illuteus* es el taxón hermano del clado formado por *A. olivaceus* y *A. andinus*.

El análisis independiente para el intrón de la insulina también sugiere con alto apoyo estadístico la unión *A. olivaceus*/*A. andinus*/*A. illuteus* pero no llega a una resolución de las relaciones internas entre los mismos. A su vez, la ubicación filogenética de *A. illuteus* en base a Adh y Fibrinógeno no se resuelve con claridad.

2 Unidades principales dentro del género Abrothrix

Hasta aquí se han discutido los resultados para los dos clados bien definidos que presenta el género *Abrothrix* con probabilidades a posteriori iguales a 1 en el análisis de evidencia total y aunque no fuertemente apoyados, siempre sugeridos en el análisis independiente de cada uno de los marcadores utilizados en el presente trabajo.

Si bien para tener una hipótesis más robusta es necesaria la realización de futuros análisis con otros marcadores y mayores cantidades de individuos por especie, las evidencias disponibles muestran, que el género tal como se entiende actualmente, si bien monofilético, muestra una marcada división en

dos linajes, sugiriendo una futura revisión para su posible división en más de un género.

3 *Los abrotriquinos fosoriales*

Tanto el análisis de concatenación como las filogenias obtenidas para el intrón de fibrinógeno apoyan las relaciones filogenéticas reportadas desde la diagnosis de la tribu que ubican a *Geoxus*, *Notiomys* y *Pearsonomys*, formando un clado del cual *Chelemys* es su grupo hermano (D'Elía et al. 2007b). Dichas relaciones no son resueltas por los marcadores de Insulina y Adh.

Todas las filogenias obtenidas en este trabajo excepto las realizadas individualmente con el intrón de insulina, resultan en la asociación de los especímenes de *Geoxus* cuyas localidades de muestreo se ubican al norte de la Patagonia (Neuquén, Argentina y Región XIV, Chile) formando un clado con *Pearsonomys* y teniendo como grupo hermano al individuo *Geoxus* colectado al sur en la Provincia de Santa Cruz, Argentina.

El género *Geoxus* presenta una extensa distribución geográfica que se extiende desde los 52° hasta los 39° de latitud. Los altos porcentajes de divergencia entre los especímenes *Geoxus* muestreados al norte de su rango de distribución con respecto a los del sur, obtenidos en este trabajo mediante el uso de marcadores nucleares y ya presentados en Lessa et al. (2010) en base a secuencias mitocondriales, muestran la necesidad de futuros estudios taxonómicos que verifiquen la probable existencia de más de una especie bajo la denominación de *Geoxus valdivianus*.

No sorprende la mayor afinidad observada en este trabajo entre *Pearsonomys* y el clado norte de *Geoxus*, debido a que la pequeña distribución de *Pearsonomys* hasta ahora conocida, únicamente abarca entre los 39° y los 40,2° de latitud sur (D'Elía et al. 2006b).

Sería de interés un estudio filogenético que profundice en las relaciones entre

Geoxus y *Pearsonomys* basándose tanto en secuencias mitocondriales como nucleares. Debido a la cercanía de los linajes considerados, un abordaje basado únicamente en marcadores nucleares podría ser insuficiente para la resolución de la posible coespecificidad de los mismos, dada la poca variabilidad y la retención de polimorfismos ancestrales reportada para el ADN nuclear.

4 Metodologías

Hasta hace no mucho, los estudios de filogenias moleculares típicamente consistían en:

- a) Secuenciar un gen en individuos representativos de un conjunto de especies.
- b) Inferir un árbol de genes para las secuencias.
- c) Declarar el árbol de genes como estimador del árbol de relaciones entre especies.

Con el incremento de los datos moleculares y el reconocimiento de que los árboles evolutivos a partir de diferentes genes, muy a menudo muestran patrones conflictivos, se ha transformado la realización de las reconstrucciones filogenéticas hacia la implementación de enfoques que utilizan múltiples locus.

Los dos métodos clásicos de obtención de árboles filogenéticos de especies a través de múltiples genes son el de concatenación y el método de “voto democrático” o consenso (Degnan et al. 2009, Degnan y Rosenberg 2006, Gadagkar et al. 2005).

El método de consenso, define un árbol de especies que es el más compatible con las relaciones que ocurren más frecuentemente. A través del método de consenso, se pueden manejar diferentes tasas evolutivas y patrones de sustitución implicados en cada una de las regiones del genoma a las cuales corresponden los genes incluidos en el análisis. Sin embargo, un consenso entre cladogramas diferentes, no genera soluciones parsimoniosas para los conjuntos

de caracteres originales. Entre más difieran los cladogramas fundamentales, menos resuelto será el cladograma que se obtenga del consenso y se perderá una gran cantidad de información.

