

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Diversidad de los ratones hocicudos del género *Oxymycterus* en Uruguay



Fig 1. 2. Mus musculus

María José Rodríguez Cajarville

Orientador

Dr. Enrique P. Lessa

Agosto, 2015

***"Descifrar lo que está delante de nuestros ojos
requiere una lucha constante"***

George Orwell

La imagen de portada pertenece al libro "*The Zoology of the Voyage of H.M.S. Beagle, under the comand of Captain Fitzroy, R.N., during the years 1832 to 1836*" de George R. Waterhouse, curador de la Zoological Society de Londres, y a quien Charles Darwin le confiara el estudio de los mamíferos colectados durante el viaje del H.M.S. Beagle.

Agradecimientos

En primer lugar, a Enrique Lessa por aceptar dirigir esta tesina y abrirme las puertas del Laboratorio de Evolución.

A Ivanna Tomasco por el apoyo durante las últimas y críticas etapas de elaboración de este documento. Por los constantes “¿Cuándo te recibís?” que parece que no, pero ayudan.

A Matías Feijoo, Carolina Abud y Javier Calvelo, por la ayuda en el laboratorio, allá lejos y hace tiempo.

A Alejandro “Passer” D’Anatro, no sólo por su ayuda durante la etapa de laboratorio, sino por los consejos de análisis y el usufructo de la capacidad de procesamiento de su I7.

A Andrés Parada, un consejero de BEAST a distancia. Gracias por los desinteresados consejos, aún sin conocerme.

A Enrique González, por abrirme las puertas del Museo Nacional de Historia Natural en 2009 y durante la realización de la pasantía.

A Pablo Teta, Pablo Goncalves y Ulyses Pardiñas, por los aportes bibliográficos.

A la familia y amigos por el apoyo incondicional.

A Germán Botto por los mapas.

A todas las personas que en algún momento de la historia recolectaron un hocicudo y tuvieron el empeño de depositarlo en una colección biológica para que el ejemplar pudiera ser estudiado en un futuro incierto.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
El género <i>Oxymycterus</i>	6
Especies uruguayas del género <i>Oxymycterus</i> : antecedentes	10
ADN mitocondrial, introgresión y reparto incompleto de linajes	11
Importancia de las investigaciones en sistemática y sus aplicaciones a la conservación	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Obtención de muestras	19
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.	19
Edición de secuencias	22
Análisis de secuencias	25
RESULTADOS	28
Análisis filogenéticos: IRBP	30
Análisis filogenéticos: cit-b.....	34
Actualización de la distribución geográfica del género en Uruguay	36
DISCUSIÓN	40
Sobre las especies del género <i>Oxymycterus</i> que se distribuyen en Uruguay	41
Sobre la sistemática de <i>Oxymycterus josei</i> y <i>Oxymycterus rufus</i>	42
Sobre el género <i>Oxymycterus</i>	44
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	49

INDICE DE FIGURAS, CUADROS, TABLAS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Distribución de las especies del género <i>Oxymycterus</i> en Sudamérica.	7
Figura 2. Cráneo de <i>Oxymycterus nasutus</i> .	9
Figura 3. Caso de introgresión por hibridación.	13
Figura 4. Proceso de reparto incompleto de linajes.	14
Figura 5. Localidades de los ejemplares secuenciados.	21
Figura 6. Localidades de los ejemplares depositados en colecciones nacionales.	22
Figura 7. Árbol de máxima parsimonia del gen IRBP.	31
Figura 8. Árbol máxima verosimilitud del gen IRBP.	32
Figura 9. Árbol de análisis filogenético bayesiano del gen IRBP.	33
Figura 10. Árbol del análisis filogenético de máxima parsimonia del gen citocromo-b.	35
Figura 11. Árbol consenso del análisis de máxima verosimilitud del gen citocromo-b.	37
Figura 12. Árbol consenso del análisis bayesiano del gen citocromo-b.	38
Figura 13. Distribución de <i>Oxymycterus josei</i> y <i>O. nasutus</i> en Uruguay.	39

CUADROS

Cuadro 1. Clasificación del género <i>Oxymycterus</i> .	8
--	---

TABLAS

Tabla 1. Lista de ejemplares secuenciados.	20
Tabla 2. Lista de secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos.	23
Tabla 3. Composición nucleotídica (género <i>Oxymycterus</i>).	28
Tabla 4. Distancias intraespecíficas para el género <i>Oxymycterus</i> (citocromo-b).	30

ANEXOS

Anexo 1. Lista de localidades de colecta de <i>Oxymycterus</i> en Uruguay.	59
Anexo 2. Tabla A. Tabla de distancias para el gen IRBP.	60
Anexo 2. Tabla B. Tabla de distancias para el gen citocromo-b.	61

RESUMEN

El género *Oxymycterus*, endémico de la región Neotropical, posee 17 especies que habitan diversos ambientes, desde áreas abiertas y pastizales hasta bosques tropicales y yungas. Pocas han sido las revisiones taxonómicas exhaustivas que han intentado dilucidar las relaciones filogenéticas existentes entre las especies, que hasta ahora permanecen sin resolver. En Uruguay, dos especies habitan la zona sur y este del país: *O. josei* y *O. nasutus*. La primera fue descubierta en el año 2002 por Hoffmann y colaboradores, mientras que la segunda fue descrita por Waterhouse en 1837. Existe una gran similitud morfológica entre estas dos especies, las cuales coexisten en simpatria y sintopía en varias localidades de la zona sureste de Uruguay. El estudio que derivó en el descubrimiento de *O. josei* se basó en el uso de caracteres morfométricos y moleculares, utilizando solo un fragmento del gen del citocromo b, lo que llevó a que García-Olaso (2008) planteara la hipótesis de que ambas supuestas especies podrían en realidad pertenecer a la misma entidad biológica. El mismo autor propuso que podría ser un caso de hibridación seguida de introgresión mitocondrial, desde una tercera especie (*O. rufus*) de distribución adyacente a *O. nasutus*. El objetivo de esta tesina fue determinar qué proceso actuó sobre las tres especies involucradas, utilizando para tal fin un gen no ligado al genoma mitocondrial: IRBP. Para esto, se seleccionaron individuos asignados al género *Oxymycterus* depositados en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo, procurando obtener una buena cobertura geográfica y cromática y se secuenciaron los genes citocromo b e IRBP. Se obtuvieron también secuencias de todas las especies del género de la base de datos de acceso libre GenBank. Los análisis filogenéticos (Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Bayesiano) realizados para cada gen independientemente coinciden fehacientemente con los resultados obtenidos con anterioridad por Hoffmann *et al.* (2002), indicando que *O. josei* y *O. nasutus* son entidades diferentes y alejadas filogenéticamente. Por otra parte, la relación entre *O. rufus* y *O. josei* debe revisarse a la luz de los resultados de los análisis, dado que, por un lado, los valores de divergencia entre estas dos entidades son bajos, y que los análisis recuperan a *O. rufus* como parafilético, aunque no fue posible determinar con buen soporte la existencia de ningún patrón filogeográfico. Por último, desde la publicación del libro de González & Martínez-Lanfranco (2010), varios individuos de *Oxymycterus* fueron colectados en localidades del oeste y norte de Uruguay, indicando que el género podría distribuirse en todo el territorio nacional. Además, los análisis genéticos indicaron la presencia de *O. josei* en la localidad de Platón (Rivera), al norte de Uruguay y a cinco kilómetros de la frontera

con Brasil, lo que tiene implicancias biogeográficas y de conservación y aumenta el número de localidades de simpatría con *O. nasutus*.

INTRODUCCIÓN

El género *Oxymycterus*

El género *Oxymycterus* Waterhouse 1837, endémico de la región Neotropical, se distribuye desde sur del Río Amazonas en Brasil (centro-sur de los Estados Pará y Amazonas) hasta el sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, entre los 2° y 39° de latitud sur (Hershkovitz 1994, Figura 1). Las 17 especies actualmente reconocidas del género (Musser & Carleton 2005; Jayat *et al.* 2008, aunque véase también Patton *et al.* 2015) (Cuadro 1) habitan una gran variedad de tipos de hábitat diferentes, desde áreas abiertas de pastizales y bañados a bosques tropicales, yungas y bosques subtropicales, en un rango altitudinal comprendido entre el nivel del mar hasta los 4000 metros en el altiplano Andino (Oliveira 1998). La característica más sobresaliente del género es la elongación rostral anterior a los dientes incisivos que implica a los premaxilares y nasales, característica que da origen tanto a su nombre común (ratones hocicudos) como científico: *Oxymycterus* deriva de ὄξυς (agudo) y Μυκτηρ (nariz) (Waterhouse 1837, Figura 2). Además de dicha característica, el género posee fuertes y largas garras, especialmente las de las extremidades anteriores, que utiliza para excavar. Estudios de dieta documentan que *Oxymycterus* es un género mayoritariamente insectívoro (Hershkovitz 1994; Suarez 1994; Talamoni *et al.* 2008) aunque también consume otros invertebrados y hasta carroña. El género pertenece a la subfamilia Sigmodontinae, comprendida dentro de la familia Cricétidae (Musser & Carleton 2005; Patton *et al.* 2015, Cuadro 1).

Oxymycterus es un género morfológicamente diverso, siendo el tamaño corporal un importante componente de la variación observada (Hershkovitz 1994; Oliveira 1998); según el primero, el género: “...range in size from about that of a large domestic mouse (*Mus musculus*) to that of a large domestic rat (*Rattus rattus*)...”; gran parte de las descripciones de nuevas especies se basaron en la diferenciación de este carácter, sumado al patrón de coloración general, en comparación con las restantes especies (e.g. Hinojosa *et al.* 1987; Hershkovitz 1994). A pesar de dicha disparidad morfológica, citogenéticamente las especies del género muestran un cariotipo idéntico, tanto en la morfología de los cromosomas como en los patrones de bandeo C-G, de $2n = 54$ (Yonenaga 1975; Vitullo *et al.* 1986; Svartman & Cardoso de Almeida 1993; Bonvicino *et al.* 1998, 2005, 2012).

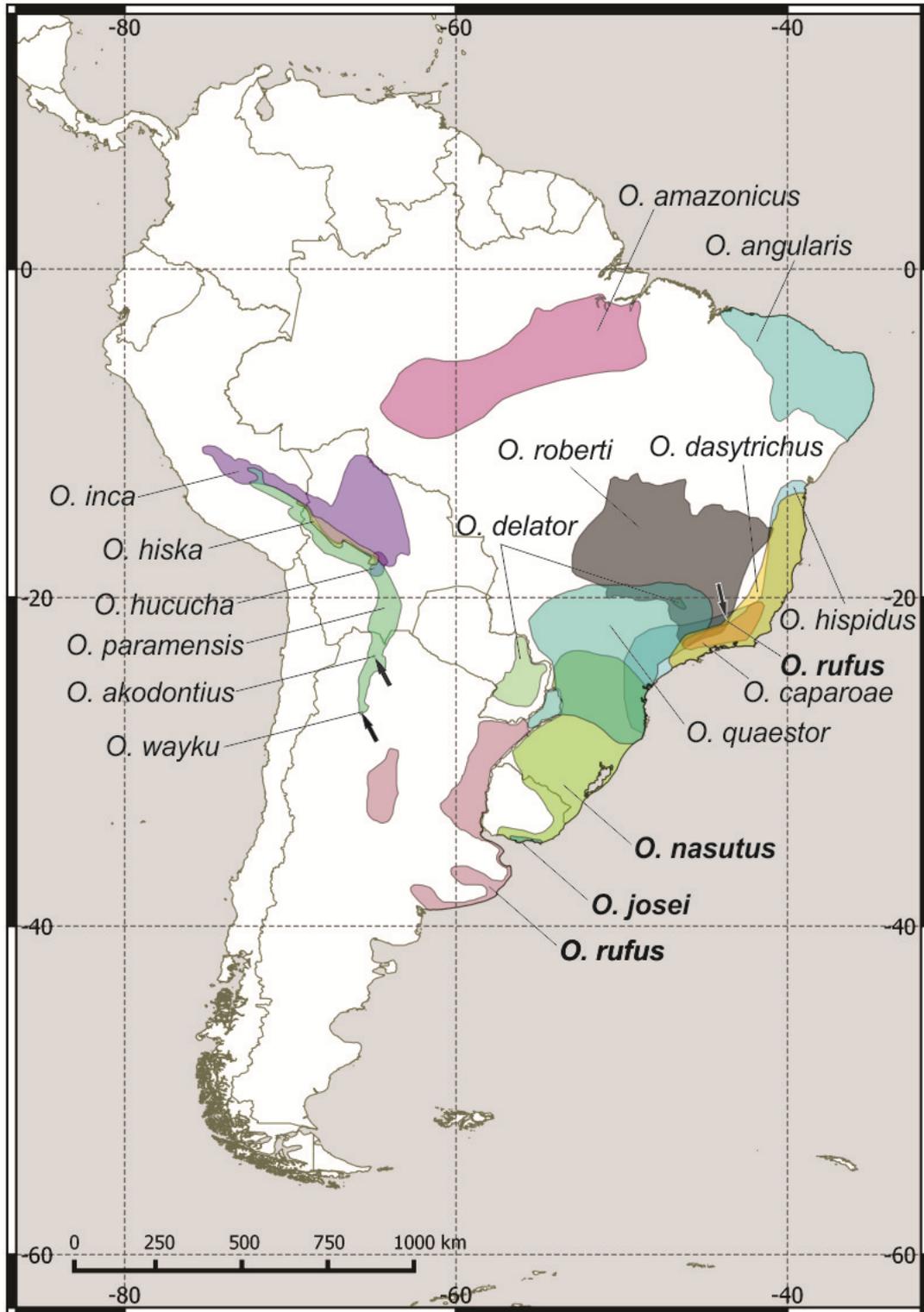
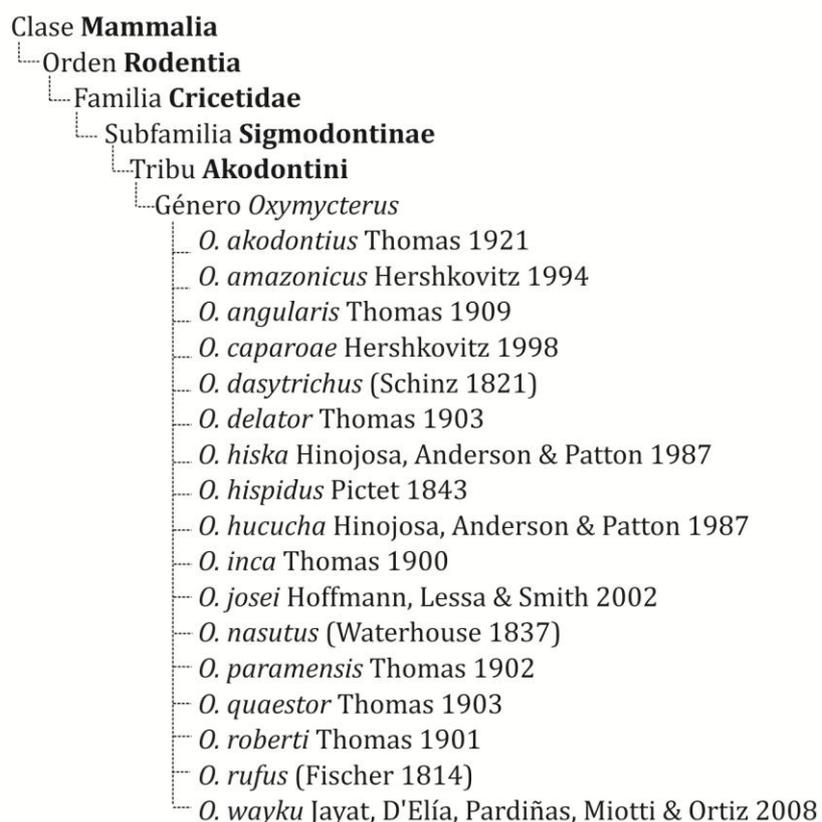


Figura 1. Distribución de las especies del género *Oxymycter* en Sudamérica. Distribuciones extraídas de NatureServe (<http://infonatura.natureserve.org/>), Jayat *et al.* 2008 (para *Oxymycter wayku*) y Gonçalves & Oliveira 2004 (para los registros recientes de *O. rufus* en Brasil, [flecha]). Las especies más relevantes para este trabajo se destacan en negrita.

En cuanto a la coloración de pelaje, el género presenta una gran uniformidad, comprendida entre el agutí, marrón oscuro y rojizo, pudiendo encontrarse varios de estos morfos en una misma población o entre poblaciones de la misma especie (Herskovitz 1994).



Cuadro 1. Clasificación actual del género *Oxymycterus*, según Carleton y Musser, 2005 y Jayat *et al.* (2008) para *O. wayku*.

Recientemente, Oliveira y Gonçalves (2015) proponen algunos cambios respecto a la taxonomía representada en este cuadro. Además de las especies nombradas, consideran a *Oxymycterus juliacae* Allen 1900 y *O. nigrifrons* Osgood 1944 como buenas especies (antes consideradas subespecies de *O. inca* y *O. paramensis*, respectivamente). Por otra parte, eliminan de la lista a *O. akodontius* (sinónimo de *O. paramensis*), *O. angularis*, *O. hispidus* (sinónimos de *O. dasytrichus*) y *O. roberti* (sinónimo de *O. delator*) en base a caracteres morfométricos.



Figura 2. Cráneo de *Oxymycterus nasutus* (ejemplar CA 615). Se destaca la elongación rostral que implica los premaxilares y nasales y que da nombre al género.

Todos los factores anteriormente enumerados influyeron en la dificultad histórica y actual de clasificarlos taxonómicamente, sumado a que pocas han sido las revisiones taxonómicas exhaustivas realizadas en pro de esto último (por ejemplo Tullberg 1899, Thomas 1909, Tate 1932, Ellerman 1941, Hershkovitz 1994, 1998, Oliveira 1998, Hoffmann *et al.* 2002), y la mayoría de los trabajos nombrados se basan en el análisis de especímenes selectos y en las descripciones originales. Prueba de esto es el hecho de que hasta 23 especies han sido asignadas al género (Oliveira 1998), número que ha fluctuado ampliamente a consecuencia de los cambios en el estatus taxonómico de ciertas formas nominales (Thomas 1909; Hershkovitz 1994, 1998; Oliveira 1998; Jayat *et al.* 2008; Patton *et al.* 2015). Adicionalmente, seis especies han sido descritas en los últimos 20 años: *Oxymycterus hiska* y *O. hucucha* (Hinojosa *et al.* 1987), *O. amazonicus* (Hershkovitz 1994), *O. caparaoe* (Hershkovitz 1998), *O. josei* (Hoffmann *et al.* 2002) y *O. wayku* (Jayat *et al.* 2008). Otro factor no menos importante que ha influido fuertemente en la dificultad de clarificar la taxonomía del género es la incertidumbre acerca de la procedencia del material en el cual se basa la descripción original de *Oxymycterus rufus*, la primera especie descrita. Esta especie, cuyo ejemplar tipo fue recolectado en alguna localidad comprendida entre el Departamento paraguayo de Misiones y la Provincia de Entre Ríos en Argentina (Musser & Carleton 1993; Hershkovitz 1994; Contreras & Teta 2003), fue enviado a Félix de Azara, quien lo menciona en su primer obra (Azara 1801) y una vez enviado al Museo de Historia Natural de Paris, descrito por Fischer (1814). Según Oliveira (1998), quien coincide con Hershkovitz (1994) y Musser & Carleton (1993), la localidad típica de *O. rufus* estaría ubicada en Entre Ríos y su distribución quedaría restringida a Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba, asignando las poblaciones del noreste de Argentina y Sur de Paraguay a *O. delator*. Pero esta afirmación es descartada por Contreras & Teta (2003) en base a una crítica y detallada revisión bibliográfica sobre la localidad típica de “*le rat roux*” de Azara. De todas maneras, esta incertidumbre ha generado cierto grado de cuestionamiento respecto a la validez de algunos taxa descritos posteriormente

en la zona del Este de Paraguay y Entre Ríos (refiero a la obra anteriormente mencionada por más detalles).

A pesar de las repetidas revisiones de las que fue objeto el género *Oxymycterus*, sigue siendo necesaria una revisión taxonómica completa (Musser & Carleton 2005) que incluya un conjunto de datos con caracteres moleculares, morfológicos, de todas las especies actualmente válidas, a modo de establecer los límites entre las especies del género.

Especies uruguayas del género *Oxymycterus*: antecedentes

El estatus taxonómico del género *Oxymycterus* en Uruguay a lo largo de la historia, al igual que en el resto de Sudamérica, no careció de dinamismo. Desde que C. R. Darwin colectó el ejemplar tipo de *O. nasutus* (Waterhouse 1837) en Maldonado, numerosos han sido los cambios nomenclaturales sufridos por la especie, resumidos en el trabajo de Hoffmann *et al.* (2002), pero todos hasta ese entonces habían coincidido en la presencia de una única especie en el país. En 2002, Hoffmann y colaboradores realizaron un estudio basado en una hipótesis de Hershkovitz (1994), a su vez basado en Vaz Ferreira (1960), que estipulaba que en Uruguay podrían estar presentes dos especies de *Oxymycterus*. Este estudio derivó en el descubrimiento de una nueva especie para la ciencia: *Oxymycterus josei* Hoffmann, Lessa y Smith 2002. Estos autores realizaron un estudio a nivel morfológico y molecular de todas las especies válidas del género, pero con énfasis en los especímenes uruguayos, utilizando caracteres craneales morfológicos y morfométricos, así como caracteres moleculares, utilizando el gen mitocondrial citocromo-b. Los resultados indicaron que entre estas dos especies existen pocas diferencias morfológicas, entre las que se encuentran una placa cigomática y raíz maxilar del arco cigomático más anchos en *O. josei* en comparación con *O. nasutus*, así como sutiles diferencias en el patrón de esmalte dental. Por otra parte, el análisis discriminante de caracteres morfométricos de cráneo mostró diferencias significativas en muy pocas variables. Por último, al contrario de lo que cabría esperar dada la similitud morfológica entre estas dos especies, el análisis filogenético realizado con el gen mitocondrial citocromo b mostró una gran divergencia entre las mismas: *O. josei* y *O. nasutus* son divergentes en un 8,2% (distancias pareadas no corregidas), siendo *O. rufus* (especie cuya distribución conocida abarca desde el sur de Misiones hasta el sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, al oeste del río Uruguay [Oliveira & Gonçalves 2015], Figura 1) la especie hermana de la primera (1,9% de

divergencia). Posteriormente, García-Olaso (2008) retomó el análisis de la diferenciación morfológica re-evaluando los caracteres propuestos como diagnósticos por Hoffmann *et al.* (2002). García-Olaso validó el carácter ancho de placa zigomática como el único aplicable para la diferenciación morfológica, aunque nuevamente resalta la existencia de cierto grado de solapamiento en los rangos de variación también en este carácter, por lo que concluye que no es posible utilizarlo directamente en la determinación de especímenes. A su vez, descarta los pliegues dentarios que proponen Hoffmann *et al.* (2002) alegando que los caracteres se encontraban indistintamente en ejemplares de *O. nasutus* y *O. josei*. Poseer escasos caracteres diagnósticos morfológicos, que son exclusivamente internos y de evaluación poco práctica, es frecuente entre pares de especies de sigmodontinos (por ejemplo ver D'Elía & Pardiñas 2004). Esto dificulta la identificación morfológica de las especies, necesaria en la implementación de una gran variedad de estudios. Considerando que, además de la mencionada similitud morfológica, *O. josei* y *O. nasutus* coexisten en simpatria y sintopía en la zona centro-este de su distribución (Hoffmann *et al.* 2002), aumenta la dificultad a la hora de asignar una identidad específica a los individuos del género que se colectan con fines científicos en Uruguay.

ADN mitocondrial, introgresión y reparto incompleto de linajes

Desde el comienzo de la década de 1980, los estudios filogenéticos y filogeográficos realizados para especies cercanamente relacionadas se han basado en el uso de genes mitocondriales. Los primeros estudios que utilizaron la variación en el ADN mitocondrial (ADNmt) emplearon la técnica de polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (Awise *et al.* 1979a; Awise *et al.* 1979b; Brown & Wright 1979), que luego fue sustituida por el uso de análisis de secuencias a partir del trabajo publicado por Kocher *et al.* (1989). Estos autores construyeron oligonucleótidos que podían usarse para la amplificación de fragmentos de ADNmt por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Entre las características que hicieron al ADNmt tan popular en primera instancia, además de la facilidad de amplificación, es la herencia exclusivamente materna (Awise 1995): el ADNmt paterno es eliminado antes, durante o después de la fecundación (Moses 1961; Ursprung & Schabtach 1965; Sutovsky *et al.* 1999; Xu 2005), lo que implica que el ADNmit de la célula se mantiene como un único *locus* no recombinante, por lo que la genealogía es única y refleja el patrón de la dinámica poblacional de las hembras (Awise *et al.* 1987),

facilitando la representación y análisis de la variación intraespecífica. Sumado a lo anteriormente mencionado, se asume que principalmente se acumulan mutaciones neutrales durante el paso del tiempo, por lo que el grado de divergencia observado entre dos especies refleja el tiempo de divergencia entre las mismas (Galtier *et al.* 2009). Asociado a esto último, su relativamente alta tasa de sustitución nucleotídica lo hace adecuado para su uso como marcador molecular para lograr una buena resolución en tiempos recientes, lo que lo convierte en una excelente herramienta tanto para datación molecular como para reconstrucción filogenética en varios niveles taxonómicos (Avice *et al.* 1987). Además, se destaca que no posee intrones y posee regiones intergénicas muy cortas (Gissi *et al.* 2008).

Recientemente se ha puesto en dudas varias de las características antes mencionadas (ver Ballard & Whitlock 2004; Galtier *et al.* 2009 y referencias allí citadas), pero particularmente, la presencia de introgresión mitocondrial causada por hibridación ha llevado a que se cuestione la idoneidad universal de este marcador, así como también al replanteamiento de hipótesis filogenéticas (Chan & Levin 2005; Near & Keck 2013). Un híbrido es el resultante del cruzamiento de dos especies diferentes, mientras que la introgresión es el movimiento de genes entre las mismas mediante hibridación y retrocruzamiento (Avice 2004). La introgresión de genes de una especie a otra (unidireccional) requiere en primera instancia que los genes inmigrantes se inserten en el genoma de la especie nativa evadiendo la selección en su contra (Chan & Levin 2005), para posteriormente extenderse en la población por medio de híbridos F1 que se entrecruzan con los organismos nativos (Chan 2003). La hibridación es hoy considerada una fuerza evolutiva de importancia (Arnold 2004), si bien ya había sido destacada anteriormente como tal por Anderson (1949) y Stebbins (1959), tanto en plantas (Stace 1987) como animales (Arnold 1997). La introgresión de ADNmt es una de las consecuencias más comunes de la hibridación, con comparativamente bajos niveles de introgresión de ADN nuclear (Avice 2004; Chan & Levin 2005) entre especies cercanamente emparentadas. La hibridación seguida de rápida introgresión puede ocurrir en un escenario de abundancias dispares, donde los inmigrantes son una muy pequeña proporción de la población nativa y donde la selección de pareja por parte de la hembra es dependiente de la frecuencia, por lo que los errores que dan lugar a parejas heteroespecíficas se darían con facilidad (Chan & Levin 2005). Esta introgresión de ADN de la línea matrilineal se da en este modelo con mayor frecuencia y velocidad que los componentes heredados por línea paterna o biparental, que es lo que se observa más frecuentemente. En algunos casos, el ADNmt de un taxón reemplaza completamente el del otro, sin ningún tipo de evidencia de

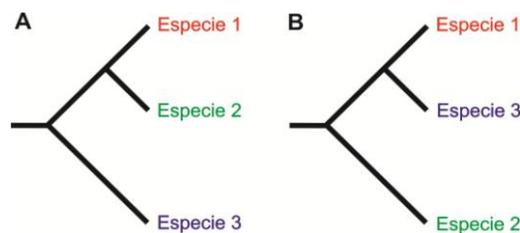


Figura 3. Estructura (simplificada) de un par de árboles construidos en base a genes mitocondriales (A) en comparación con otro construido en base a morfología o genes nucleares (coincidentes) (B) cuando ocurre hibridación seguida de introgresión, la que, en el ejemplo, habría involucrado a la Especie 2 hacia la Especie 1. En este trabajo se espera que si ocurrió un caso de hibridación seguida de introgresión se observen ambas topologías al comparar la filogenia obtenida en base a genes mitocondriales y nucleares.

introgresión nuclear o señal morfológica (Ballard & Whitlock 2004). Es por esto que la introgresión puede generar que el árbol de genes mitocondriales difiera significativamente del construido con genes nucleares (Ballard & Whitlock 2004), lo que ha sido evidenciado en varios taxa animales, entre ellos Invertebrados (*e.g.* Shaw 2002; Linnen & Farrell 2007; Wahlberg *et al.* 2009); Peces (*e.g.* Bernatchez *et al.* 1995; Sullivan *et al.* 2004; Bossu & Near 2009; Near & Keck 2013; Laakkonen *et al.* 2015); Mamíferos (*e.g.*, Patton & Smith 1994; Ruedi *et al.* 1997; Melo-Ferreira *et al.* 2005; Hailer 2015); Aves (*e.g.* Shapiro *et al.* 2004); Reptiles (*e.g.* McGuire *et al.* 2007) y Anfibios (*e.g.* Lamb & Avise 1986). En todos estos trabajos se detectó una correspondencia entre la filogenia construida en base a genes nucleares y caracteres morfológicos, ejemplificado en la Figura 3, pero discordante en conjunto con el árbol construido con genes mitocondriales. Es por ello que los resultados que arroja la utilización de un solo gen no deben ser interpretados sin la debida precaución debido a que existen casos de incongruencia entre los árboles de genes y árbol de las especies (*e.g.* Pamilo & Nei 1988; Avise 1989; Maddison 1997; Feijoo *et al.* 2010). En ausencia de introgresión, se espera que los genes mitocondriales alcancen la monofilia recíproca más rápidamente que los genes nucleares dado que el número poblacional efectivo es un cuarto del de estos últimos, pero si la introgresión mitocondrial ha sido constante y reciente, esos árboles de genes podrían mostrar tantas o más especies no monofiléticas como los árboles de genes nucleares (Moore 1995; Palumbi *et al.* 2001; Ballard & Whitlock 2004).

Por otra parte, el reparto incompleto de linajes (*"incomplete lineage sorting"*), puede manifestarse durante la reconstrucción filogenética de manera similar al caso de introgresión por hibridación (Maddison 1997; Sang & Zhong 2000; Holder *et al.* 2001; Huson *et al.* 2005; Buckley *et al.* 2006; Holland *et al.* 2008). Es un problema frecuente, que ocurre cuando los polimorfismos ancestrales persisten a lo largo de varios eventos de especiación y la pérdida subsecuente o la falla en el muestreo de algunas de las formas del

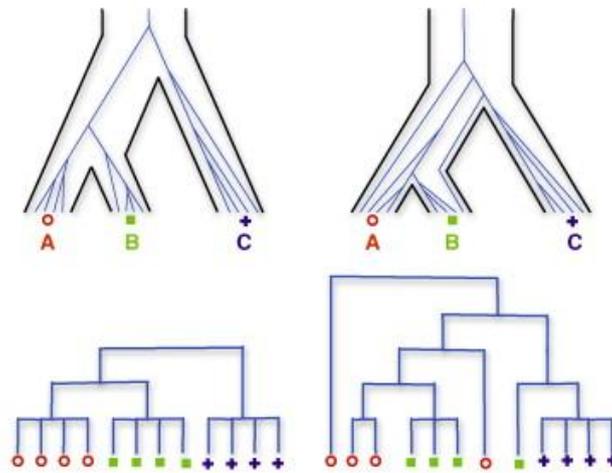


Figura 4. Esquema del proceso de reparto incompleto de linajes. Las letras A (círculo rojo), B (cuadrado verde) y C (cruz azul) representan supuestas especies, cada terminal representa un individuo, las líneas negras representan el árbol de especies y las azules la coalescencia de un *locus*. En el diagrama de la izquierda, el cladograma del *locus* de interés es concordante con el árbol de especies. A la derecha, el *locus* exhibe un caso de reparto incompleto de linajes, resultando en una incongruencia entre el árbol de dicho *locus* y el árbol de las especies. Tomado con permiso de Tenailon *et al.* 2010.

gen en las diferentes especies puede resultar en árboles de genes incongruentes, en particular cuando estos genes (especies) sufrieron una diversificación reciente o una historia caracterizada por intervalos de tiempo cortos entre eventos de diversificación de linajes, como en el caso de las radiaciones adaptativas (Tajima 1983; Maddison 1997) (Figura 4). Este factor afecta en mayor medida la interpretación cuando se trabaja con genes nucleares que para genes mitocondriales, dado que el número poblacional efectivo (N_e) para los *loci* mitocondriales es un cuarto del N_e para *loci* nucleares. Se espera que el reparto de linajes progrese de manera más veloz para los alelos mitocondriales (Funk & Omland 2003).

Si bien es muy difícil discriminar entre el reparto incompleto de linajes y la existencia de un evento de hibridación e introgresión, ambos procesos pueden ser distinguidos considerando los patrones espaciales de similitud de haplotipos entre las especies, sumado a la comparación entre árboles construidos en base a genes nucleares y mitocondriales y considerando el tiempo de divergencia entre las especies contrastado contra el tiempo estimado de arribo a la monofilia para el caso de reparto incompleto de linajes. Por definición, la divergencia de polimorfismos ancestrales debe preceder la divergencia entre especies (Edwards & Beerli 2000). Cuando dos especies comparten un haplotipo idéntico, puede explicarse por reparto incompleto de linajes solo si la especiación ocurrió tan recientemente que no hubo tiempo para que ocurriera divergencia

genética. Entonces, si el reparto aleatorio de polimorfismos ancestrales es responsable de la similitud de los haplotipos entre las especies descendientes, se espera que dichos haplotipos se encuentren aleatoriamente distribuidos en las poblaciones, en cambio, si la similitud de haplotipos entre las especies es generada por hibridación reciente, entonces dicha similitud debería ser observada en poblaciones simpátricas, zonas híbridas o límites de las especies involucradas (Barbujani *et al.* 1994; Hare & Avise 1998; Masta *et al.* 2002). Por otra parte, si desde el evento de hibridación pasó un tiempo suficiente como para que la variante incorporada se fijara en la población receptora, entonces la manera de diferenciar entre un antiguo evento de introgresión mitocondrial y un caso de reparto incompleto de linajes reside en contrastar el tiempo desde la divergencia estimado entre las especies bajo la hipótesis de introgresión o de reparto incompleto de linajes para el gen mitocondrial en comparación con el tiempo desde la divergencia estimado con los genes nucleares (Avise & Ball 1990; Funk and Omland 2003; Peters *et al.* 2007).

Importancia de las investigaciones en sistemática y sus aplicaciones a la conservación

Un mejor conocimiento de la sistemática y la generación de un marco teórico sobre la biología, ecología y distribución de las especies, y la posibilidad de identificar ejemplares o sus partes se tornan fundamentales para una aproximación científica a su conservación y uso sustentable (Cracraft 2002). Los roedores no son considerados mamíferos "carismáticos" y cuentan con muy poco aprecio entre el público en general, lo que explica el por qué se pase por alto tanto su papel ecológico como los problemas de conservación (Amori & Gippoliti 2003). Aunque los roedores no figuren entre los mamíferos con mayor amenaza de extinción, existen pruebas históricas que demuestran la vulnerabilidad de diversos linajes filogenéticos (Ceballos & Brown 1995; MacPhee & Flemming 1999). Es de destacar que el orden Rodentia representa el 51-52% de las extinciones de mamíferos en los últimos 500 años (Ceballos & Brown 1995). La conservación de estos y otros grupos depende y está estrechamente vinculada al conocimiento de las relaciones filogenéticas y la taxonomía de los grupos biológicos (Amori & Gippoliti 2003). Entre las especies objetivo de este estudio, *O. josei* se considera dentro de la categoría "En Peligro" (EN) para la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), por considerarse que habita en un área restringida, de pocas localidades conocidas, y que la conservación de su hábitat está seriamente comprometida por la expansión urbana y el desarrollo del turismo -aunque esta información ha de ser re-

evaluada (Queirolo & Geise 2008). En el contexto de nuestro país, *O. josei* es considerada una especie prioritaria para la conservación para el SNAP (Sistema Nacional de Áreas Protegidas), por ser un mamífero endémico nacional y de distribución restringida (Soutullo *et al.* 2009; González *et al.* 2013), lista a la cual recientemente se ha incluido *O. nasutus*, especie considerada endémica regional (González *et al.* 2013). Por lo tanto, es una prioridad la actualización regular de la sistemática, que refina el conocimiento sobre la diversidad y relaciones filogenéticas entre roedores (u otros grupos), para su conservación (Ostfield & Keesing 2000; Amori & Gippoliti 2003).

HIPÓTESIS

Para este trabajo y en base a los antecedentes mencionados anteriormente, se plantean dos hipótesis:

- 1) El género *Oxymycterus* en Uruguay está representado por una única especie biológica en la que existen dos linajes mitocondriales bien diferenciados (García-Olaso 2008). Esta discrepancia podría ser resultado de reparto incompleto de linajes, o de hibridación con otra especie seguida de introgresión de ADNmt, proceso que podría haber involucrado a *O. rufus*, especie de distribución adyacente a *O. nasutus*.
- 2) El género *Oxymycterus* en Uruguay está representado por dos especies, tal como apuntan Hoffmann *et al.* (2002), las cuales están diferenciadas filogenéticamente.

Respecto a la hipótesis 1, si la introgresión mitocondrial o el reparto incompleto de linajes ha sido prevalente en la historia de las especies objetivo, se esperan los siguientes patrones filogenéticos:

1. No monofilia de *O. nasutus* en el árbol de genes mitocondrial.
2. Discordancia entre el árbol de genes mitocondrial y nuclear.
3. Concordancia entre la evidencia morfológica y la filogenia en base a genes nucleares.

Para determinar si está ocurriendo introgresión, es necesario que las tres condiciones expresadas anteriormente se cumplan, dado que si la introgresión involucra el genoma nuclear (o al menos el gen nuclear bajo estudio), toda señal es borrada y la genealogía génica podría no reflejar la historia previa de la divergencia entre los taxa. Además, otro tipo de evidencia no filogenética debe adicionarse a los análisis para distinguir entre introgresión y reparto incompleto de linajes como explicación para estos patrones (Maddison 1997; Funk & Omland 2003), dado que es difícil distinguir entre el patrón resultante de un caso de introgresión por hibridación reciente de aquel generado por polimorfismo ancestral y reparto incompleto de linajes de genealogías de genes únicos (Nielsen & Wakeley 2001). En este caso se recurriría a la evaluación de los patrones geográficos de los polimorfismos entre *O. josei* y *O. rufus*.

Por otra parte, en el caso de la hipótesis 2, el patrón observado en el árbol de genes construido en base a genes mitocondriales podría corresponderse con la verdadera historia de las especies, lo cual implicaría la presencia de dos especies morfológicamente muy similares, y alejadas filogenéticamente, en el país. En ese caso, se esperan los siguientes resultados:

1. Concordancia en cuanto a la topología de los árboles obtenidos mediante las dos matrices de datos (gen nuclear y mitocondrial).
2. Monofilia recíproca entre las dos especies blanco.
3. Existencia de algún carácter morfológico que permita su discriminación, que se haya pasado por alto en estudios anteriores.

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fue determinar la diversidad de ratones hocicudos presentes en Uruguay, a modo de discriminar si estamos ante dos especies biológicas o ante una sola especie. Los objetivos específicos fueron estudiar nuevos caracteres no ligados al genoma mitocondrial (ADN nuclear) a modo de determinar si los resultados se corresponden o no con los arrojados por los análisis realizados para ADNmt. Por otra parte, si los resultados coinciden con la primera hipótesis, se propone determinar qué proceso actuó sobre la historia de las especies: hibridación o reparto incompleto de linajes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de tejido (músculo y/o hígado preservado en etanol 95°) fueron obtenidas de las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo y del Laboratorio de Evolución (Facultad de Ciencias). La selección de ejemplares intentó maximizar la representatividad geográfica y diversidad cromática dentro de las poblaciones (Tabla 1, Figura 5, Figura 6). Al conjunto de secuencias de *O. josei* y *O. nasutus* obtenidas en este trabajo, se agregaron las secuencias disponibles en GenBank para los genes IRBP y Citocromo b de todas las especies del género (incluyendo las especies focales) (Tabla 2, ver demás Apéndice 1 por la lista completa de ejemplares depositados en colecciones nacionales) Lamentablemente, no se pudieron incluir secuencias de los holotipos de *O. nasutus* y de *O. josei*, aunque se cuenta con secuencias de ejemplares colectados en las localidades típicas de ambos taxones (Barra de Maldonado y Las Flores, respectivamente).