Mediante el método de concatenación, todos los genes analizados son concatenados para cada uno de los taxones y analizados como un supergen.

En el presente análisis el método de concatenación está optimizado debido al uso de particiones correspondientes a cada uno de los genes incluidos. Las particiones permiten asumir las diferentes tasas evolutivas y patrones de sustitución implicados en cada una de las regiones del genoma a las cuales corresponden los genes incluidos en el análisis, parámetros adjudicados clásicamente solo al método de consenso.

Sin embargo, el método de concatenación, asume que toda la información contenida en el supergen formado, evoluciona de acuerdo a una historia única, ignorando las diferentes historias evolutivas de los loci analizados.

Dado que las discrepancias entre los árboles de genes debido a la retención de polimorfismos ancestrales se acentúa en linajes que han sufrido rápidas radiaciones ancestrales como es el caso de los roedores sudamericanos (Lessa y Cook 1998) sería de gran interés la utilización de métodos probabilísticos de inferencia filogenética multilocus que permitan inferir un árbol de especies tomando en cuenta las historias evolutivas contenidas en cada uno de los loci analizados. El *BEAST (Heled, J. y Drummond, A. J. 2010) y el BEST (Liu, L. 2008) son programas que aplican métodos probabilísticos de inferencia filogenética multilocus y que se basan en el modelo de coalescencia de mutiespecies. Aunque su implementación en el set de datos durante el desarrollo de ésta pasantía supera los objetivos planteados preliminarmente, serán tenidos en cuenta en el transcurso de futuros análisis que profundicen en la información ya obtenida.

5 Consideraciones finales

Recientemente se ha propuesto una larga asociación entre la historia evolutiva de la tribu Abrotrichini y el continente sudamericano, reafirmando la hipótesis de una diferenciación particularmente dentro de esta región (Lessa et al. 2010).

Por lo anterior, el presente estudio, espera contribuir desde un punto de vista sistemático, al conocimiento de la diversidad de especies de mamíferos de nuestra región y sus relaciones evolutivas. Se espera aportar a la formulación de hipótesis capaces de explicar sus actuales distribuciones y a una mayor valoración de su diversidad y conservación.

Sin embargo, el estudio de la sistemática de los abrotriquinos, requiere de futuros análisis con mayor cantidad de muestras y loci adicionales que permitan resoluciones más detalladas del estatus taxonómico de sus miembros.

Solo así, podrá ser posible el alcance de conclusiones en relación a sus tiempos de diversificación y a las características paleo climáticas que promovieron la misma.

Bibliografía

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Amman, B. R., J. D. Hanson, L. K. Longhofer, and R. D. Bradley. 2006. Intron 2 (*Adh1-l2*) of the alcohol dehydrogenase gene: a potential nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 256:1–16.
- Carleton, M.D. 1980. Phylogenetic relationships in neotomine-peromyscine rodents (Muroidea) and a reappraisal of the dichotomy within New World Cricetinae. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan* 157:i–vii+1–146.
- D'Elía, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19, 307–323.
- D'Elía, G., González, E.M., Pardiñas, U.F.J., 2003. Phylogenetic análisis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mamm. Biol.* 68, 351–364.
- D'Elía, G., Luna, L., González, E.M., Patterson, B.D., 2006a. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae) : an appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Mol. Phyl. Evol.* 38, 558–564.
- D'Elía, G., Ojeda, A.A., Mondaca, F., Gallardo, M.H., 2006b. New data of long-clawed mouse *Pearsonomys annectens* (Cricetidae, Sigmodontinae) and additional comments on the distinctiveness of *Pearsonomys*. *Mamm.*

Biol. 71, 39–51.

D'Elía G, y Pardiñas UFJ. 2007a. Putting names to the phylogenetic diversity of Neotropical sigmodontine rodents: new genera for known species. *Mammalia*, 71:143-145.

D'Elía, G., Pardiñas, U.F.J., Teta, P., Patton, J.L., 2007b. Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana* 71, 187–194.

Díaz, M.M., 1999. Mamíferos de la Provincia de Jujuy: sistemática, distribución y ecología. Tesis doctoral inédita, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Farris, J.S., 1982. The logical basis for phylogenetic analysis. In: Platnick, I., Funk, V.A. (Eds.), *Advances in Cladistics. Proceedings of the Second Meeting. Willi Henning Society*, vol. 2. Columbia University Press, New York, pp. 1–36.