Tomando como referencia el trabajo de D'Elía (2003) y Salazar-Bravo *et al.* (2013), se eligieron como grupo externo para los análisis filogenéticos por su proximidad filogenética con el género de estudio, las siguientes especies la tribu Akodontini: *Necromys obscurus* (sólo Citocromo b), *N. lenguarum* (sólo Citocromo b), *Akodon montensis*, *A. azarae*, *Deltamys kempi*, *Thaptomys nigrita*, *Bibimys chacoensis* (sólo IRBP), *B. labiosus* y *Juscelinomys haunchacae*. Dichas secuencias fueron extraídas de GenBank (Tabla 2).

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.

La extracción de ADN se realizó según el protocolo propuesto por Miller *et al.* (1988) con modificaciones, el cual involucra la digestión del tejido con dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) y proteinasa K, precipitación de proteínas con cloruro de sodio (NaCl) y finalmente precipitación de ADN con isopropanol. Las muestras fueron diluidas en TE 1X y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

A partir de las diluciones de extracciones de ADN (aproximadamente 4 ng/μL de concentración), se amplificó un fragmento de 801 pares de bases (pb) del extremo 5' del gen de citocromo b del genoma mitocondrial, por la técnica de la Reacción en Cadena de la

Tabla 1. Lista de ejemplares secuenciados.

Ejemplar ^a	N de campo ^b	País	Departamento	Localidad	Código de localidad ^c	Gen secuenciado ^d
MNHN 7297	-	Uruguay	Rocha	Parque Nacional San Miguel	3	Cit-b
MNHN 6253	SCV 035	Uruguay	Rocha	Refugio de Fauna Laguna de Castillos	6	Cit-b; IRBP
-	CA 614	Uruguay	Rocha	Ruta 15 km 10 Arroyo la Paloma	11	Cit-b
MNHN 6206	EMG 1909	Uruguay	Treinta y Tres	Quebrada de los Cuervos	14	Cit-b
MNHN 5009	GF 351	Uruguay	Maldonado	Barra de Maldonado	18	Cit-b
-	GD 723	Uruguay	Maldonado	Barra del Arroyo Maldonado	18	Cit-b
MNHN 7249	JAML 022	Uruguay	Maldonado	Arroyo San Carlos, Establecimiento "El Quijote"	19	Cit-b
-	CA 480	Uruguay	Maldonado	El Peñasco	20	Cit-b
MNHN 3849	CA 689	Uruguay	Maldonado	Las Flores, W Arroyo Tarariras	26	Cit-b
MNHN 5615	EMG 1567	Uruguay	Canelones	Balneario San Luis	31	Cit-b; IRBP
MNHN 6313	EMG 1729	Uruguay	Rivera	Platón	35	IRBP
MNHN 6319	EMG 1733	Uruguay	Rivera	Platón	35	Cit-b; IRBP
MNHN 6320	EMG 1728	Uruguay	Rivera	Platón	35	Cit-b; IRBP
MNHN 4270	EV 988	Uruguay	San José	5 Km NE de Ecilda Paulier, Estancia "El Relincho"	39	IRBP
MNHN 4284	EV 1021	Uruguay	San José	5 Km NE de Ecilda Paulier, Estancia "El Relincho"	39	Cit-b

Se indican los números de catálogo correspondientes a cada ejemplar secuenciado.

^a Número de catálogo de la colección donde se encuentra depositado el ejemplar. En los casos en que el ejemplar no ha sido ingresado a la colección se indica con "-". MNHN: Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo.

^b Número de catálogo de campo de cada ejemplar. Los acrónimos corresponden a: CA: Carlos Altuna; EMG: Enrique González; EV: Laboratorio de Evolución (Facultad de Ciencias); GD: Guillermo D'Elía; GF: Gustavo Fregueiro; JAML: Juan A. Martínez-Lanfranco; SCV: Santiago Cruces.

^c Corresponde a los códigos de localidad de las Figuras 5.

^d Cit-b: Citocromo b; IRBP: Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Saiki *et al.* 1988). Se utilizaron los oligonucleótidos MVZ 05 y MVZ 16 (Smith & Patton 1991, 1993; respectivamente). El volumen total de reacción para la PCR fue de 25 µl compuestos por 12,5 µl de dilución de ADN y 12,5 µl de reactivos en las siguientes concentraciones: Buffer 1X, dNTPs 0,3 mM, oligonucleótidos 0,2 µM, MgCl₂ 3,0 mM y Taq polimerasa 0,08 u/µl. La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones de ciclado: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, asociación a 45°C y extensión a 72°C por 30 segundos cada uno, finalizando con una fase de extensión a 72°C por 5 minutos. Todas las reacciones de PCR incluyeron un control negativo.

De la misma manera que se amplificó el gen citocromo b, se partió de las diluciones de ADN a 4 ng/µL y se amplificó un fragmento de 759 (pb) del primer exón del gen nuclear IRBP (Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein) por la técnica de PCR, utilizando en este caso los oligonucleótidos A1 y F1 (Jansa & Voss 2000). El volumen total de reacción fue de 25 µl compuestos por 12,5 µl de dilución de ADN y 12,5 µl de reactivos en las siguientes concentraciones: Buffer 1X, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos 0,2 µM, MgCl₂ 2m M y Taq platinum 0,04 u/µl. La amplificación fue realizada utilizando un protocolo de

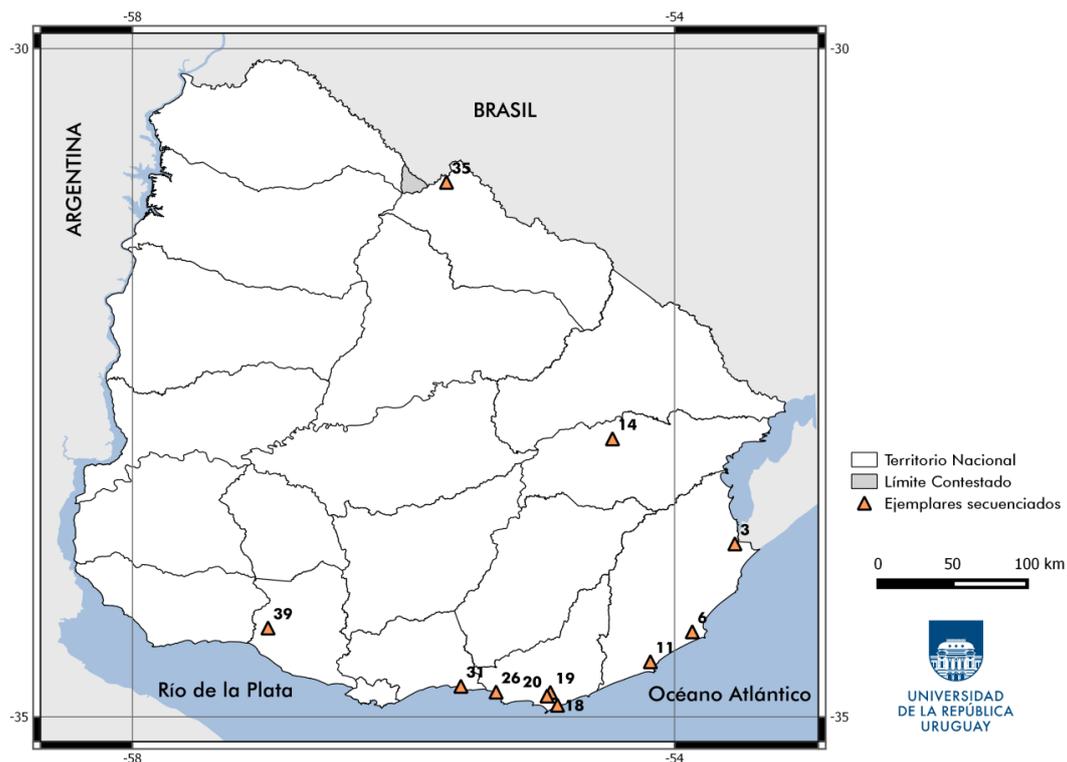


Figura 5. Localidades de los ejemplares secuenciados. Los números coinciden con los de la Figura 6. Ver además Tabla 1.

“touch-down” de cuatro etapas. La primera consistió en 5 ciclos de desnaturalización inicial a 94°C por 20 s, asociación a 62°C por 15 s y extensión a 72°C por 1 min. Al igual que la primera, la segunda y la tercera etapa mantuvieron las temperaturas y tiempos de desnaturalización y extensión, del mismo modo que la cantidad de ciclos, pero la temperatura de asociación fue de 60 y 58°C respectivamente. En la etapa final, la temperatura de asociación fue de 52°C, manteniendo las temperaturas de desnaturalización y extensión pero en este caso por 23 ciclos. La reacción de amplificación comenzó con una etapa de desnaturalización de ADN a 94°C por 5 minutos y finalizó con una etapa de extensión a 72°C por 3 minutos. En todos los experimentos fueron incluidos controles negativos de amplificación para descartar la ausencia de contaminación.

El control de los productos de la amplificación se llevó a cabo mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8% en TBE 1X, teñidos en solución de bromuro de etidio (BrEt) 5mg/ml y visualizados en un transluminador UV. Los productos que mostraron una única banda una intensidad similar al fragmento de 800 pb (tanto para citocromo b como IRBP) del estándar de peso molecular (100bp DNA Ladder Fermentas™), fueron seleccionados para su secuenciación. Los productos de PCR fueron enviados a la empresa Macrogen Inc. (Corea) para su purificación y posterior secuenciación a partir de los oligonucleótidos MVZ 05 (en un sentido) para citocromo b y

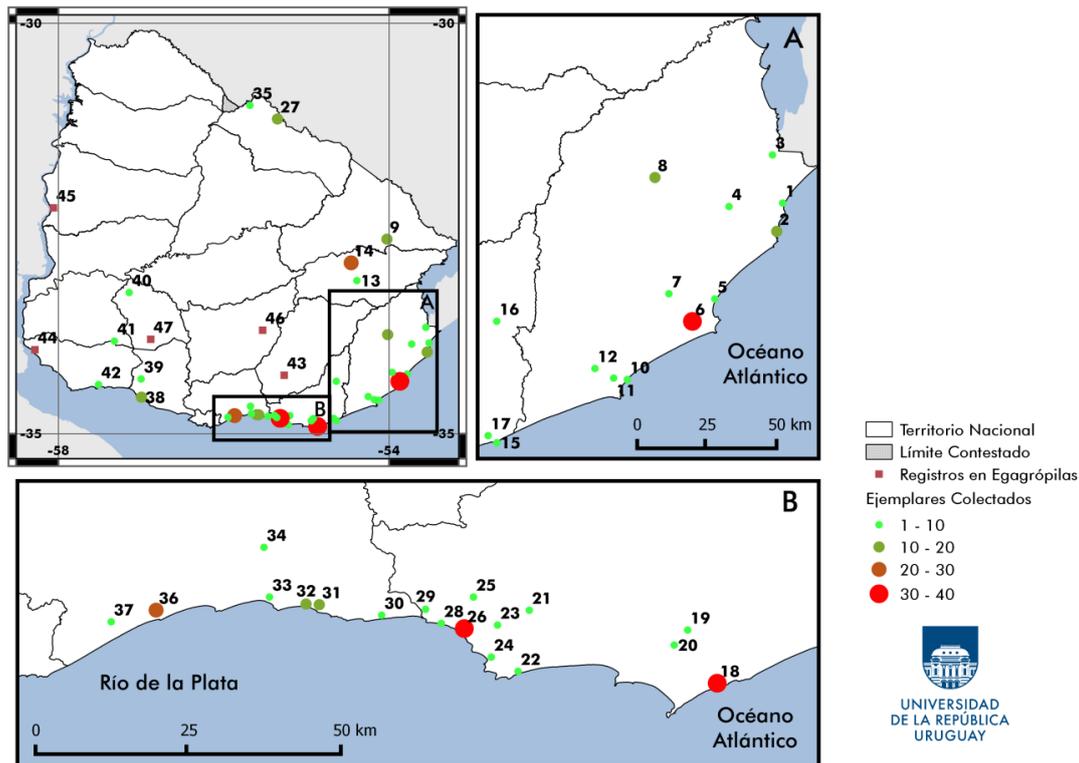


Figura 6. Localidades de los ejemplares depositados en colecciones nacionales.. Los números coinciden con los de la Figura 5. Ver Anexo 1.

A1 y F1 (ambas cadenas) para IRBP. Todas las secuencias generadas en este trabajo serán eventualmente depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los genes mencionados fueron elegidos teniendo en cuenta la disponibilidad de secuencias de las especies del género depositadas en GenBank, a modo de poder realizar los análisis filogenéticos con la mayor cantidad de especies posible.

Edición de secuencias

Las secuencias fueron editadas a partir de los cromatogramas, utilizando el programa ProSeq versión 3.2 (Filatov 2009). Se utilizó la herramienta *online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990) para comparar cada una de las secuencias con la base de datos GenBank, a modo de corroborar la identidad de las mismas como pertenecientes al género *Oxymycterus*. Debido a que no se han documentado ni se encontraron inserciones, deleciones o gaps internos y a que las secuencias de estudio tienen un grado de divergencia relativamente pequeño, fue posible realizar el alineamiento de secuencias de forma manual, utilizando para tal fin el programa ProSeq. Aquellas secuencias cuyo tamaño fuera inferior a 801, se las completó con el nucleótido genérico “N”.

Tabla 2. Lista completa de secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos.

Especie o ejemplar	Denominación ^a	Nº Acceso ^b
IRBP		
Grupo interno		
MNHN 4270	EV_988	*
MNHN 5615	EMG_1567	*
MNHN 6253	SCV_035	*
MNHN 6313	EMG_1729	*
MNHN 6319	EMG_1733	*
MNHN 6320	EMG_1728	*
<i>O. nasutus 1</i>	O_nasutus_1	KC953431.1
<i>O. nasutus 2</i>	O_nasutus_2	EF661855.1
<i>O. nasutus MVZ 182701</i>	O_nasutus_MVZ182701	AY277468.4
<i>O. rufus 1</i>	O_rufus_1	AY277470.1
<i>O. rufus 2</i>	O_rufus_2	AY277469.1
<i>Oxymycterus delator</i>	O_delator	AY277466.1
<i>O. hiska 1</i>	O_hiska_1	KC953430.1
<i>O. hiska 2</i>	O_hiska_2	AY277467.1
Grupo externo		
<i>Thaptomys nigrita</i>	T_nigrita	AY277482.1
<i>Akodon azarae</i>	A_azarae	AY277422.1
<i>A. montensis</i>	A_montensis	EF626796.1
<i>Bibimys chacoensis</i>	B_chacoensis	AY277435.4
<i>B. labiosus</i>	B_labiosus	AY277436.1
<i>Juscelinomys huanchacae</i>	J_huanchacae	AY277452.1
<i>J. huanchacae</i>	J_huanchacae_2	AY277452.1
<i>Deltamys kempi</i>	D_kempi	AY277444.1
Cit-b		
Grupo interno		
MNHN 3849	CA_689	*
MNHN 4284	EV_1021	*
MNHN 5009	GF_351	*
MNHN 5615	EMG_1567	*
MNHN 6206	EMG_1909	*
MNHN 6253	SCV_035	*
MNHN 6319	EMG_1733	*
MNHN 6320	EMG_1728	*
MNHN 7249	JAML_022	*
MNHN 7297	MNHN_7297	*
CA 480	CA_480	*
CA 614	CA_614	*
GD 723	GD_723	*

Tabla 2 (continuación). Lista completa de secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos.

Espece o ejemplar	Denominación ^a	Nº Acceso ^b
<i>Oxymycterus josei</i> (MVZ 183264)	O_josei_MVZ183264	AF175288.1
<i>O. josei</i> (MVZ 183265)	O_josei_MVZ183265	AF175289.1
<i>O. nasutus</i>	O_nasutus	EF661854.1
<i>O. nasutus</i> (CA 695)	O_nasutus_CA_695	AF175287.1
<i>O. nasutus</i> (GD 577)	O_nasutus_GD_577	DQ518258.1
<i>O. nasutus</i> (MVZ 182701)	O_nasutus_MVZ_182701	AF175286.1
<i>O. nasutus</i> (PM 66)	O_nasutus_PM_66	KJ936958.1
<i>O. rufus</i> 1	O_rufus_1	AF516669.1
<i>O. rufus</i> 2	O_rufus_2	AF516668.1
<i>O. rufus</i> 3	O_rufus_3	AF516667.1
<i>O. rufus</i> 4	O_rufus_4	AF516666.1
<i>O. rufus</i> 5	O_rufus_5	AF516651.1
<i>O. rufus</i> 6	O_rufus_6	AF454775.1
<i>O. rufus</i> 7	O_rufus_7	AF454776.1
<i>O. rufus</i> 8	O_rufus_8	AF454777.1
<i>O. rufus</i> 9	O_rufus_9	AF516652.1
<i>O. rufus</i> 10	O_rufus_10	AF516653.1
<i>O. rufus</i> 11	O_rufus_11	AF516654.1
<i>O. rufus</i> 13	O_rufus_13	AY275127.1
<i>O. rufus</i> 14	O_rufus_14	AY275126.1
<i>O. amazonicus</i>	O_amazonicus	AF454765.1
<i>O. dasytrichus</i> 1	O_dasytrichus_1	AF516665.1
<i>O. dasytrichus</i> 2	O_dasytrichus_2	AF516664.1
<i>O. dasytrichus</i> 3	O_dasytrichus_3	AF454768.1
<i>O. dasytrichus</i> 4	O_dasytrichus_4	AF454769.1
<i>O. dasytrichus</i> 5	O_dasytrichus_5	AF454770.1
<i>O. dasytrichus</i> 6	O_dasytrichus_6	AF454771.1
<i>O. delator</i> 1	O_delator_1	DQ518256.1
<i>O. delator</i> 2	O_delator_2	AF454766.1
<i>O. delator</i> 3	O_delator_3	AF454767.1
<i>O. delator</i> 4	O_delator_4	AY275125.1
<i>O. delator</i> 5	O_delator_5	U03525.2
<i>O. hiska</i>	O_hiska	U03542.3
<i>O. judex</i> 1	O_judex_1	AF454773.1
<i>O. judex</i> 2	O_judex_2	AF454774.1
<i>O. misionalis</i>	O_misionalis	DQ518257.1
<i>O. misionalis</i> 2	O_misionalis_2	EU449517.1
<i>O. paramensis</i> 1	O_paramensis_1	DQ518259.1
<i>O. paramensis</i> 4	O_paramensis_4	U03536.2
<i>O. quaestor</i> 1	O_quaestor_1	AF454772.1

Tabla 2 (continuación). Lista completa de secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos.

Especie o ejemplar	Denominación ^a	Nº Acceso ^b
<i>O. quaestor 2</i>	O_quaestor_2	AF516660.1
<i>O. wayku</i>	O_wayku	DQ518262.1
Grupo externo		
<i>Thaptomys nigrita</i>	T_nigrita	KF815393.1
<i>Akodon azarae</i>	A_azarae	AY702963.1
<i>A. montensis</i>	A_montensis	JX538380.1
<i>B. labiosus</i>	B_labiosus	DQ444329.1
<i>Necromys lenguarum</i>	N_lenguarum	EF531680.1
<i>N. obscurus</i>	N_obscurus	DQ683183.1
<i>Brucepattersonius iheringi</i>	B_iheringi	AF108667.1
<i>Juscelinomys huanchacae</i>	J_huanchacae	JQ898083.1
<i>J. huanchacae</i>	J_huanchacae	JQ898082.1
<i>Deltamys kempi</i>	D_kempi	AY195861.1

^a Denominación utilizada en las reconstrucciones.

^b Los números refieren al número de acceso de GenBank. *, secuencias generadas en este estudio

Análisis de secuencias

Los análisis descriptivos de las secuencias fueron realizadas con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013).

Se realizaron los siguientes análisis filogenéticos en ambos sets de datos (Cit-b e IRBP) por separado: Máxima Parsimonia (MP; Farris 1982), Máxima Verosimilitud (MV; Felsenstein 1981) y Análisis Bayesiano (AB; Rannala & Yang 1996).

Para la inferencia filogenética en base al gen IRBP se utilizaron 22 secuencias de *Oxymycterus* más el grupo externo, en cambio para el gen citocromo b se utilizaron 65 secuencias, las cuales incluyen el género *Oxymycterus* y el grupo externo (Tabla 2). Las diferencias en tamaño de muestra responden a la disponibilidad de dichas secuencias en las bases de datos (GenBank). En el análisis de MP, los caracteres fueron tratados como no ordenados y de igual peso. Se utilizó el programa MEGA 6.06. Como método de búsqueda del árbol más parsimonioso se utilizó el algoritmo de búsqueda heurística Tree Bisection Reconnection (TBR), construyendo 100 árboles iniciales obtenidos mediante la adición

aleatoria de secuencias. Diez mil (1×10^4) réplicas de bootstrap (BP) fueron realizadas para determinar el apoyo estadístico de los nodos.

Para determinar el modelo de sustitución nucleotídica al que las secuencias mejor se ajustan, se utilizó el programa jModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.* 2012) y se eligió el modelo de sustitución en base al Criterio de Información de Akaike (AIC; Akaike 1974) y al Criterio de Información Bayesiano (BIC, Schwarz 1978). El modelo de sustitución elegido para IRBP por el AIC fue TPM1 (R[AC]= R[GT]=1.00; R[AG]= R[CT]=3.7536; sin sitios invariables ni distribución Gama), el modelo K80 fue elegido por BIC. Para los análisis posteriores se escogió TPM1 dado que K80 es un modelo anidado dentro del primero. De todos modos, se realizaron los análisis para estos dos modelos a modo de verificar la concordancia de los resultados. El modelo de sustitución elegido para citocromo b fue HKY+I+G, seleccionado tanto por AIC como por BIC. El análisis de MV se realizó en PhyML 3.1 (Guindon *et al.* 2009). El apoyo estadístico de los nodos fue determinado calculando los valores de bootstrap (Felsenstein 1985), con mil réplicas.

El Análisis Bayesiano fue llevado a cabo en BEAST 1.8.0 (Drummond & Rambaut 2007), utilizando el mismo modelo de sustitución nucleotídica obtenido anteriormente para cada gen por separado. La probabilidad posterior fue estimada por MCMC en tres corridas independientes, de 90 millones de generaciones con muestreo de parámetros cada 9.000 generaciones para cit-b, y de cinco corridas de 20 millones de generaciones cada una con muestreo cada 2.000 generaciones en IRBP. El 10% inicial fue descartado como *burn-in* (9 millones) en cit-b y 12,5% (2.500.000) para IRBP y se utilizó el programa TRACER 1.6.0 (Rambaut *et al.* 2014) para verificar la convergencia de los resultados, y que para todos los indicadores el valor de ESS (*Effective Sample Size*) fuera superior a 200, para cada corrida independiente y para la combinación de las corridas, gestionadas en el programa LogCombiner 1.8.0 (Rambaut & Drummond 2013). El parámetro modelo de reloj molecular fue inicialmente establecido en Estricto a modo de evaluar la eficiencia de la MCMC en ambos sets de datos. Dado que los valores de ESS fueron en todos los casos mayores a 200 (para este análisis se corrió una MCMC de 1 millón de generaciones para IRBP y una MCMC de 10 millones para cit-b), se estableció la siguiente corrida un modelo más complejo que incluyó establecer el reloj molecular en lognormal relajado (si los valores de ESS hubieran sido bajos para esta primera corrida, se consideraría que un modelo aún más complejo no podría ser llevado a cabo en el programa y se debería aumentar el número de generaciones), esta vez con una MCMC de 10 millones de generaciones para IRBP, 20 millones para cit-b. En todos los casos, la tasa de sustitución

fue estimada por el programa, restringiendo el espacio a explorar una distribución uniforme y siendo el máximo de dicha distribución el valor de la tasa de sustitución mitocondrial para roedores de pequeño tamaño corporal y tiempo generacional para IRBP (0,0230 sustituciones por millón de años; Welch *et al.* 2008; Horn *et al.* 2011) y una distribución normal de media y valor inicial de 0,0230, desvío estándar 0,01, mínimo 0 y máximo 1 para cit-b. En las corridas de IRBP, el valor estimado del parámetro `uclid.stdev` (parámetro que indica a qué modelo de reloj molecular ajustan mejor los datos) para la segunda corrida fue de 0,307, por lo tanto, para las siguientes corridas se especificó un reloj estricto, dado que valores cercanos a cero del parámetro `uclid.stdev` indican que los datos exhiben una baja heterogeneidad en la tasa de sustitución entre los linajes. De igual forma, el mismo parámetro en cit-b obtuvo un valor superior a 1 (1,34) que indica que los datos exhiben una significativa heterogeneidad en la tasa de sustitución entre los linajes. En Logcombiner también se combinaron los árboles de las diferentes corridas. Por último, con TreeAnnotator 1.8.0 (Rambaut & Drummond 2013) se resumió la información contenida en los árboles muestreados de las corridas independientes en un solo árbol. El árbol obtenido corresponde al que maximiza el producto de la probabilidad posterior para todos los nodos.

RESULTADOS

Descripción de las secuencias

El conjunto de secuencias del gen IRBP, de 759 sitios, mostró 16 sitios variables, de los cuales 9 fueron informativos según el criterio de parsimonia. No se observaron marcados sesgos de composición nucleotídica de este gen (Tabla 3), como ya había sido apreciado en otros estudios (D'Elía 2003). Los niveles de divergencia nucleotídica (distancia genética) entre pares de haplotipos, representados como número de bases diferentes y como distancia Kimura-2-parámetros (K2P) se encuentran en el Anexo 2, Tabla A. Los valores de divergencia entre pares de haplotipos para las secuencias de especímenes uruguayos estuvieron comprendidas entre 0 y 7 sustituciones nucleotídicas o 0 a 1% en distancia K2P pudiéndose apreciar dos grupos: uno (G1) cuyas secuencias son idénticas (distancia igual a cero) que comprende los ejemplares EMG 1728, EMG 1733 y EV 988 y una segunda (G2) compuesta por EMG 1567, EMG 1729 y SCV 035 con menos de cuatro sustituciones de distancia (0,1 a 0,6%) entre los ejemplares que comprenden el grupo. Entre estos dos grupos, en cambio, existen diferencias del orden de 4 a 7 sustituciones (0,6 a 1%). Es de destacar que el ejemplar SCV 035 posee los máximos valores de distancia con otros ejemplares dentro del género *Oxymycterus*, que se debe a una mayor cantidad de sustituciones únicas (tres sitios *singletons* contra uno en EV 988 o cero con los restantes). Cuando se considera las secuencias obtenidas de Genbank de las especies *O. nasutus* y *O. rufus*, el grupo G1 posee una distancia genética globalmente menor con *O. rufus* que con *O. nasutus* (1 sustitución; 0,1%), e inversamente, G2 con *O. nasutus* (0 a 3 sustituciones; 0 a 0,4%). No se detectaron polimorfismos entre las secuencias de IRBP pertenecientes al mismo grupo de ejemplares uruguayos.

Tabla 3. Composición nucleotídica de las secuencias utilizadas (género *Oxymycterus*).

		C	A	G	T
IRBP	Total	27,4	23,0	27,9	21,7
	Primera	27,8	25,0	34,7	12,5
	Segunda	21,2	28,5	18,6	31,7
	Tercera	33,2	15,6	30,3	20,9
Cit-b	Total	23,0	27,9	21,7	27,4
	Primera	23,5	28,7	22,2	25,6
	Segunda	25,1	20,9	13,4	40,5
	Tercera	43,2	36,3	1,9	18,6

Algunas de las secuencias de citocromo b obtenidas fueron de largo inferior a 801 pb, a causa de que el cromatograma no mostró una buena resolución en el extremo 5'. De todos modos, se verificó que pertenecieran al fragmento de interés mediante la traducción de los codones a aminoácidos, la determinación de la composición nucleotídica y el alineamiento de las secuencias entre si y contra otros Sigmodontinos. Se corroboró la no existencia de codones de terminación dentro de los marcos abiertos de lectura de las secuencias mediante la traducción de los codones a aminoácidos. Las secuencias de cit-b mostraron 316 sitios variables y 262 sitios parsimoniosamente informativos. Como ya ha sido destacado repetidas veces en la bibliografía para mamíferos y especialmente para Sigmodontinos (Irwin *et al.* 1991; Johns & Avise 1999; D'Elia 2003), se observó en este gen un fuerte sesgo en la composición nucleotídica, manifestado por un marcado déficit de guanina en las posiciones 2 y 3 de los codones (Tabla 3), rasgo que es típicamente encontrado en secuencias codificantes de ADN mitocondrial animal (Brown 1985). Los niveles de divergencia nucleotídica (distancia genética) entre pares de haplotipos, representados como número de bases diferentes y como Kimura-2-parametros se encuentran en el Anexo 2, Tabla B. Los valores de divergencia entre pares de haplotipos para las secuencias de especímenes uruguayos estuvieron comprendidos entre 0 y 47 sustituciones nucleotídicas, 0 a 7,0 % en distancia K2P. Del mismo modo que con IRBP, se pueden diferenciar dos grupos. El primero (G1) compuesto por los ejemplares 44 a 49, 51 y 54 de la Tabla 5, que se diferencian entre sí por hasta cinco sustituciones (entre 0,14 y 0,7%) y un segundo grupo (G2), compuesto por los ejemplares 50, 52, 53, 55 y 56 (de la misma tabla), con una variación intragrupo de máximo 5 sustituciones (0,1%), siendo algunos idénticos entre sí. La distancia entre estos grupos varía entre 6,2-7,1% (43-47 sustituciones), distancias similares a las reportadas en otros estudios que comparan otras especies reconocidas de mamíferos (Bradley & Baker 2001; Smith & Patton 1993).

Respecto a otras especies del género, *O. rufus* presenta en promedio 10 sustituciones (1,26%) de diferencia entre individuos, siendo el mínimo 0 y el máximo 22 sustituciones, o 0-2,9% en rango. Otras especies como *O. dasytrichus*, *O. misionalis*, *O. delator* y *O. judex* presentan distancias genéticas intraespecíficas que en promedio no superan el 1% (ver Tabla 4). Para otras especies del género esta información no pudo ser analizada a causa de la escasez de ejemplares disponibles.

Tabla 4. Distancias intraespecíficas (Kimura 2 parámetros y número de sustituciones) de especies de *Oxymycterus* (no incluidas *O. nasutus* y *O. josei*) utilizando el gen citocromo b.

	K2P	N. Sustituciones
<i>O. rufus</i>	1,2 (0-2,9)	10 (0-22)
<i>O. dasytrichus</i>	0,9 (0,1-1,6)	7 (1-13)
<i>O. delator</i>	0,2 (0-0,5)	2 (0-4)
<i>O. misionalis</i>	0,5	4
<i>O. paramensis</i>	6	51
<i>O. wayku</i>	-	-
<i>O. amazonicus</i>	-	-
<i>O. judex</i>	0	0
<i>O. quaestor</i>	1,2	8
<i>O. hiska</i>	-	-

Anotado como: promedio y rango entre paréntesis.

Para las especies para las que se dispone de muy pocos especímenes no pudo ser realizado.

Análisis filogenéticos: IRBP

El análisis del set de datos de 22 secuencias de 759 pares de bases del gen nuclear IRBP mediante el método de parsimonia dio como resultado 89 árboles filogenéticos igualmente parsimoniosos, representados por el árbol consenso estricto (los nodos representados en menos de 50% de los árboles obtenidos con las 10000 réplicas de bootstrap fueron colapsados) en la Figura 7. El largo de los árboles fue de 63 pasos, el índice de consistencia fue de 0,95 y el de retención de 0,97. Estos valores altos de los índices de consistencia y retención indican un bajo grado de homoplasia en la matriz analizada, lo que permite tener una alta confiabilidad en los resultados obtenidos por este método de análisis filogenético (aunque ver Discusión).

Se definieron tres clados que invariablemente aparecen en todos los árboles igualmente parsimoniosos, en el árbol construido con el método de Máxima Verosimilitud (Figura 8) y en el construido mediante Análisis Bayesiano (Figura 9): el clado 1 (conformado por *O. nasutus_1*, *O. nasutus_2*, *O. nasutus_MVZ182701* y tres de los ejemplares uruguayos secuenciados), el clado 2 (conformado por *O. rufus* mas tres ejemplares uruguayos) y el clado 3 *O. delator-Juscelinomys*. El árbol de máxima verosimilitud por su parte obtuvo un valor de Logaritmo de verosimilitud de -1458,31, y la probabilidad posterior del árbol construido mediante el método de Análisis Bayesiano

obtuvo un valor de -1706,04. En todos los análisis se recupera a *Oxymycterus* como grupo parafilético, incluyendo en el mismo clado al género *Juscelinomys* (Bootstrap del análisis de parsimonia [BP]= 96; bootstrap del análisis de Máxima verosimilitud [BMV]=96 y probabilidad posterior [PP]=1). El soporte del clado 1 fue de BP= 79, BMV= 76 y PP=1. El soporte del clado 2 fue de BP= 88, BMV= 85 y PP=1. Para el clado 3, por último BP= 58, BMV= 50 y PP=0,95.

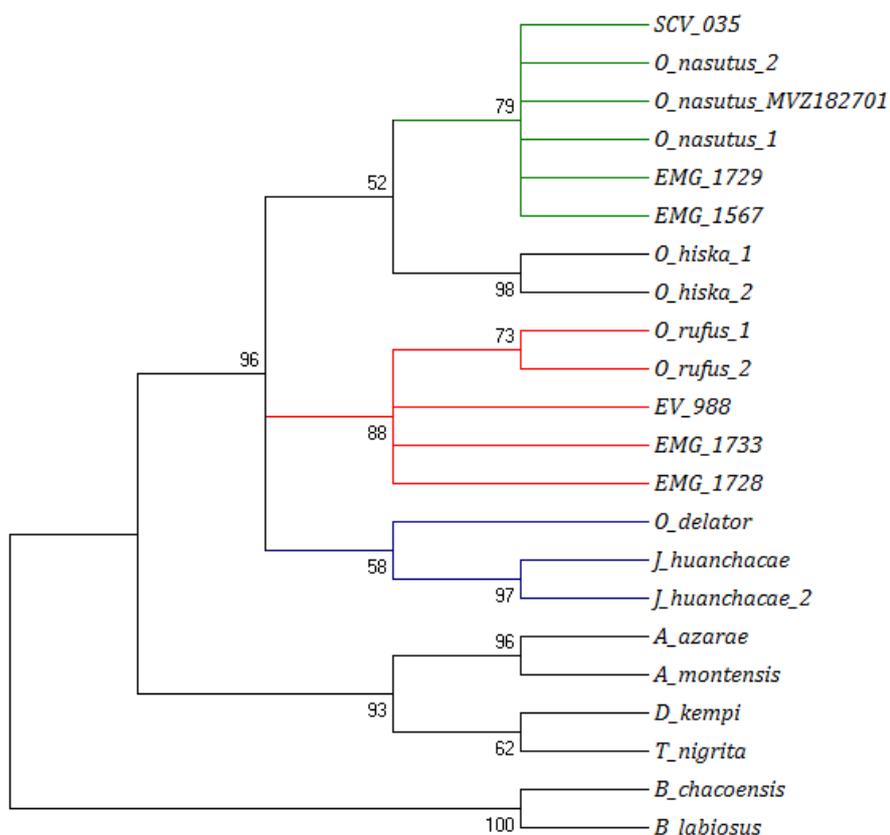


Figura 7. Consenso de los árboles obtenidos del análisis filogenético de máxima parsimonia del gen nuclear IRBP de las especies del género *Oxymycterus*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de bootstrap obtenido para cada nodo. En color verde se remarca el “clado 1”, en rojo el “clado 2” y en azul el “clado 3” (ver texto). Los ejemplares EMG 1733, EMG 1728, EV 988, EMG 1567, EMG 1729 y SCV 035 son ejemplares uruguayos secuenciados en el marco de este trabajo (ver Tabla 1 y Figura 5). Los primeros tres mencionados se encuentran más próximos filogenéticamente a ejemplares de *O. rufus* y alejados de los restantes, los cuales se asocian a ejemplares identificados como *O. nasutus*. EMG 1733, EMG 1728 y EMG 1729 fueron recolectados en el departamento de Rivera (Uruguay) y los restantes al sur del país (Tabla 1).

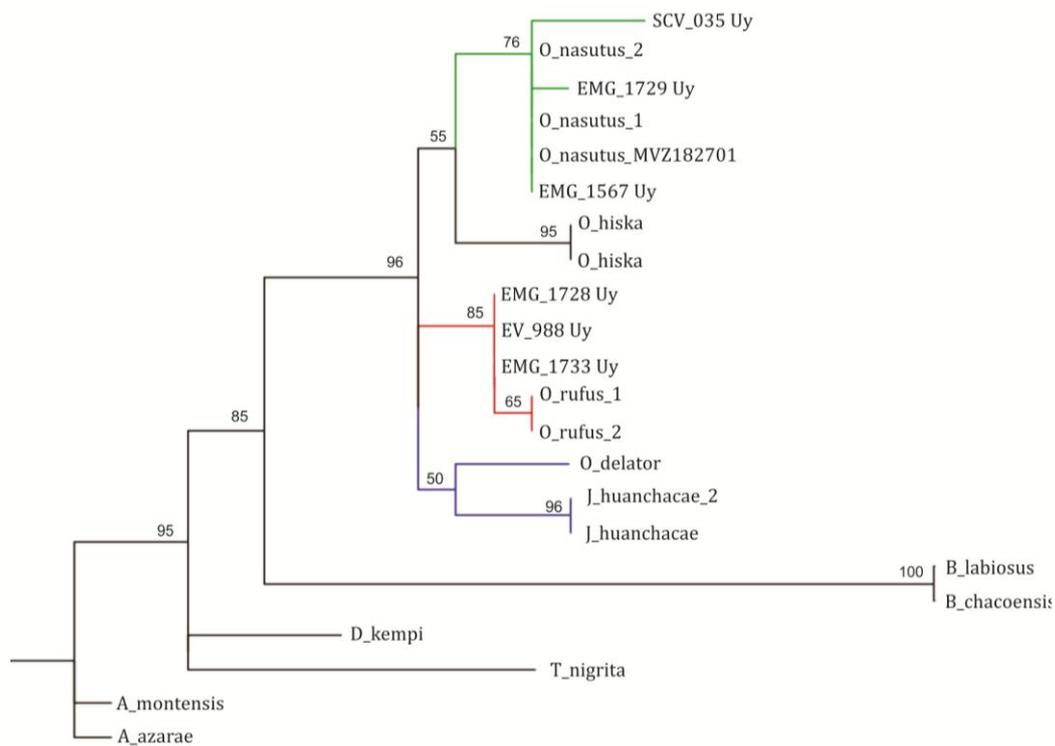


Figura 8. Árbol obtenido del análisis filogenético de máxima verosimilitud del gen nuclear IRBP de las especies del género *Oxymycterus*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de bootstrap obtenido para cada nodo. En color verde se remarca el “clado 1”, en rojo el “clado 2” y en azul el “clado 3” (ver texto). Los ejemplares EMG 1733, EMG 1728, EV 988, EMG 1567, EMG 1729 y SCV 035 son ejemplares uruguayos secuenciados en el marco de este trabajo (ver Tabla 1 y Figura 5). Los primeros tres mencionados se encuentran más próximos filogenéticamente a ejemplares de *O. rufus* y alejados de los restantes, los cuales se asocian a ejemplares identificados como *O. nasutus*. EMG 1733, EMG 1728 y EMG 1729 fueron recolectados en el departamento de Rivera (Uruguay) y los restantes al sur del país (Tabla 1).