Feijoo M, D'Elía G, Pardiñas UFJ, y Lessa EP. (2010). Systematics of the southern Patagonian-Fuegian endemic *Abrothrix lanosus* (Rodentia: Sigmodontinae): phylogenetic position, karyotypic and morphological data. *Mammalian Biology*, 75: 122–137.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17:368-376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Filatov, D.A., 2002. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2, 621–624.

- Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano, 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22:160–174.
- Heled, J. y Drummond, A. J. (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. IN *Mol Biol Evol*, 27.570-580.
- Jayat, J., Pardiñas, U. & Ojeda, R. 2008. *Abrothrix illuteus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism* (Vol. 3) (Munro, H.N., ed.),pp. 21–132, Academic Press.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO 2006. Assessment of methods for amino acid matrix and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6: 29.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Lanzone, C., Ojeda, R., 2005. Citotaxonomía y distribución del género *Eligmodontia* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). [Mastozoología Neotropical](#) 12,1: 000-000.
- Liascovich, R.C., Barquez, R.M., Reig, O.A., 1989. A karyological and morphological reassessment of *Akodon (Abrothrix) illuteus* Thomas. *J. Mamm.* 70, 386–391.

- Liu, L. 2008. BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics* 24:2542-2543
- Lessa, E.P., D'Elía, G., Pardiñas, U.F.J., 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19:15, 3031-3037
- Mann, G., 1978. Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana (Zool.)* 40, 1-342.
- Mares, M.A, Ojeda, R.A., Braun, J.K., y Barquez, R.M., 1997. Systematics, distribution, and ecology of the mammals of Catamarca Province, Argentina. Pp. 89-141, en: *Life among the muses: Papers in honor of James S. Findley* (TL Yates, WL Gannon y DE Wilson, eds.). Special Publication, The Museum of Southwestern Biology 3.
- Martin, G. M. and M. Archangelsky. 2004. Aportes al conocimiento de *Notiomys edwardsii* (Thomas, 1890) en el noroeste del Chubut, Argentina. *Mastozoología Neotropical* 11(1): 91-94.
- Matocq, M. D., Q. R. Shurtliff, and C. R. Feldman. 2007. Phylogenetics of the woodrat genus *Neotoma* (Rodentia: Muridae): Implications for the evolution of phenotypic variation in male external genitalia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:637–652.
- Meng-Shin, S., Ben-Yang, L., Manyuan, L., Hon-Tsen, Yu., 2008. Adaptive Evolution of the Insulin Two-Gene System in Mouse. *Genetics* 178: 1683-1691.
- Miller, S., Dikes, D., Polesky, H., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16, 215.
- Muñoz-Pedreros, AP. 2000. Orden Rodentia. Pp 73-126, *in: Mamíferos de Chile*

(A Muñoz-Pedreros y J Yañez, eds.) Ediciones CEA. Valdivia, Chile.

Musser, G.G., Carleton, M.D., 1993. Family muridae. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 501–755.

Musser, G.G. and M.D. Carleton. 2005. Superfamily Muroidea. In: (D.E. Wilson and D.M. Reeder, eds.) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. pp.894–1531.

Ojeda, A.A., G. D'Elía & R.A. Ojeda. 2005. Taxonomía alfa de *Chelemys* y *Euneomys* (Cricetidae, Sigmodontinae): el número diploide de ejemplares topotípicos de *C. macronyx* y *E. mordax*. *Mastozoología Neotropical* 12:79-82.

Osgood, W.H., 1943. The mammals of Chile. *Field Mus. Nat. Hist.* 30, 1-268.

Palma, R.E., Marquet, P.A., Boric-Bargetto, D., 2005. Inter and intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *J. Biogeography* 32, 1931–1941.

Palma, R.E., Cancino, A.R., Rodríguez-Serrano, E., 2010. Molecular systematics of *Abrothrix longipilis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Chile. *Journal of Mammalogy*: October 2010, Vol. 91, No. 5, pp. 1102-1111.

Pardiñas, U.F.J., P.A. Teta, S. Cirignoli y D.H. Podesta., 2003. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) de Norpatagonia Extra Andina, Argentina: Taxonomía Alfa y Biogeografía. *Mastozoología Neotropical*, 10(1):69-113.

- Pardiñas, U.F.J., D. Udrizar Sauthier, P. Teta y G. D'Elía., 2008. New data on the endemic Patagonian long-clawed mouse *Notiomys edwardsii* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalia* 72:273-285.
- Pearson, O.P., 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, Southern Argentina. *Journal of Zoology*, 202:225-237.
- Rambaut, A. 2009. *FigTree*. Version 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rannala, B., and Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Redford, K.H. y Eisenberg, J.F. 1992. *Mammals of the Neotropics Vol. 2: The Southern Cone*. The University of Chicago Press. Chicago, IL., EUA.
- Reig, O. A., 1981. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. *Monographiae Naturae*, Museo Municipal de Ciencias Naturales "Lorenzo Scaglia" de Mar del Plata, 1: 1-162.
- Reig, O.A., 1986. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. *High altitude tropical biogeography* (ed. by F. Vuilleumier and M. Monasterio), pp. 404–439. Oxford University Press, New York.
- Reig, O.A., 1987. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Fieldiana: Zool.* 39, 347–399.

- Rodríguez-Serrano, E., Cancino, R.A., Palma, R.E., 2006. Molecular phylogeography of *Abrothrix olivaceus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Chile. *J. Mammal.* 87, 971–980.
- Rodríguez-Serrano, E., Hernández, C.E., Palma, R.E., 2008a. A new record and an evaluation of the phylogenetic relationships of *Abrothrix olivaceus markhami* (Rodentia: Sigmodontinae). *Mamm. Biol.* 73, 309–317.
- Rodríguez-Serrano, E., Palma, R.E., Hernández, C.E., 2008b. The evolution of ecomorphological traits within the *Abrothrichini* (Rodentia: Sigmodontinae): a Bayesian phylogenetics approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:473–480.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487–491.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Smith, M.F. & Patton, J.L., 1999. Phylogenetic relationship and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution*, 6, 89-128.
- Smith, M.F., Kelt, D.A., Patton, J.L., 2001. Testing models of diversification in mice in the *Abrothrix olivaceus/xanthorhinus* complex in Chile and Argentina. *Mol. Ecol.* 10, 397–405.

- Spotorno, A., 1992. Parallel evolution and ontogeny of simple penis among New World cricetid rodents. *J. Mamm.* 73, 504–514.
- Spotorno, A., Palma, E.R., Valladares, P.J., 2000. Biología de roedores reservorios de hantavirus en Chile. *Rev. Chil. Enfectología* 17, 197–210.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar.-2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetic análisis (MEGA) software versión 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 25, 4876.
- Wickliffe JK, Hoffmann FG, Carroll DS, Dunina-Barkovskaya YV, Bradley RD, Baker RJ. Intron 7 (FGB-I7) of the fibrinogen, B beta polypeptide (FGB): a nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occas. Pap. Mus. Texas Tech Univ. No. 219.* 2003 pp. I + 1–6.
- Woods CA y CW Kilpatrick. 2005 Infraorder Hystricognathi Brandt, 1855. Pp. 1538-1600, in: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (DE Wilson and DM Reeder, eds.). Third Edition, Volume 2.

Apéndice 1

Protocolos básicos de laboratorio

EXTRACCIÓN DE ADN

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA ph 8, 1 % de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X ph. 8 (autoclavado), Etanol o isopropanol absolutos a -20 °C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5.
2. Enjuagar brevemente con agua destilada.
3. Agregar 500 ul de buffer de lisis y 10 ul de proteinasa K.
4. Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 horas o hasta toda la noche.
5. Opcional: una hora antes de finalizar, agregar 5 ul de RNasa A.
6. Centrifugar al máximo (por ej., 15.000 rpm) por 15 min.
7. Pipetear 500 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiese).
8. Agregar 300 ul de cloruro de sodio, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 min.
9. Pipetear 500-600 ul del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a -20°C o el doble de volumen de etanol absoluto a -20°C. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.
10. Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20°C por dos horas o toda la noche.
11. Centrifugar al máximo por 15 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
12. Lavar breve y cuidadosamente con unos 750 ul de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.
13. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C (lleva unas dos horas).
14. Resuspender en 100 ul 1xTE. Agitar, y opcionalmente incubar a 55°C (o menos) por 2 horas.
15. Guardar a -20°C.