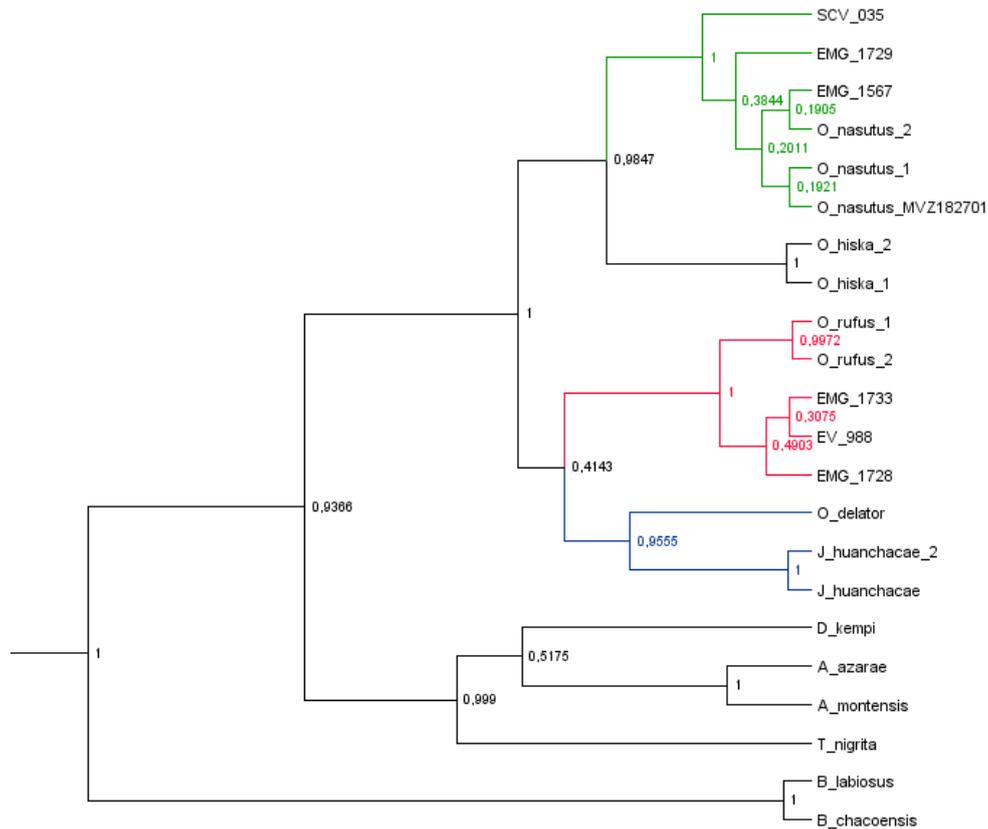


Figura 9. Árbol obtenido del análisis filogenético bayesiano del gen nuclear IRBP de las especies del género *Oxymycterus*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de probabilidad posterior obtenido para cada nodo. En color verde se remarca el “clado 1”, en rojo el “clado 2” y en azul el “clado 3” (ver texto). Los ejemplares EMG 1733, EMG 1728, EV 988, EMG 1567, EMG 1729 y SCV 035 son ejemplares uruguayos secuenciados en el marco de este trabajo (ver Tabla 1 y Figura 5). Los primeros tres mencionados se encuentran más próximos filogenéticamente a ejemplares de *O. rufus* y alejados de los restantes, los cuales se asocian a ejemplares identificados como *O. nasutus*. EMG 1733, EMG 1728 y EMG 1729 fueron recolectados en el departamento de Rivera (Uruguay) y los restantes al sur del país (Tabla 1).

Análisis filogenéticos: cit-b

El análisis mediante el método de parsimonia de los datos de citocromo-b, constituido por 65 secuencias de 801 pares de bases, arrojó como resultado dos árboles igualmente parsimoniosos de 962 pasos de largo, con un índice de consistencia de 0,40 y el índice de retención de 0,79 (Figura 10). En este caso, el género *Oxymycterus* se recupera como monofilético respecto al grupo externo con un soporte de Bootstrap de 92%, y *Juscelinomys* aparece como género hermano del primero en los dos árboles igualmente parsimoniosos, nodo que obtiene un soporte de 99%. De los clados definidos anteriormente con el gen IRBP, solo dos vuelven a recuperarse: el clado 1 formado por ejemplares de *O. nasutus* y ocho ejemplares secuenciados en este trabajo, y el clado 2, conformado por *O. rufus*, secuencias de *O. josei* obtenidas de Genbank y cinco ejemplares nuevos. Estos grupos obtienen soportes de bootstrap altos: 99% para el clado 1 y 100% para el clado 2.

Los nodos internos no fueron adecuadamente resueltos, lo que se traduce en una politomía que no permite determinar la mayoría de las relaciones dentro de las especies del género. Al contrario de los resultados obtenidos con IRBP, *O. hisca* no se recupera como especie hermana de *O. nasutus*. *O. delator* y *O. amazonicus* son recuperados como especies hermanas (BP=96), y *O. quaestor* como especie hermana del clado conformado por *O. misionalis* y *O. judex*, siendo *O. misionalis* parafilético. Contrariamente a lo que cabría esperar, los dos individuos de *O. paramensis* no forman un grupo monofilético, sino que aparecen independientemente formando parte de la politomía basal. Es de destacar, como se muestra en la Tabla B del Anexo 2 que entre estos dos individuos existe una distancia genética de 6% o 51 sustituciones, lo que explica tales resultados. Al revisar las secuencias utilizadas en este trabajo no se constató gran cantidad de datos perdidos. Estos resultados podrían deberse a un error de identificación de los ejemplares por el colector, o que la entidad *O. paramensis* requiere una revisión más exhaustiva (Oliveira & Gonçalves 2015). Un resultado similar ya había sido obtenido por Jayat *et al.* (2008) utilizando varios individuos de esta especie (4,4-6,5%) e incluso sugieren que podría tratarse de un complejo de especies. Los resultados obtenidos con Máxima Verosimilitud son similares a los obtenidos con el método anterior (Figura 11). *Oxymycterus* vuelve a recuperarse como monofilético, siendo *Juscelinomys* su género hermano. Los nodos internos dentro del género son resueltos pero con bajo soporte (debajo de 70%). Los clados 1 y 2 obtienen en este caso un soporte de 100%. *Oxymycterus misionalis* es recuperado nuevamente como parafilético, soportado por un valor de 78%. En este caso, los dos individuos de *O. paramensis* aparecen unidos en un nodo con bajo soporte (34%).

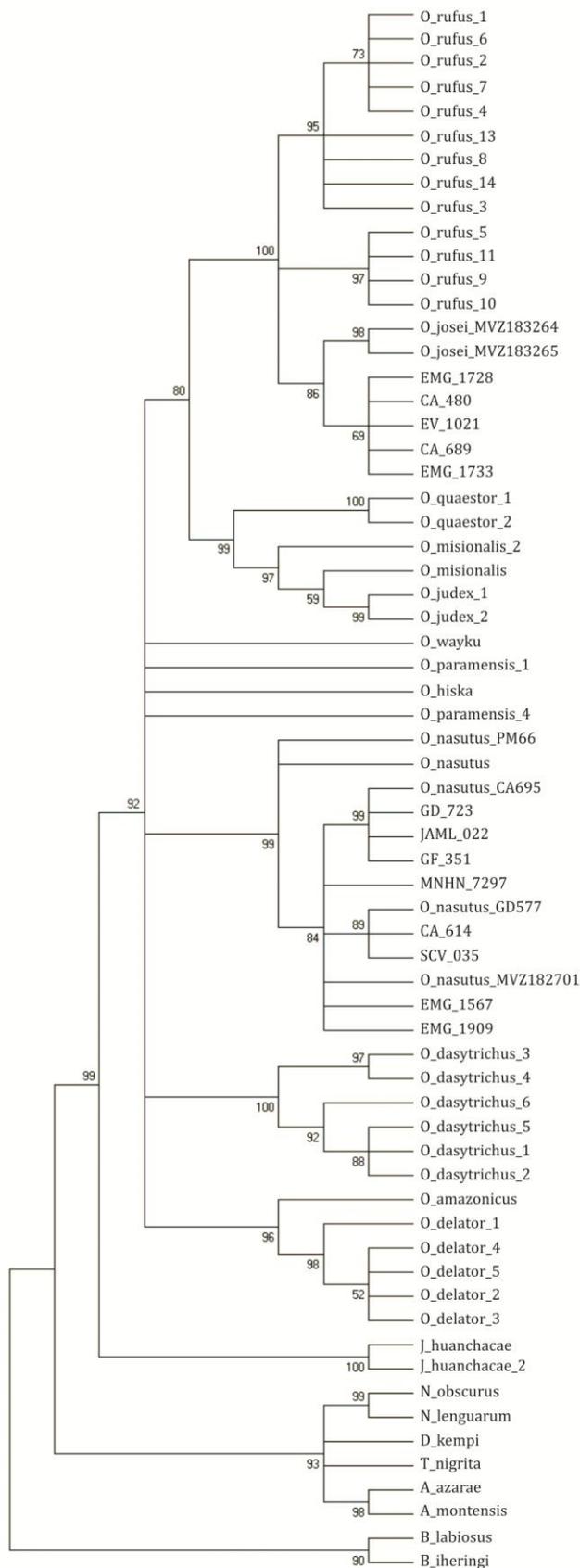


Figura 10. Consenso de árboles obtenidos del análisis filogenético de máxima parsimonia del gen mitocondrial citocromo-b de las especies del género *Oxymycterus*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de bootstrap obtenido para cada nodo. Los ejemplares secuenciados en este trabajo se representan acrónimo y número, sin asignar identidad específica. Las localidades de colecta se encuentran detalladas en la Tabla 1 y Anexo 1. Ver también Figura 5.

El Análisis Bayesiano (Figura 12), por su parte, arroja resultados levemente diferentes a los análisis anteriores. Al igual que el caso de IRBP, el análisis en discusión indica que *Oxymycterus* sería parafilético, nuevamente *Juscelinomys* y (*O. delator*; *O. amazonicus*) forman un clado, pero que recibe bajo soporte (0,50 de probabilidad posterior [PP]). Se recuperan los clados 1 y 2 con muy buen soporte (PP=1), a diferencia de algunos de los nodos internos del género. El clado *O. judex* - *O. misionalis* también obtiene un buen soporte, pudiéndose inferir la misma hipótesis que con los análisis anteriores.

Otro aspecto a considerar es el clado *O. rufus* - *O. josei*. El análisis de MP no logró resolver las relaciones entre estas especies (Figura 10), resultando en una politomía. En cambio, tanto MV (Figura 11) como AB (Figura 12) resuelven esta politomía mostrando que *O. rufus* y *O. josei* no son recíprocamente monofiléticos. En ambos casos (y también en MP), *O. josei* se recupera como monofilético con gran soporte: BMP=86; BMV=98; PP=1. En los análisis de MV y AB *O. rufus* es parafilético, constituido por dos clados: uno (A) formado por los ejemplares rufus5, rufus9, rufus10 y rufus11 y el otro (B) por los restantes. El clado A sería hermano de *O. josei*, como así lo afirman los análisis de MV y AP. De todos modos, el nodo que une *josei* con el clado A recibe bajo soporte en ambos casos: BMV=48 y PP=0,6. Respecto a la localidad de colecta de los ejemplares del clado A, tres de ellos (rufus5, rufus9 y rufus10) pertenecen a la localidad de Viçosa, en Minas Gerais, Brasil, mientras que rufus11 es de Ensenada, Buenos Aires, Argentina. Los pertenecientes al clado B pertenecen a Córdoba y Buenos Aires.

Actualización de la distribución geográfica del género en Uruguay

Para el año 2002, las localidades conocidas del género *Oxymycterus* en Uruguay estaban restringidas al sur y este del país (González 2001; Hoffmann *et al.* 2002). Durante los años subsiguientes, varios investigadores hallaron ejemplares del género fuera de estos límites y extendieron su área de distribución hacia el norte, centro y oeste del país (Figura 13, Apéndice 1. Dado que durante los años comprendidos entre dichas colectas y el trabajo de Hoffmann *et al.* (2002) no se realizaron análisis moleculares para confirmar la identidad de los ejemplares nuevos, se les asignó tentativamente una identidad específica en función de la cercanía geográfica a la distribución conocida de cada una de las especies (González & Martínez-Lanfranco 2010, Figura 13). En este sentido, los ejemplares colectados en Platón (Rivera), a unos 5-10 km de la frontera con Brasil, fueron asignados a

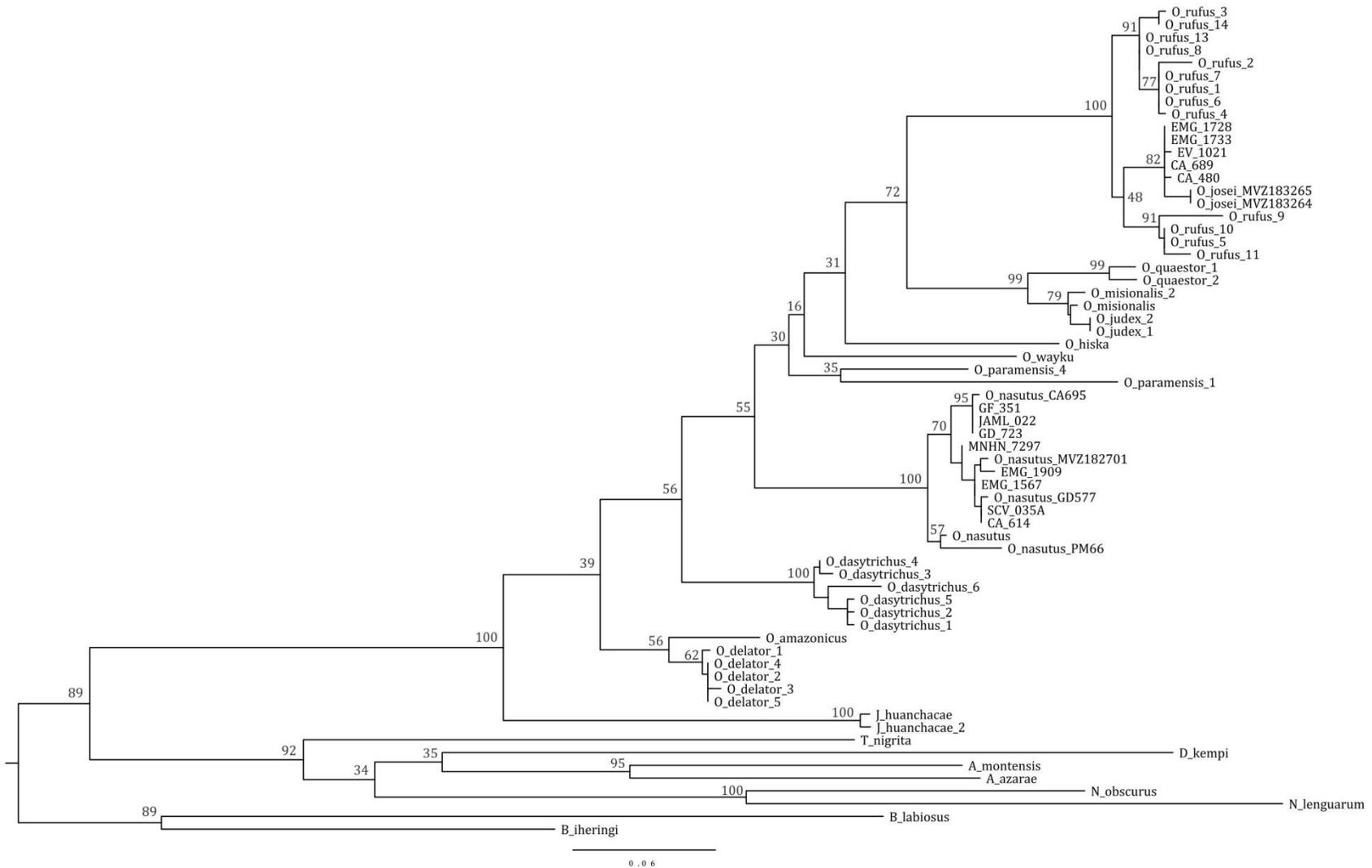


Figura 11. Consenso de árboles obtenidos del análisis filogenético de máxima verosimilitud del gen mitocondrial citocromo de las especies del género *Oxymycter*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de bootstrap obtenido para cada nodo. Los ejemplares secuenciados en este trabajo se representan acrónimo y número, sin asignar identidad específica. Las localidades de colecta se encuentran detalladas en la Tabla 1 y Anexo 1. Ver también Figura 5.

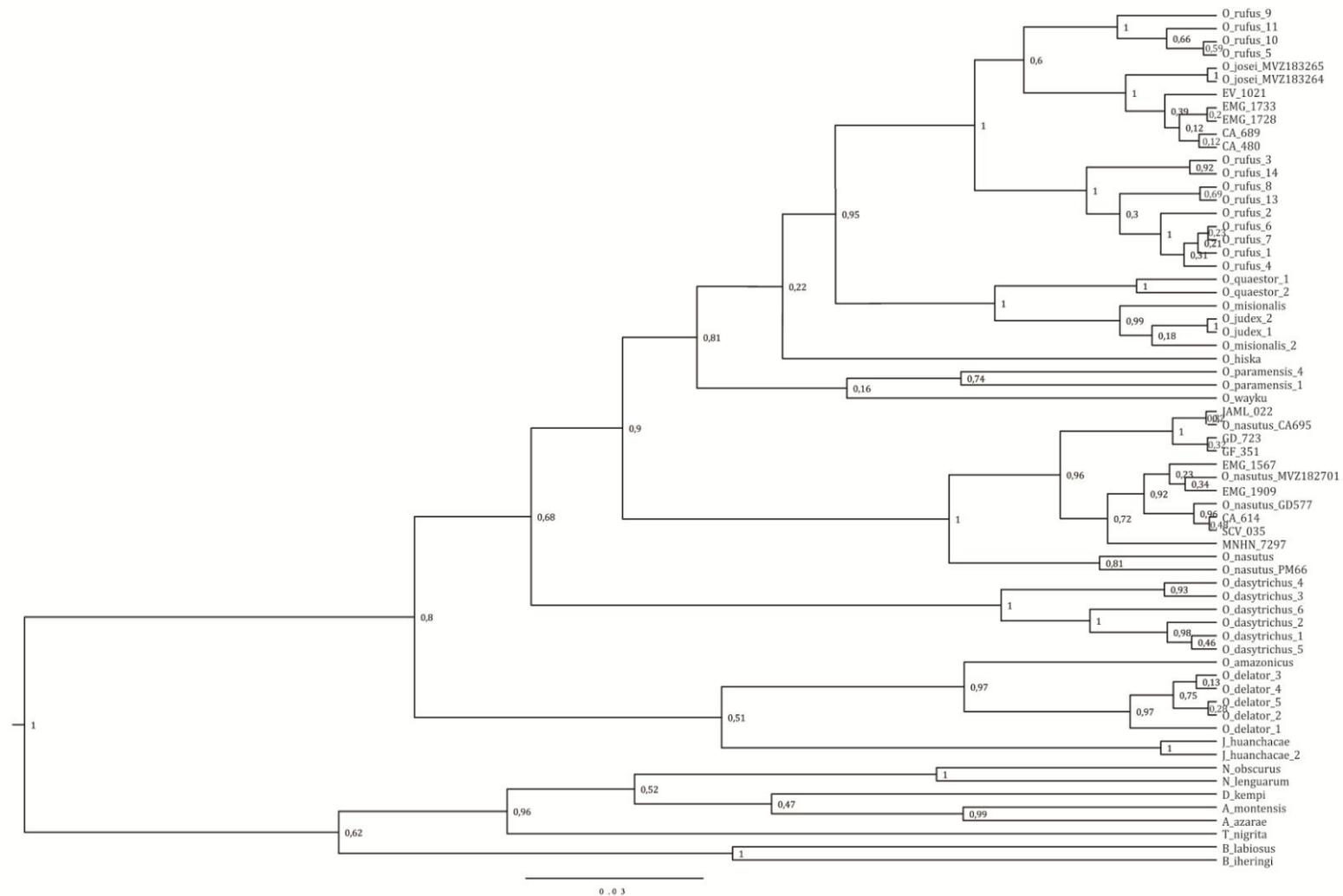


Figura 12. Consenso de árboles obtenidos del análisis filogenético bayesiano del gen mitocondrial citocromo de las especies del género *Oxymycterus*. Los valores adyacentes a los nodos corresponden con el valor de la probabilidad posterior obtenido para cada nodo. Los ejemplares secuenciados en este trabajo se representan acrónimo y número, sin asignar identidad específica. Las localidades de colecta se encuentran detalladas en la Tabla 1 y Anexo 1. Ver también Figura 5.

la especie *O. nasutus* dado que la distribución conocida de esta especie se encontraba más próxima. Del mismo modo, la distribución de *O. josei* fue extendida hacia el oeste cuando se hallaron ejemplares en el departamento de Soriano (González & Martínez-Lanfranco 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo modifican radicalmente la distribución de *O. josei* al encontrar un ejemplar, identificado mediante técnicas moleculares, localizado en la localidad de Platón (Rivera) (Figura 5). Esto implica una nueva localidad de simpatria entre las especies presentes en el país y una expansión de más de 300 km al norte del límite de distribución potencial anteriormente propuesto. El hallazgo de ejemplares en los departamentos de Paysandú, Tacuarembó y Artigas (Clara *com. pers.*), sumado a la presencia de restos óseos en egagrópilas de lechuga de campanario (*Tyto alba*) (González *et al.* 2011; Rodríguez-Cajarville & Bessonart 2011, Figura 6) a su vez, expande la distribución del género a todo el territorio nacional, aunque la identidad específica de estos ejemplares es aún desconocida.