GELES DE AGAROSA

Preparación:

- Es importante que la cuba esté limpia. Si hubiera buffer, se retira y reserva para usar durante la corrida (sólo si está limpio).
- Se prepara la cuba colocando la placa inferior y los topes laterales, previamente lavados con agua.
- En un vaso de bohemia, se mezclan 0,8 g de agarosa con 100ml de Buffer TBE 1X (agarosa 0.8%), se revuelve y se lleva al microondas hasta que se disuelva bien (asegurarse que no pueden grumos incoloros).
- Cuando la mezcla se haya entibiado se la coloca en la placa inferior de la cuba, evitando que queden burbujas. Se coloca el peine y se deja enfriar hasta que gelifique.
- Una vez gelificado, se retira el peine y se cubre con el mismo buffer con el que se preparó el gel (en ese caso TBE 1X)

Electroforesis:

- Se mezclan 5 ul de producto de PCR y 2ul de 6X
- Como referencia, cargar 1ul de estándar de tamaño (ladder) con 2 ul de 6X en un carril.
- Se cargan en los pocillos del gel, con cuidado de no perforar la parte inferior y en el último se coloca el estándar de tamaño.
- Se corren los productos hasta que el marcador azul esté en el borde del gel. El voltaje se ajusta asegurándose que la cuba no levante demasiada temperatura. Probar en una primer instancia a 75 V, y subir si es posible (demasiado calor derrite el gel). Controlar el tiempo de la corrida (las fuentes del laboratorio no tienen timer).

Es posible usar dos peines en un mismo gel.

- Si hay partes del gel que no se utilizaron se puede recortar y volver a usar la agarosa

TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO

Soluciones necesarias: Dilución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Procedimiento (en un cuarto aparte, destinado para trabajar con bromuro):

1. Sumergir el gel en Bromuro de Etidio, con cuidado de no salpicar y no tocar la placa que contiene el gel. Tapar y dejar 20 minutos (recordar apagar la luz del cuarto).
2. Con una pala, sacar el gel y poner en la pantalla del transiluminador, sobre la placa de acrílico. Colocar la tapa acrílica, lentes o máscara y encender. Recordar los resultados o anotarlos.
3. Tirar el gel, lavar la placa con etanol, y la pala con agua. Tirar los guantes y cualquier otra cosa que pudiera haber tocado bromuro en el cuarto donde se trabajó.

- Al mirar los resultados, tener en cuenta la intensidad del estándar de tamaño.

- Si fuera necesario, es posible volver a poner el gel en bromuro y dejarlo más tiempo.

- Puede ser necesario preparar una nueva dilución de bromuro, en caso que haya sido muy usada.

Apéndice 2

Tabla de divergencias evolutivas entre especies de la tribu Abrotrichini según el análisis de evidencia total.

[1]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
[1]																					
[2]	0.019																				
[3]	0.021	0.002																			
[4]	0.021	0.002	0.000																		
[5]	0.017	0.011	0.013	0.013																	
[6]	0.017	0.011	0.013	0.013	0.000																
[7]	0.003	0.019	0.021	0.021	0.017	0.017															
[8]	0.003	0.019	0.021	0.021	0.017	0.017	0.000														
[9]	0.003	0.019	0.021	0.021	0.017	0.017	0.000	0.000													
[10]	0.019	0.016	0.018	0.018	0.011	0.011	0.019	0.019	0.019												
[11]	0.019	0.016	0.018	0.018	0.011	0.011	0.019	0.019	0.019	0.000											
[12]	0.032	0.036	0.037	0.037	0.037	0.037	0.032	0.032	0.032	0.036	0.036										
[13]	0.034	0.037	0.039	0.039	0.039	0.039	0.034	0.034	0.034	0.037	0.037	0.002									
[14]	0.034	0.041	0.042	0.042	0.039	0.039	0.034	0.034	0.034	0.041	0.041	0.037	0.039								
[15]	0.016	0.022	0.024	0.024	0.021	0.021	0.016	0.016	0.016	0.022	0.022	0.035	0.037	0.037							
[16]	0.016	0.022	0.024	0.024	0.021	0.021	0.016	0.016	0.016	0.022	0.022	0.035	0.037	0.037	0.000						
[17]	0.032	0.039	0.041	0.041	0.037	0.037	0.032	0.032	0.032	0.039	0.039	0.039	0.040	0.034	0.036	0.036					
[18]	0.034	0.039	0.041	0.041	0.039	0.039	0.034	0.034	0.034	0.041	0.041	0.039	0.041	0.036	0.037	0.037	0.008				
[19]	0.029	0.036	0.037	0.037	0.034	0.034	0.026	0.026	0.026	0.036	0.036	0.032	0.034	0.014	0.032	0.032	0.026	0.027			
[20]	0.031	0.037	0.039	0.039	0.036	0.036	0.030	0.030	0.030	0.037	0.037	0.034	0.035	0.006	0.034	0.034	0.031	0.032	0.011		
[21]	0.031	0.037	0.039	0.039	0.036	0.036	0.030	0.030	0.030	0.037	0.037	0.034	0.035	0.006	0.034	0.034	0.031	0.032	0.011	0.000	