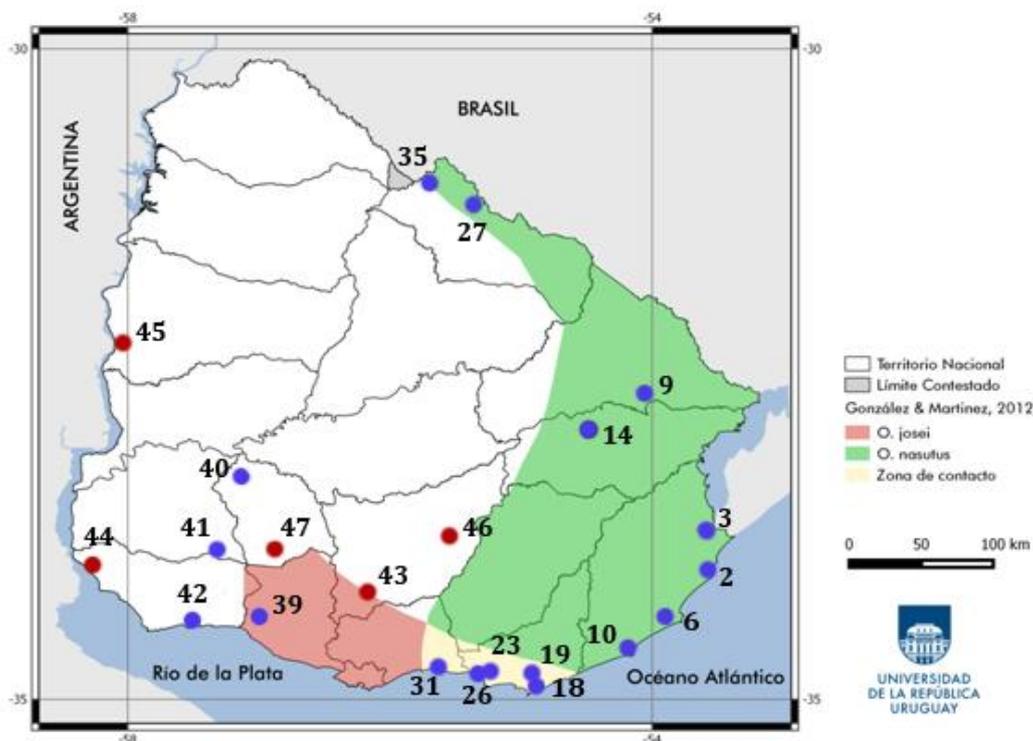


Figura 13. Distribución de *Oxymycterus josei* y *O. nasutus* en Uruguay según González & Martínez-Lanfranco 2010. Se representan las localidades en las que se han recolectado *Oxymycterus* posterior a 2002 y las secuenciadas en este trabajo en color azul, mientras que registros en egagrópilas se representan en rojo. Los números corresponden con los códigos de localidad del Anexo 1 y la Figura 6.

DISCUSIÓN

El género *Oxymycterus*, con 17 especies reconocidas en Sudamérica y dos presentes en Uruguay (sensu Carleton & Musser 2005, aunque ver también Oliveira & Gonçalves 2015), presenta una historia taxonómica compleja (ver revisiones en Oliveira 1998 para el género todo y Hoffmann *et al.* 2002 para las especies en Uruguay), como muchos otros géneros de Sigmodontinos. Varias especies han sido descritas recientemente (Hinojosa *et al.* 1987, Hershkovitz 1994, Hershkovitz 1998, Hoffmann *et al.* 2002 y Jayat *et al.* 2008) y ninguna revisión hasta el momento ha logrado elucidar los límites entre las especies ni atribuir sinónimos con un criterio objetivo. Destaca el complejo caso de *O. rufus*, que no presenta ejemplar tipo (el original que le llegó a Félix de Azara recolectado por Pedro Blas Noceda [Contreras & Teta 2003], enviado originalmente al Museo de Historia Natural de París se perdió [Gyldenstolpe 1932]) y que además se desconoce con certeza su localidad típica, lo cual ha generado cierto grado de cuestionamiento respecto a la validez de algunos taxa descritos posteriormente en la zona del Este de Paraguay y Entre Ríos (Contreras & Teta 2003). De las especies descritas en estos últimos años que denotan el desconocimiento sobre los límites entre las especies del género y destacan la necesidad de llevar a cabo revisiones exhaustivas, se encuentra *O. josei*, especie muy similar a *O. nasutus* y que, análisis moleculares presentados con anterioridad, y que también se recuperan en este trabajo, sugieren una mayor afinidad filogenética con *O. rufus*, a pesar de su aparente divergencia morfológica (Hoffmann *et al.* 2002). Tal disparidad morfológica llevó a que, en 2008, García-Olaso propusiera la hipótesis de hibridación seguida de introgresión mitocondrial, que habría involucrado a *O. nasutus*.

El presente trabajo representa una contribución más al conocimiento de las especies del género *Oxymycterus* que habitan en territorio uruguayo. Responde ciertas preguntas sobre la validez de *O. josei* como especie, y aporta nuevos datos de localidades para la misma, utilizando para tal fin una cobertura geográfica adecuada, y la adición de un nuevo gen a los análisis moleculares, que aporta información independiente de la historia evolutiva de las especies en estudio.

Sobre las especies del género *Oxymycterus* que se distribuyen en Uruguay

Los resultados confirman la presencia de dos especies de *Oxymycterus* en Uruguay. Las hipótesis filogenéticas planteadas en este trabajo coinciden con las planteadas en 2002 por Hoffmann y colaboradores (aunque ver más adelante), tanto al aumentar la representatividad geográfica y taxonómica para el gen mitocondrial citocromo-b, como al agregar al estudio el gen nuclear IRBP. Si bien la aproximación tradicional en la reconstrucción filogenética ha sido la de maximizar el número de taxa utilizando un gen (o dos), se ha probado que al aumentar el número de genes se obtiene un significativo efecto positivo en la precisión filogenética, en comparación con aumentar el número de taxa (Pluzhnikov & Donnelly 1996; Felsenstein 2006; Heled & Drummond 2010). Es sabido que la reconstrucción filogenética realizada en base a un único gen no necesariamente refleja el árbol de especies (Maddison 1997), y que el árbol génico responde a la historia de un único gen, la cual pudo haber sido influenciada por transferencia horizontal de genes vía hibridación, reparto incompleto de linajes, duplicación génica, etc. (Takahata 1989; Maddison 1997; Nichols 2001; Degnan & Rosenberg 2006). Estos problemas asociados al uso de un solo gen son resueltos mediante el uso de más genes. Los genes utilizados fueron suficientemente informativos como para lograr una buena resolución a nivel de estas dos especies, si bien el gen IRBP, dada la escasa representación taxonómica, no pudo utilizarse para responder algunas preguntas a nivel del género. En ambas matrices de datos independientes, los resultados muestran con un buen soporte, la existencia de dos clados recíprocamente monofiléticos: uno conformado por las secuencias de *O. nasutus* y algunos individuos uruguayos y el segundo conformado por *O. rufus-O. josei*, conformado por las secuencias utilizadas por Hoffmann *et al.* (2002) para describir a la especie y un porcentaje de las secuencias obtenidas en este trabajo. Por lo tanto, se descarta la hipótesis de hibridación entre *O. nasutus* y *O. rufus* en el pasado, seguida de introgresión mitocondrial, así como también se descarta que se trate de un caso de reparto incompleto de linajes.

Para la elección de los especímenes que se utilizarían en los análisis filogenéticos se procuró abarcar la mayor representatividad geográfica dentro del territorio uruguayo, y abarcar la diversidad cromática dentro de las poblaciones. Bajo este lineamiento se secuenciaron tres individuos de la localidad de Platón, Rivera, que originalmente se los asignó la identidad específica *O. nasutus* dada la cercanía geográfica de esta nueva localidad a las localidades conocidas de la especie (González & Martínez-Lanfranco 2010). De los tres ejemplares, el EMG 1733 y EMG 1728 fueron identificados como *O. josei* en base a los dos genes utilizados en este trabajo. Esto tiene implicancias tanto biogeográficas

como a efectos de su estado de conservación. Primero, el hallazgo de la especie en Rivera implica una expansión en su rango de distribución entre 300-400 km al norte, y lo ubica muy cerca de la frontera con Brasil (aproximadamente 5 km), límite que no posee barreras geográficas evidentes (no hay ríos o arroyos caudalosos, ni otros accidentes topográficos). Esta expansión en el rango de distribución implica el alejamiento de las zonas costeras, ambiente fuertemente amenazado en el país a causa de la urbanización (GEO 2008) y que tanto González *et al.* (2013) como Queirolo & Geise (2008) lo utilizan como criterio de amenaza. Tanto es así que es considerada una especie Prioritaria para la Conservación en Uruguay (González *et al.* 2013), catalogada como Amenazada en Uruguay por González & Martínez-Lanfranco (2010) y considerada En Peligro por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, Queirolo & Geise (2008)).

Por otra parte, el hallazgo de *O. josei* en una localidad tan próxima al límite con Brasil podría implicar que la especie no es endémica de Uruguay. Dado que pocos estudios existen sobre las especies de *Oxymycterus* del sur de Brasil y ninguno de ellos ha hecho énfasis en determinar la identidad genética de los ejemplares de esta especie (dado que no se han encontrado diferencias morfológicas externas entre estas dos especies) que se encuentran en las localidades limítrofes, no sería raro que se esté asumiendo una identidad específica (*O. nasutus* u otra especie) en base a cercanía geográfica de las localidades conocidas. No sería la primera vez que esto sucede (ver por ejemplo Francés & D'Elía 2006).

A la luz de estos hechos, es necesario revisar el estatus de conservación de *O. josei*, dado que su estatus de amenaza ha sido definido tradicionalmente en base a su afinidad con los amenazados ambientes costeros y su limitada distribución geográfica, supuestamente endémica de Uruguay. Por otra parte, se requiere revisar los ejemplares del género *Oxymycterus* recolectados en la zona sur de Brasil, a modo de corroborar su identidad específica y descartar identificaciones erróneas.

Sobre la sistemática de *Oxymycterus josei* y *Oxymycterus rufus*

Relacionado a esta última hipótesis, los resultados (aunque con poco soporte) sugieren que *O. josei* estaría más emparentado con un grupo de ejemplares de *O. rufus* de Minas Gerais, Brasil. La distribución de *O. rufus* cambió radicalmente después de la publicación de Gonçalves & Oliveira (2004), al corroborar la identidad específica de unos especímenes de *Oxymycterus* presentes en Viçosa, mediante análisis moleculares como

morfológicos, si bien en este último caso se observan diferencias respecto a los ejemplares argentinos. Respecto a esta última afirmación, los autores mencionados hacen alusión a las diferencias en la coloración de los ejemplares argentinos y los brasileros, siendo que estos últimos presentaban altos niveles de eritrismo, con pelos coloreados por una banda sub-apical naranja intensa y banda apical más oscura. Un patrón similar al mencionado se observa en uno de los ejemplares de Rivera (MNHN 6319), aunque en los restantes encontrados en dicha localidad, este patrón no se presenta.

La hipótesis filogeográfica planteada por Gonçalves & Oliveira (2004) se construye en base a un único gen (cit-b). Como se ha resaltado anteriormente, los resultados que arroja el uso de un único gen (o varios genes ligados) no deben ser tomados sin la debida precaución, a causa de la posible incongruencia entre los árboles de genes y el árbol de especies (Pamilo & Nei 1988; Avise 1989; Maddison 1997). Si bien en este trabajo se utilizó también el gen IRBP para probar la hipótesis de introgresión, no fue lo suficientemente variable como para responder preguntas a nivel de las relaciones entre *O. rufus* y *O. josei* ni posee la cobertura taxonómica y geográfica amplia lograda con cit-b. Por otro lado, no se dispone en las bases de datos de acceso libre de otro gen que pudiera ser utilizado en este trabajo y que tuviera la cobertura taxonómica y geográfica (de las especies de interés) similar a la de cit-b, para poder realizar las comparaciones pertinentes. Si bien la cobertura geográfica de las muestras es buena respecto al conocimiento actual de la distribución de *O. rufus* y *O. josei*, pero dado que es evidente que está lejos de ser la distribución real de las especies (al menos esto es probablemente cierto para *O. rufus* por la distancia comprendida entre los registros de Brasil y los de Argentina), la hipótesis filogenética obtenida debe ser interpretada con precaución. De todas maneras, es la mejor hipótesis filogenética con la que se cuenta hasta el momento y servirá como herramienta sobre la cual basar nuevas investigaciones. Igualmente, se recomienda complementar los análisis utilizando otros genes, nucleares y mitocondriales, a modo de testear la congruencia de dichos análisis con los resultados obtenidos en este trabajo. Por supuesto, conocer más acerca de la filogeografía y la variación entre las poblaciones de *O. rufus* y su distribución brindará claves esenciales para responder preguntas acerca del origen de *O. josei*.

Otro aspecto a considerar es que los análisis filogenéticos realizados no lograron resolver las relación entre *O. josei* y *O. rufus* (Figura 10, 11 y 12). Si bien *O. josei* se recupera como monofilético con gran soporte (ver Resultados), al contrario de lo esperado *O. rufus* es parafilético con respecto a *O. josei*, aunque el soporte para los nodos es bajo tanto en el análisis de MP, MV como AB, para el gen citocromo-b. Este resultado no había

sido obtenido anteriormente (Hoffmann *et al.* 2002; Gonçalves & Oliveira 2004; Jayat *et al.* 2008), probablemente a causa del uso de una cantidad reducida de ejemplares de estas dos especies. De todas formas, Hoffmann y colaboradores (2002) constatan que ambas especies son distinguibles a nivel morfométrico y morfológico, por lo que podría descartarse que se trate de una entidad única.

Sobre el género *Oxymycterus*

Respecto a la monofilia del género *Oxymycterus*, tanto algunos de los resultados obtenidos con el gen *cit-b* (análisis bayesiano) y con IRBP indican que *Oxymycterus* constituye un género parafilético respecto al género *Juscelinomys*. De todos modos, son resultados que deben tomarse con cautela, ya que, si bien el análisis de IRBP lo afirma con elevado soporte en todos los casos, la representatividad taxonómica es escasa. Por otra parte, solo el análisis bayesiano del gen *cit-b* lo incluye dentro del género *Oxymycterus*, pero con bajo soporte (PP=0,8).

Poco se sabe acerca de este elusivo género, descrito por primera vez en 1965 por Moojen, y al que históricamente se ha asociado con *Oxymycterus*. Conocido únicamente por nueve individuos de la serie tipo, dos recolectados en 1995 y 1997 y 18 recientemente recolectados (Emmons & Patton 2012), tres especies han sido descritas: *J. huanchacae* Emmons 1999, *J. guaporensis* Emmons 1999 y *J. candango* (Moojen 1965). La última se considera extinta, y la primera ha sido sinonimizada con la segunda, frente al hecho de que análisis posteriores no encontraron diferencias morfológicas (Emmons & Patton 2012). De estas especies, sólo de *J. huanchacae* existen secuencias disponibles. Los dos géneros comparten varios caracteres morfológicos en común, así como varias diferencias (recopiladas en Emmons 1999 y Emmons & Patton 2012, estos autores comparan todos los especímenes de *Juscelinomys* contra tres especies de *Oxymycterus*: *O. amazonicus* (2), *O. paramensis* (2) y *O. dasytrichus* (7)). En ese sentido, Emmons (1999) destaca que la fosa pterigoidea en *Juscelinomys* posee una morfología particular que la diferencia de la mayoría de las especies de *Oxymycterus*, salvo de *O. dasytrichus*. Estudios anteriores que soportan la hipótesis de que *Oxymycterus* y *Juscelinomys* constituyen géneros hermanos en general trabajan con una representatividad taxonómica menor que en este trabajo. Por ejemplo, Emmons (1999) presenta una hipótesis filogenética en la cual incluye secuencias de ocho especies de *Oxymycterus* y una de *Juscelinomys* (soporte bootstrap de 100); por su parte, Hoffmann *et al.* (2002) incluyen a *Juscelinomys* en el análisis de parsimonia junto con 10 especies de *Oxymycterus* y obtienen un soporte de bootstrap=100 para la hipótesis

de monofilia del género y *Juscelinomys* como género hermano; aún así, obtienen por MV un árbol que incluía *Juscelinomys* en *Oxymycterus*, pero las diferencias entre este árbol y el obtenido por parsimonia, que considera géneros hermanos, fueron no significativas. Posteriormente, D'Elia (2003) incluye 4 especies de *Oxymycterus* y nuevamente recupera la monofilia del género con buen soporte (jackknife=100%). En 2008, Jayat y colaboradores obtienen por MV el mismo resultado que se presenta en este trabajo, y utilizando la misma cantidad de especies, obtienen la misma topología observada en las Figuras 6, 7, 8 y 11, que incluye a *Juscelinomys* dentro de *Oxymycterus*.

Los resultados presentados en este trabajo, lejos de ser concluyentes, exhortan a mejorar la cobertura taxonómica de *Oxymycterus* y *Juscelinomys*, e incluir una mayor diversidad de genes a los análisis, a modo de esclarecer las relaciones filogenéticas de estos dos géneros.

Respecto a las relaciones dentro del género, los resultados coinciden con los publicados por Jayat *et al.* (2008). Estos autores, que utilizan un mayor número de individuos de la especie *O. paramensis*, la recuperan como monofilética en los análisis de MP, aunque como ya fue resaltado en Resultados, estos autores sugieren revisar el estatus taxonómico esta especie dado que podría tratarse de un complejo de especies biológicas.

Respecto a *O. misionalis-O. judex*, en el trabajo de Jayat y colaboradores resaltan la baja divergencia genética observada entre las dos especies (0,5%), utilizando únicamente un ejemplar de cada una, y resaltan la necesidad de profundizar estudios que esclarezcan los límites entre estas especies. En el presente trabajo se utilizaron dos secuencias de cada especie (sólo disponible cit-b) y los resultados confirman dicha inquietud. Todos los análisis: MP (Figura 10), MV (Figura 11) y AB (Figura 12) recuperan a *O. misionalis* como parafilético, incluyedo a *O. judex* (((*O.judex-O.judex*)*O.misionalis*)*O.misionalis*). Respecto a este resultado, Musser & Carleton (2005) y Oliveira & Gonçalves (2015) consideran a *O. misionalis* y *O. judex* como sinónimos junior de *O. quaestor*, alegando que, si bien Hoffmann *et al.* (2002) tratan a las tres como especies buenas, las tres coinciden sustancialmente en el espacio morfométrico y existe una alta tasa de clasificación errónea *a posteriori*, sumado a que *O. judex* y *O. quaestor* forman un clado en el cual los niveles de divergencia genética son comparables a los niveles de divergencia intraespecíficos presentes en otras especies como *O. dasytrichus*, *O. delator* y *O. rufus*. Este mismo resultado es obtenido en este trabajo: entre *O. misionalis* y *O. judex* existe una distancia genética de 0,5-0,8% (4-6 sustituciones). El clado (*O.quaestor(O.misionalis(O.judex-O.misionalis)*) es recuperado también en todos los análisis, con elevado soporte (BP=99; BMV=99;PP=1), existiendo

entre 2,3 y 2,6% de divergencia entre *O. quaestor* y las otras dos especies. Los resultados parecen indicar que los individuos identificados como *O. misionalis* y *O. judex* pertenecen a una misma especie biológica, definida en ese caso como *O. judex* por el Principio de Prioridad (*judex* Thomas, 1909; *misionalis* Sanborn, 1931). Sobre la sinonimia de estas entidades con *O. quaestor*, los datos disponibles no son suficientes para responder esa pregunta.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Desde la descripción de *Oxymycterus josei* en 2002 por Hoffmann y colaboradores, solo un autor (García-Olaso 2008) planteó la posibilidad de que, dada la extrema similitud morfológica existente entre esta especie y *O. nasutus*, con la cual comparte muchas localidades de simpatría, sean una única especie biológica. Los resultados arrojados por los análisis llevados a cabo en este trabajo, en el que se contrastan los resultados obtenidos considerando dos marcadores independientes, descartan dicha hipótesis con un elevado soporte.

La gran similitud morfológica existente entre *O. josei* y *O. nasutus* sigue generando incógnitas respecto a los procesos que dieron lugar a esta convergencia, siendo que los ambientes habitados por estas especies y *O. rufus* son muy similares y continuos geográficamente (pampas y campos). Nuevos estudios que abarquen aspectos ecológicos de estas especies posiblemente ayuden a dilucidar la historia evolutiva de las mismas. Por otro lado, sigue siendo necesarios estudios que no solo se enfoquen en caracteres moleculares, sino dirijan los objetivos a caracterizar de manera detallada, las diferencias morfológicas existentes entre las especies uruguayas, para detectar posibles diferencias que se hayan pasado por alto en estudios anteriores. Durante la realización de este trabajo, se constató la presencia de un carácter cromático diagnóstico y consistente, que podría utilizarse para diferenciar las especies que habitan en territorio uruguayo. Explorar la técnica de morfometría geométrica (Rohlf & Marcus 1993) (incluyendo a *O. rufus*) para detectar otros caracteres en estructuras óseas e incluso explorar caracteres en órganos diferentes a los previamente estudiados podrían arrojar pistas sobre la historia de las especies.

Por otra parte, se desprende de los resultados presentados que en ciertas zonas de Uruguay el muestreo de la diversidad alfa de roedores es insuficiente, y que el género, al contrario de lo que se conocía hasta el momento, podría habitar en todo el país. La identidad específica de los individuos de las localidades de Artigas, Paysandú y Tacuarembó deberá ser asignada, por ahora, mediante técnicas moleculares, para esclarecer los límites de la distribución geográfica de *O. josei* y *O. nasutus*. Brasil no parece estar exento del mismo problema, principalmente en el estado de Rio Grande do Sul,

donde podría habitar también *O. josei*, al cual se lo pudo haber confundido con *O. nasutus* dada la ya mencionada similitud morfológica.

Respecto a las relaciones de parentesco entre *O. rufus* y *O. josei*, podrían elucidarse aumentando la representatividad geográfica en ambas especies, a la luz de estos resultados, incluyendo ejemplares de Viçosa y de localidades cercanas.

Por último, sigue siendo necesaria una revisión taxonómica completa, que abarque tanto una revisión exhaustiva de la morfología como una mejor cobertura de marcadores moleculares y *taxa*, a modo de resolver la compleja sistemática del género *Oxymycterus*.

Finalizando, conviene resaltar la importancia de las colecciones biológicas en el mantenimiento de la información biológica necesaria para la realización de este tipo de estudios, que serían virtualmente imposibles de realizar de no haber sido los especímenes y sus tejidos, recabados y mantenidos durante años.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson E. 1949. *Introgressive hybridization*. Wiley, New York, U.S.A.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on*, 19(6): 716–723.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
- Amori G. & Gippoliti S. 2003. A higher-taxon approach to rodent conservation priorities for the 21st century. *Animal Biodiversity and Conservation*, 26(2): 1–18.
- Anderson E. 1949. *Introgressive hybridization*. John Wiley & Sons, New York. 109 pp.
- Arnold M.L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, Oxford. 215 pp.
- Arnold M.L. 2004. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. *Molecular Ecology*, 13: 997–1007.
- Avise J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6): 1192–1208.
- Avise J.C. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9(3): 686–690.
- Avise J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts. 684 pp.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial-DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Avise J.C. & Ball R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 45–67.
- Avise J.C., Giblin-Davidson C., Laerm J., Patton J.C. & Lansman R.A. 1979a. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 6694–6698.
- Avise J.C., Lansman R.A. & Shade R.O. 1979b. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, 92: 279–295.

- Azara F. de. 1801. *Essais sur l'Historie Naturelle des Quadrupèdes de la Province du Paraguay*. Tomo II. Imprièrre C. Pougens, Paris. 449 pp.
- Ballard J.W.O. & Whitlock M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria *Molecular Ecology*, 13: 729–744.
- Barbujani G.A., Pilastro A., Dedomenico S. & Renfrew C. 1994. Genetic variation in North Africa and Eurasia—Neolithic demic diffusion versus Palaeolithic colonization. *American Journal of Physical Anthropology*, 95: 137–154.
- Bernatchez L., Glémet H., Wilson C.C. & Danzmann R.G. 1995. Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 52: 179–185.
- Bossu C.M. & Near T.J. 2009. Gene Trees Reveal Repeated Instances of Mitochondrial DNA Introgression in Orange-throat Darters (Percidae: Etheostoma). *Systematic Biology*, 58(1): 114–129.
- Bradley R.D. & Baker R.J. 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82: 960–973.
- Brown W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. Pp. 95–130. *En: McIntyre R.J. (ed.). Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press, New York.
- Brown W.M. & Wright J.W. 1979. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). *Science*, 203: 1247–1249.
- Bonvicino C.R., Penna-Firme V. & Seuanez H.N. 1998. The karyotype of *Brucepattersonius griserufescens* Hershkovitz, 1998 (Rodentia, Sigmodontinae) with comments on distribution and taxonomy. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63: 329–335.
- Bonvicino C.R., Lemos B. & Weksler M. 2005. Small mammals of Chapada dos Veadeiros National Park (Cerrado of Central Brazil): ecologic, karyologic, and taxonomic considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 65(3): 395–406.
- Bonvicino C.R., Lindbergh S.M., Faria M.B. & Bezerra A.M.R. 2012. The Eastern Boundary of the Brazilian Cerrado: A Hotspot Region. *Zoological Studies*, 51(7): 1207–1218.
- Buckley T.R., Cordeiro M., Marshall D.C., & Simon C. 2006. Differentiating between hypotheses of lineage sorting and introgression in New Zealand alpine cicadas (Maoricicada Dugdale). *Systematic Biology*, 55(3): 411–425.
- Ceballos G. & Brown J.H. 1995. Global patterns of mammalian diversity, endemism and endangerment. *Conservation Biology*, 9: 559–568.
- Chan K.M.A. 2003. The effects of slightly leaky prezygotic isolating barriers and the use of phylogenetic tree shape to study diversification. Ph.D. dissertation Princeton University, Princeton, NJ.

- Chan K.M.A. & Levin S.A. 2005. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution*, 59: 720–729.
- Contreras J.R. & Teta P.V. 2003. Acerca del estatus taxonómico y de la localidad típica de *Oxymycterus rufus* (Fisher, 1814) (Rodentia:Muridae:Sigmodontinae). *Nótulas Faunísticas*, 14: 1–5.
- Cracraft J. 2002. The Seven Great Questions of Systematic Biology: An Essential Foundation for Conservation and the Sustainable Use of Biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 89(2): 127–144.
- D'Elfa 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'Elfa G. & Pardiñas U. 2004. Systematics of Argentinean, Paraguayan, and Uruguayan swamp rats of the genus *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy*, 85: 897–910.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- Degnan J.H. & Rosenberg N.A. 2006. Discordance of Species Trees with Their Most Likely Gene Trees. *PLoS Genetics*, 2(5): e68
- Drummond A.J. & Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 214.
- Edwards S.V. & Beerli P. 2000. Gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6): 1839–1854.
- Ellerman J.R. 1941. The families and genera of living rodents. Volume II: Family Muridae. British Museum of Natural History, London. 644 pp.
- Emmons L.H. 1999. Two New Species of *Juscelinomys* (Rodentia:Muridae) from Bolivia. *American Museum Novitates*, 3280: 1–15.
- Emmons L.H. & Patton J.L. 2012. Taxonomic revision of Bolivian *Juscelinomys* (Rodentia, Cricetidae) with notes on morphology and ecology. *Mammalia*, 76: 285–294.
- Farris J.S. 1982. Simplicity and informativeness in systematic and phylogeny. *Systematic Zoology*, 31: 413–444.
- Feijoo M., D'Elfa G., Pardiñas U.F.J. & Lessa E.P. 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. 2006. Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more *loci*? *Molecular Biology and Evolution*, 23(3): 691–700.
- Filatov D.A. 2009. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, 25: 3189–3190.
- Fisher G. 1814. *Zoognosia tabulis Synopsis Illustrata, in usum praelectionum Academia Imperialis Medico–Chirurgicae Mosquensis Edita*. Vol. 3. Moscú.
- Francés J. & D'Elía G. 2006. *Oligoryzomys delticola* es sinónimo de *O. nigripes* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Mastozoología Neotropical*, 13(1): 123–131.
- Funk D.J. & Omland K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 397–423.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S. & Hurst G.D.D. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18: 4541–4550.
- García-Olaso F. 2008. Evaluación de los caracteres diagnósticos de *Oxymycterus josei* Hoffmann, Lessa y Smith, 2002 (Rodentia: Cricetidae) con comentarios sobre la diferenciación de las especies uruguayas del género. *Mastozoología Neotropical*, 15(1): 117–123.
- G.E.O. Uruguay. 2008. Informe del estado del Ambiente. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)/Centro Latino Americano de Ecología Social (CLAES)/Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), Montevideo. 350 pp.
- Gissi C., Iannelli F. & Pesole G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101: 301–320.
- Gonçalves P.R. & de Oliveira J.A. 2004. Morphological and Genetic Variation between two sympatric forms of *Oxymycterus* (Rodentia: Sigmodontinae): an evaluation of hypotheses of differentiation within the Genus. *Journal of Mammalogy*, 85: 148–161.
- González E.M. 2001. Guía de campo de los mamíferos de Uruguay: introducción al estudio de los mamíferos. *Vida Silvestre*, Sociedad Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza, Montevideo. 339 pp.
- González E.M. & Martínez-Lanfranco J.A. 2010. Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Banda Oriental, Museo Nacional de Historia Natural, Vida Silvestre Uruguay, Montevideo. 779 pp.
- González E.M., Rodríguez-Cajarville M.J. & Bessonart J. 2011. Mamíferos en la dieta de aves rapaces en Uruguay. Pp. 43–44. En: Libro de Resúmenes de las XXIV Jornadas Argentinas de Mastozoología, La Plata, Buenos Aires.
- González E.M., Martínez-Lanfranco J.A., Juri E., Rodales A.L., Botto G. & Soutullo A. 2013. Mamíferos. Pp. 175–207. En: Soutullo A., Clavijo C. & Martínez-Lanfranco J.A. (eds.). *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay*. Vertebrados,

moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA Y DICYT/MEC, Montevideo.

- Guindon S., Delsuc F., Dufayard J.F. & Gascuel O. 2009. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. Pp. 113–137. *En*: Posada D. (ed.). *Bioinformatics for DNA sequence analysis*. Humana Press, New York.
- Gyldenstolpe N. 1932. A Manual of Neotropical Sigmodont Rodents. *Kungli Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 11(3): 1–164.
- Hailer F. 2015. Introgressive hybridization: brown bears as vectors for polar bear alleles. *Molecular Ecology*, 24: 1161–1163.
- Hare M.P. & Avise J.C. 1998. Population structure in the American oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 119–128.
- Heled J. & Drummond A.J. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3): 570–580.
- Hershkovitz P. 1994. The description of a new species of South American hocicudo, or long-nose mouse, Genus *Oxymycterus* (Sigmodontinae, Muroidea), with a critical review of the generic content. *Fieldiana: Zoology, New Series*, 79: 1–43.
- Hershkovitz P. 1998. Report on some sigmodontine rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. *Bonner Zoologische Beiträge*, 47: 193–256.
- Hinojosa F., Anderson S. & Patton J.M. 1987. Two new species of *Oxymycterus* (Rodentia) from Peru and Bolivia. *American Museum Novitates*, 2898: 1–17.
- Hoffmann F.G., Lessa E.P. & Smith M.F. 2002. Systematics of *Oxymycterus* with description of a new species from Uruguay. *Journal of Mammalogy*, 83: 408–420.
- Holder M.T., Anderson J.A. & Holloway A.K. 2001. Difficulties in detecting hybridization. *Systematics Biology*, 50: 978–982.
- Holland B.R., Benthin S., Lockhart P.J., Moulton V. & Huber K.T. 2008. Using supernetworks to distinguish hybridization from lineage-sorting. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 202–213.
- Horn S., Durka W., Wolf R., Ermala A., Stubbe A., Stubbe M. & Hofreiter M. 2011. Mitochondrial Genomes Reveal Slow Rates of Molecular Evolution and the Timing of Speciation in Beavers (*Castor*), One of the Largest Rodent Species. *PLoS ONE*, 6(1): e14622
- Huson D.H., Klöpper T., Lockhart P.J. & Steel M.A. 2005. Reconstruction of reticulate networks from gene trees. Pp. 233–249. *En*: Miyano S., Mesirov J., Kasif S., Istrail, S. Pevzner P.A. & Waterman M. (eds.) *Research in Computational Molecular Biology*. Springer Berlin Heidelberg.

- Irwin D.M., Kocher T.D. & Wilson A.C. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128–144.
- Jansa S.A. & Voss R.S. 2000. Phylogenetic Studies on Didelphid Marsupials I. Introduction and Preliminary Results from Nuclear IRBP Gene Sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, 7: 43–77.
- Jayat J.P., D'elía G., Pardiñas U.F.J., Miotti M.D. & Ortiz P.E. 2008. A new species of the genus *Oxymycterus* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from the vanishing Yungas of Argentina. *Zootaxa*, 1911: 31–51.
- Johns G.S. & Avise J.C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondria cytochrome *b* gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1481–1490.
- Kocher T.D., Thomas W.K. & Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X. & Wilson A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86: 6196–6200.
- Laakkonen H.M., Strelkov P., Lajus D.L. & Väinölä R. 2015. Introgressive hybridization between the Atlantic and Pacific herrings (*Clupea harengus* and *C. pallasii*) in the north of Europe. *Marine Biology*, 162(1): 39–54.
- Lamb T. & Avise J.C. 1986. Directional introgression of mitochondrial DNA in a hybrid population of tree frogs: The influence of mating behavior. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 83: 2526–2530.
- Linnen C.R., Farrell B.D. 2007. Mitonuclear discordance is caused by rampant mitochondrial introgression in *Neodiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) sawflies. *Evolution*, 61: 1417–1438.
- MacPhee, R.D.E. & Flemming, C. 1999. *Requiem Aeternam*. The last five hundred years of mammalian species extinctions. Pp. 333– 371. *En: MacPhee, R.D.E. (ed.). Extinctions in Near Time*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- McGuire J.A., Linkem C.W., Koo M.S., Hutchison D.W., Lappin A.K., Orange D.I., Lemos-Espinal J., Riddle B.R. & Jaeger J.R. 2007. Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of Crotaphytid lizards. *Evolution*, 61: 2879–289.
- Maddison W.P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46: 523–536.
- Masta S.E., Sullivan B., Lamb T. & Routman E.J. 2002. Phylogeography, species boundaries, and hybridization among toads of the *Bufo americanus* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 302–314.
- Melo-Ferreira J., Boursot P., Suchentrunk F., Ferrand N. & Alves P.C. 2005. Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, 14: 2459–2464.

- Miller S.A., Dikes D. & Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 12–15.
- Moojen J. 1965. Nôvo gênero de Cricetidae do Brasil Central (Glires, Mammalia). *Revista Brasileira de Biologia*, 25: 281–285.
- Moore W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial–gene trees versus nuclear–gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.
- Moses M.J. 1961. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). II: Description of stages. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10: 301–333.
- Musser G.G. & Carleton M.D. 1993. Family Muridae. Pp. 501–755, *En: D. E. Wilson D.E. & Reeder A.M.D. (eds). Mammal Species of the World. Second Edition. Smithsonian Institution Press, Washington & Londres.*
- Musser G.G. & Carleton M.D. 2005. Genus *Oxymycterus*. *En: Wilson D.E. & Reeder D.M. (eds.) Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. 3ra ed. John Hopkins University Press, Baltimore.*
- Near T.J. & Keck B.P. 2013. Free from mitochondrial DNA: Nuclear genes and the inference of species trees among closely related darter lineages (Teleostei: Percidae: Etheostomatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 868–876.
- Nichols R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 358–364.
- Nielsen R. & Wakeley J. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, 158(2): 885–896.
- Oliveira J.A. 1998. Morphometric assesment of species groups in the South American rodent genus *Oxymycterus* (Sigmodontinae), with taxonomic notes based on the analysis of type material. Tesis Doctoral no publicada, Texas Tech University. 320 pp.
- Oliveira J.A. & Gonçalves P.R. 2015. Genus *Oxymycterus* Waterhouse, 1837. Pp. 247–278. *En: Patton J.L., Pardiñas U.F.J. & D’elía G (eds.). Mammals of South America. Vol. 2, Rodents. The University of Chicago Press, Chicago.*
- Ostfield R.S. & Keesing F. 2000. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. *Conservation Biology*, 14: 722–728.
- Palumbi S.R., Cipriano F. & Hare M.P. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*, 55(5): 859–868.
- Pamilo P. & Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 568–583.
- Patton J.L. & Smith M.F. 1994. Paraphyly, polyphyly and the nature of species boundaries in Pocket Gophers (Genus *Thomomys*). *Systematic Biology*, 43 (1): 11–26.

- Patton J.L., Pardiñas U.F.J. & D'elía G. (eds.). 2015. Mammals of South America. Vol. 2, Rodents. The University of Chicago Press, Chicago. 1374 pp.
- Pluzhnikov A. & Donnelly P. 1996. Optimal sequencing strategies for surveying molecular genetic diversity. *Genetics*, 144(3): 1247–1262.
- Queirolo D. & Geise L. 2008. *Oxymycterus josei*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>.
- Rambaut A., Suchard M.A., Xie D. & Drummond A.J. 2014. Tracer v1.6. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rannala B. & Yang Z.H. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304–311.
- Rohlf F.J. & Marcus L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 129–132.
- Rodríguez-Cajarville M.J. & Bessonart J. 2011. Composición de la dieta de *Tyto alba* en tres localidades de Uruguay. Pp. 343–344. En: Libro de Resúmenes del IX Congreso de Ornitología Neotropical y III Congreso Peruano III Congreso Peruano de Ornitología. Cusco.
- Rokas A., Melika G., Abe Y., Nieves-Aldrey J.L., Cook J.M. & Stone G.N. 2003. Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 36–45.
- Ruedi M., Smith M.F. & Patton J.L. 1997. Phylogenetic evidence of mitochondrial DNA introgression among pocket gophers in New Mexico (family Geomyidae). *Molecular Ecology*, 6: 453–462.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. & Erlich H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Salazar-Bravo J., Pardiñas U.F.J. & D'Elía G. 2013. A phylogenetic appraisal of Sigmodontinae (Rodentia, Cricetidae) with emphasis on phyllotine genera: systematic and biogeography. *Zoologica Scripta*, 42: 250–261.
- Sang T. & Zhong Y. 2000. Testing hybridization hypotheses based on incongruent gene trees. *Systematic Biology*, 49(3): 422–434.
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 6(2): 461–464.
- Shaw K.L. 2002. Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 16122–16127.

- Shapiro L.H., Canterbury R.A., Stover D.M. & Fleischer R.C. 2004. Reciprocal introgression between golden-winged warblers (*Vermivora chrysoptera*) and blue-winged warblers (*V. pinus*) in eastern North America. *The Auk*, 121: 1019–1030.
- Smith M.F. & Patton J.L. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome *b* sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*, 8: 85–103.
- Smith M.F. & Patton J.L. 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 149–177.
- Soutullo A., Alonso E., Arrieta D., Beyhaut R., Carreira S., Clavijo C., Cravino J., Delfino L., Fabiano G., Fagundez C., Haretche F., Marchesi E., Passadore C., Rivas M., Scarabino F., Sosa B. & Vidal N. 2009. Especies prioritarias para la conservación en Uruguay 2009. Proyecto fortalecimiento del proceso de implementación del sistema nacional de áreas protegidas. DINAMA/MVOTMA-PNUD/GEF. Serie de informes N° 16. Montevideo. 95 pp.
- Stace C.A. 1987. Hybridization and the plant species. Pp. 115– 127. *En*: Urbanska K.M. (Ed.) *Differentiation patterns in higher plants*. Academic Press, London.
- Stebbins G.L. 1959. The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 103: 231–251.
- Suarez O.V. 1994. Diet and habitat selection of *Oxymycterus rutilans* (Rodentia, Cricetidae). *Mammalia*, 58 (2): 225–234.
- Sullivan J.P., Lavoué S., Arnegard M.E. & Hopkins C.D. 2004. AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of african electric fish (Mormyroidea: Teleostei). *Evolution*, 58(4): 825–841.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C. & Schatten G. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402: 371–372.
- Svartman M. & Cardoso de Almeida E.J. 1993. The karyotype of *Oxymycterus sp* (Cricetidae, Rodentia) from Central Brazil. *Experientia*, 49(8): 718–720.
- Takahata N. 1989. Gene genealogy in three related populations: Consistency probability between gene and population trees. *Genetics*, 122: 957–966.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437–460.
- Talamoni S., Couto D., Cordeiro D.A. Jr. & Diniz F.M. 2008. Diet of some species of Neotropical small mammals. *Mammalian biology*, 73: 337–341.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S.. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.

- Tate G.H.H. 1932. The South American Cricetidae described by Felix Azara. American Museum Novitates, **557**: 1–5.
- Tenaillon M.I., Hollister J.D. & Gaut B.S. 2010. A triptych of the evolution of plant transposable elements. Trends in plant science, **15**(8): 471–478.
- Thomas O. 1909. XXVIII. Notes on some South–American mammals, with descriptions of new species. Journal of Natural History, **4**(21): 230–242.
- Tullberg, T. 1899. Ueber das System der Nagethiere: eine phylogenetische Studie. Akademische Buchdruckerei.
- Ursprung H. & Schabtach E. 1965. Fertilization in tunicates: loss of the paternal mitochondrion prior to sperm entry. Journal of Experimental Zoology, **159**: 379–383.
- Vaz Ferreira R. 1960. Nota sobre Cricetinae del Uruguay. Archivos de la Sociedad Biológica, **24**: 66–75.
- Vitullo A.D., Merani M.S., Reig O.A., Kajon A.E., Scaglia O., Espinosa M.B. & Perez–Zapata A. 1986. Cytogenetics of South American Akodont Rodents (Cricetidae): new karyotypes and Chromosomal Banding Patterns of Argentinian and Uruguayan forms. Journal of Mammalogy, **67**(1): 69–80.
- Wahlberg N., Weingartner E., Warren A.D. & Nylin S. 2009. Timing major conflict between mitochondrial and nuclear genes in species relationships of *Polygonia* butterflies (Nymphalidae: Nymphalini). BMC Evolutionary Biology, **9**: 92–108.
- Waterhouse G.R. 1837. Characters of a new species of the genus *Mus* from the collection of Mr. Darwin. Proceedings of the Zoological Society, 1837: 15–22, 27–29.
- Welch J.J., Bininda–Emonds O.R. & Bromham L. 2008. Correlates of substitution rate variation in mammalian protein–coding sequences. BMC evolutionary biology, **8**(1): 53.
- Xu J. 2005. The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. Genome, **48**: 951–958.
- Yonenaga Y. 1975. Karyotypes and chromosome polymorphism in Brazilian rodents. Caryologia, **28**: 269–286.

Anexo 1. Lista de localidades donde han sido colectados ejemplares de *Oxymycterus* en Uruguay. El código de localidad corresponde con el de la Figura 6.

Latitud	Longitud	Localidad	Código
-33,89493	-53,51556	La Coronilla	1
-34,00662	-53,53879	Parque Santa Teresa	2
-33,70453	-53,55539	Parque Nacional San Miguel	3
-33,90845	-53,72609	Bocas del Sarandi	4
-34,27371	-53,78183	Aguas Dulces	5
-34,36243	-53,8697	Refugio de Fauna Laguna de Castillos	6
-34,25304	-53,96206	Sarandidel Concejo	7
-33,79377	-54,01662	Ruta 14, 22 km al W de Lascano	8
-32,63062	-54,02551	Rio Tacuari	9
-34,59247	-54,1253	La Pedrera	10
-34,58636	-54,17892	Ruta 15 km 10 Arroyo la Paloma	11
-34,5485	-54,25204	Laguna de Rocha. Desembocadura del Arroyo Las Conchas	12
-33,13551	-54,38879	Arroyo Las Piedras	13
-32,91885	-54,45823	Quebrada de los Cuervos	14
-34,84163	-54,6371	Jose Ignacio	15
-34,36177	-54,63776	Sierra de los Coronillas	16
-34,8139	-54,67144	5 Km NNW Faro Jose Ignacio	17
-34,91167	-54,86428	Arroyo Maldonado	18
-34,81575	-54,91717	Arroyo San Carlos	19
-34,84283	-54,94136	El Penasco	20
-34,78009	-55,20089	Arroyo El Renegado	21
-34,8903	-55,22104	Punta Negra	22
-34,80682	-55,25779	Cerro Pan de Azucar	23
-34,8645	-55,26892	Piriapolis	24
-34,75623	-55,30086	Sierra de Animas	25
-34,81307	-55,3173	Las Flores. Arroyo Tarariras	26
-31,16667	-55,35	COFUSA	27
-34,80376	-55,35857	Balneario Bella Vista	28
-34,77842	-55,38676	Balnearios Solis. Ruta Int. Km 82.5	29
-34,78902	-55,46533	Balneario Santa Ana	30
-34,77003	-55,57707	San Luis	31
-34,76876	-55,60077	Barra del Arroyo del Bagre del Plata	32
-34,7562	-55,66619	Costa Azul. Arroyo Sarandi	33
-34,66658	-55,6762	Arroyo Mosquitos	34
-31,00002	-55,68333	Platon	35
-34,77986	-55,86932	Arroyo Tropa Vieja	36
-34,80086	-55,94984	Carretera Interbalnearia en el km 27.5	37
-34,55573	-56,99555	Puerto Arazati. Arroyo Pereira	38
-34,33384	-56,99987	Ecilda Paulier	39
-33,28035	-57,14401	Grutas del Palacio	40
-33,87237	-57,32292	Cardona	41
-34,40272	-57,51545	Estancia Tape. entre Juan Lacaze y Astillero	42
-34,288314	-55,269001	Parque Arequita	43
-33,97777	-58,284604	Carmelo	44
-32,249456	-58,059342	Arroyo San Francisco	45
-33,739953	-55,530056	Arteaga	46
-33,849994	-56,883322	Costas de San Jose	47

Anexo 2. Tabla A. Tabla de distancias Kimura 2 parámetros (diagonal inferior) y número de diferencias nucleotídicas (diagonal superior) para el gen IRBP.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	EMG_1567		4	1	4	3	4	3	5	5	0	0	0	5	5	6	6	17	11	12	11	19	19
2	EMG_1728	0,006		5	0	7	0	5	5	5	4	4	4	1	1	6	6	17	11	12	11	19	19
3	EMG_1729	0,001	0,007		5	4	5	4	6	6	1	1	1	6	6	7	7	18	12	13	12	20	20
4	EMG_1733	0,006	0,000	0,007		7	0	5	5	5	4	4	4	1	1	6	6	17	11	12	11	19	19
5	SCV_035	0,004	0,010	0,006	0,010		7	6	8	8	3	3	3	8	8	8	8	20	14	15	14	22	22
6	EV_988	0,006	0,000	0,007	0,000	0,010		5	5	5	4	4	4	1	1	6	6	17	11	12	11	19	19
7	O_delator	0,004	0,007	0,006	0,007	0,009	0,007		6	6	3	3	3	6	6	5	5	18	12	13	12	20	20
8	O_hiska_1	0,007	0,007	0,009	0,007	0,012	0,007	0,009		0	5	5	5	6	6	7	7	18	12	13	12	20	20
9	O_hiska_2	0,007	0,007	0,009	0,007	0,012	0,007	0,009	0,000		5	5	5	6	6	7	7	18	12	13	12	20	20
10	O_nasutus_1	0,000	0,006	0,001	0,006	0,004	0,006	0,004	0,007	0,007		0	0	5	5	6	6	17	11	12	11	19	19
11	O_nasutus_2	0,000	0,006	0,001	0,006	0,004	0,006	0,004	0,007	0,007	0,000		0	5	5	6	6	17	11	12	11	19	19
12	O_nasutus_MVZ182701	0,000	0,006	0,001	0,006	0,004	0,006	0,004	0,007	0,007	0,000	0,000		5	5	6	6	17	11	12	11	19	19
13	O_rufus_1	0,007	0,001	0,009	0,001	0,012	0,001	0,009	0,009	0,009	0,007	0,007	0,007		0	7	7	18	12	13	12	20	20
14	O_rufus_2	0,007	0,001	0,009	0,001	0,012	0,001	0,009	0,009	0,009	0,007	0,007	0,007	0,000		7	7	18	12	13	12	20	20
15	J_huanchacae	0,009	0,009	0,010	0,009	0,012	0,009	0,007	0,010	0,010	0,009	0,009	0,009	0,010	0,010		0	19	13	14	13	21	21
16	J_huanchacae_2	0,009	0,009	0,010	0,009	0,012	0,009	0,007	0,010	0,010	0,009	0,009	0,009	0,010	0,010	0,000		19	13	14	13	21	21
17	T_nigrita	0,025	0,025	0,026	0,025	0,029	0,025	0,026	0,026	0,026	0,025	0,025	0,025	0,026	0,026	0,028	0,028		12	13	12	24	24
18	A_montensis	0,016	0,016	0,017	0,016	0,020	0,016	0,017	0,017	0,017	0,016	0,016	0,016	0,017	0,017	0,019	0,019	0,017		1	6	18	18
19	A_azarae	0,017	0,017	0,019	0,017	0,022	0,017	0,019	0,019	0,019	0,017	0,017	0,017	0,019	0,019	0,020	0,020	0,019	0,001		7	19	19
20	D_kempi	0,016	0,016	0,017	0,016	0,020	0,016	0,017	0,017	0,017	0,016	0,016	0,016	0,017	0,017	0,019	0,019	0,017	0,009	0,010		17	17
21	B_chacoensis	0,028	0,028	0,029	0,028	0,032	0,028	0,029	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028	0,029	0,029	0,031	0,031	0,035	0,026	0,028	0,025		0
22	B_labiosus	0,028	0,028	0,029	0,028	0,032	0,028	0,029	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028	0,029	0,029	0,031	0,031	0,035	0,026	0,028	0,025	0,000	

En negrita se remarcan datos relevantes mencionados en el texto.

El sombreado gris incluye al grupo externo.

Los nombres de los ejemplares coinciden con los utilizados en los árboles filogenéticos

Anexo 2, Tabla B. Tabla de distancias Kimura 2 parámetros (diagonal inferior) y número de diferencias nucleotídicas (diagonal superior) para el gen citocromo b.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55			
1 O_rufus_1	0	2	0	52	52	47	57	42	49	61	49	48	11	12	57	56	58	52	52	51	57	44	44	0	0	2	46	49	11	14	12	14	46	44	2	2	56	41	45	56	46	47	49	46	48	47	49	12	48	11	12	49	11	11				
2 O_rufus_2	0.000	2	0	52	52	47	57	42	49	61	49	48	11	12	57	56	58	52	52	51	57	44	44	0	0	2	46	49	11	14	12	14	46	44	2	2	56	41	45	56	46	47	49	46	48	47	49	12	48	11	12	49	11	11				
3 O_rufus_3	0.003	0.003	2	50	50	45	55	40	47	59	49	46	9	10	55	54	56	50	50	49	55	42	42	2	2	0	44	47	9	12	10	12	44	42	0	0	54	39	43	54	44	45	47	46	45	47	10	46	9	10	47	9	9					
4 O_rufus_4	0.000	0.000	0.003	2	50	50	45	55	40	47	59	49	46	9	10	55	54	56	50	50	49	55	42	42	0	0	2	46	49	11	14	12	14	46	44	2	2	56	41	45	56	46	47	49	46	48	47	49	12	48	11	12	49	11	11			
5 O_dasytrichus_1	0.070	0.070	0.075	0.078	2	45	38	41	44	56	41	44	48	52	40	37	37	8	6	1	11	42	42	52	52	50	41	44	48	54	52	54	46	44	50	50	37	41	42	37	49	42	44	43	42	44	49	43	50	49	44	50	50					
6 O_dasytrichus_2	0.078	0.078	0.075	0.078	0.003	45	38	41	44	56	41	44	48	52	40	37	37	8	6	1	11	43	43	52	52	50	41	44	48	54	52	54	46	44	50	50	37	41	42	37	49	42	44	43	42	44	49	43	50	49	44	50	50					
7 O_nassutus_PM_66	0.071	0.071	0.067	0.071	0.067	0.067	44	40	13	51	42	44	45	46	48	43	45	43	41	4	9	43	42	42	47	45	12	13	45	48	46	48	47	45	45	45	43	37	7	43	45	41	13	10	12	12	13	46	12	45	44	13	45	45				
8 O_deltator_1	0.087	0.087	0.083	0.087	0.056	0.056	0.066	46	43	49	36	46	53	55	16	1	3	36	34	37	39	46	46	57	57	55	42	47	53	57	55	57	50	48	55	55	1	46	41	1	51	43	47	44	42	47	54	42	55	54	47	55	55					
9 O_misionalis	0.063	0.063	0.059	0.063	0.061	0.061	0.059	0.069	43	53	42	48	38	42	48	45	45	41	39	40	42	4	4	42	42	40	40	43	38	44	42	44	18	16	40	40	45	4	37	45	41	41	43	40	42	41	43	41	42	40	39	43	40	40				
10 O_nassutus_GD_577	0.074	0.074	0.071	0.074	0.066	0.066	0.019	0.064	45	36	42	46	47	45	42	44	42	40	43	45	45	45	49	49	47	3	6	46	49	47	49	48	46	47	47	42	40	8	42	43	2	6	3	1	3	6	47	1	46	45	6	46	46					
11 O_paramensis_1	0.093	0.093	0.090	0.093	0.085	0.085	0.077	0.074	0.080	0.067	41	48	57	61	53	48	50	56	54	55	53	55	61	61	59	45	48	57	63	61	63	59	59	59	48	53	46	48	45	46	48	47	46	46	48	60	46	59	58	48	59	59						
12 O_paramensis_4	0.074	0.074	0.074	0.074	0.061	0.061	0.063	0.053	0.062	0.053	0.061	41	45	51	43	35	35	39	37	40	40	42	42	42	42	49	49	36	39	40	40	42	42	45	53	51	53	48	46	49	49	35	42	37	35	44	37	39	38	37	39	48	37	47	46	39	47	47
13 O_wayku	0.072	0.072	0.069	0.072	0.065	0.065	0.066	0.069	0.072	0.062	0.072	0.061	46	51	50	45	47	42	40	43	45	50	50	48	48	46	39	44	46	52	51	53	54	52	46	46	45	48	40	45	43	40	44	41	41	40	44	49	41	48	47	44	48	48				
14 O_josef_MVZ_183264	0.16	0.16	0.13	0.16	0.12	0.12	0.067	0.080	0.056	0.069	0.087	0.067	0.069	11	53	52	54	48	48	47	53	40	40	11	11	9	43	46	0	13	11	13	44	42	4	9	52	37	42	52	45	44	44	43	45	44	46	3	45	2	3	46	2	4	2	48	2	
15 O_rufus_5	0.017	0.017	0.014	0.017	0.078	0.078	0.069	0.083	0.063	0.071	0.093	0.077	0.016	55	54	54	52	52	51	57	44	44	12	12	10	44	47	11	4	0	2	46	44	10	10	54	41	43	54	46	45	47	44	46	45	47	8	46	9	10	47	9	9					
16 O_aminazicus	0.087	0.087	0.083	0.087	0.059	0.072	0.023	0.072	0.067	0.080	0.064	0.075	0.080	0.083	15	17	38	36	39	39	48	48	57	57	55	44	49	53	57	55	57	52	50	55	55	15	50	43	15	55	45	49	46	44	45	49	54	44	55	54	49	55	55					
17 O_deltator_2	0.085	0.085	0.082	0.085	0.054	0.055	0.064	0.001	0.067	0.063	0.072	0.052	0.067	0.078	0.082	0.022	2	35	33	36	38	45	45	56	56	54	41	46	52	56	54	56	47	54	0	45	40	0	50	42	46	43	41	42	46	53	41	54	53	46	54	54						
18 O_deltator_3	0.088	0.088	0.085	0.088	0.054	0.055	0.067	0.004	0.067	0.066	0.075	0.052	0.070	0.082	0.082	0.025	0.003	35	33	36	38	45	45	58	58	56	43	48	54	56	54	56	51	49	56	56	2	45	42	2	50	44	48	45	43	44	48	55	43	56	55	48	56	56				
19 O_dasytrichus_3	0.078	0.078	0.075	0.078	0.011	0.011	0.064	0.053	0.061	0.063	0.085	0.056	0.062	0.072	0.078	0.056	0.051	0.051	2	7	11	43	43	52	52	50	39	42	48	54	52	54	46	44	50	35	41	40	35	49	40	42	41	41	40	42	49	41	50	49	49	42	50	48				
20 O_dasytrichus_4	0.078	0.078	0.075	0.078	0.009	0.009	0.061	0.050	0.058	0.059	0.082	0.055	0.059	0.072	0.078	0.053	0.048	0.048	0.003	5	9	41	41	52	52	50	37	40	48	54	52	54	44	42	50	33	39	38	33	47	38	40	39	39	38	40	49	39	50	49	40	50	50					
21 O_dasytrichus_5	0.077	0.077	0.073	0.077	0.001	0.001	0.066	0.055	0.059	0.064	0.083	0.059	0.064	0.070	0.077	0.058	0.053	0.053	0.010	0.007	10	42	42	51	51	49	40	43	47	53	51	53	45	43	49	36	40	41	36	48	41	43	42	42	41	43	48	42	49	48	43	49	49					
22 O_dasytrichus_6	0.086	0.086	0.083	0.086	0.016	0.013	0.072	0.058	0.062	0.067	0.080	0.059	0.067	0.080	0.086	0.058	0.056	0.016	0.013	0.014	44	44	57	57	55	44	47	53	59	57	59	47	45	55	55	38	42	45	38	52	45	47	46	46	45	47	54	46	55	54	47	55	55					
23 O_index_2	0.066	0.066	0.063	0.066	0.062	0.064	0.069	0.069	0.066	0.067	0.084	0.062	0.075	0.059	0.066	0.072	0.067	0.064	0.061	0.062	0.065	0	44	44	42	42	45	40	46	44	46	44	46	18	16	42	42	45	6	39	45	43	43	45	42	44	43	45	43	44	42	41	45	42	42			
24 O_index_2	0.066	0.066	0.063	0.066	0.062	0.064	0.062	0.069	0.066	0.067	0.084	0.062	0.075	0.059	0.066	0.072	0.067	0.064	0.061	0.062	0.065	0	44	44	42	42	45	40	46	44	46	44	46	18	16	42	42	45	6	39	45	43	43	45	42	44	43	45	43	44	42	41	45	42	42			
25 O_rufus_6	0.000	0.000	0.003	0.000	0.078	0.078	0.071	0.087	0.063	0.074	0.093	0.074	0.072	0.016	0.017	0.087	0.085	0.088	0.078	0.078	0.077	0.086	0.066	0.066	0	2	46	49	11	14	12	14	46	44	2	2	56	41	45	56	46	47	49	46	48	47	49	12	48	11	12	49	11	11				
26 O_rufus_7	0.000	0.000	0.003	0.000	0.078	0.078	0.071	0.087	0.063	0.074	0.093	0.074	0.072	0.016	0.017	0.087	0.085	0.088	0.078	0.078	0.077	0.086	0.066	0.066	0.000	2	46	49	11	14	12	14	46	44	2	2	56	41	45	56	46	47	49	46	48	47	49	12	48	11	12	49	11	11				
27 O_rufus_8	0.003	0.003	0.000	0.003	0.075	0.075	0.067	0.083	0.059	0.071	0.090	0.074	0.069	0.013	0.014	0.083	0.082	0.085	0.075	0.075	0.073	0.083	0.063	0.063	0.003	0.003	44	47	9	12	10	12	44	42	0	0	54	39	43	54	44	45	47	44	46	45	47	44	46	9	10	47	9	9				
28 O_nassutus_MVZ182701	0.069	0.069	0.066	0.069	0.061	0.061	0.017	0.063	0.059	0.004	0.067	0.053	0.058	0.064	0.066	0.066	0.061	0.064	0.058	0.055	0.059	0.066	0.063	0.063	0.069	0.069																																