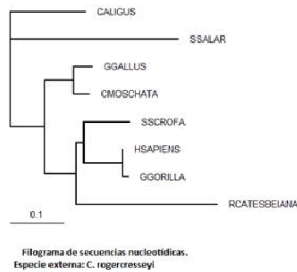




I D E A

Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas,  
Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba  
Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), CONICET-UNC, Argentina.



**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE ESPECIES DEL “COMPLEJO”  
*CALOMYS CALLOSUS* (RODENTIA, CRICETIDAE) PRESENTES EN  
ARGENTINA, POTENCIALES RESERVORIOS DE HANTAVIRUS Y  
MAMMARENARVIRUS.**

Tesina para optar por el título de Bióloga

Tesinista: Carballo Julieta

Firma:.....

Director: Raúl Enrique González Ittig

Firma: .....

13 de Diciembre de 2017

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE ESPECIES DEL “COMPLEJO”  
*CALOMYS CALLOSUS* (RODENTIA, CRICETIDAE) PRESENTES EN  
ARGENTINA, POTENCIALES RESERVORIOS DE HANTAVIRUS Y  
MAMMARENARVIRUS.**

Tribunal examinador

Dra Marina B. Chiappero      Firma: .....

Dr Raúl E. González-Ittig      Firma: .....

Dr Camilo Mattoni      Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: .....

A mi hija, Juan y a mi madre

A toda mi pequeña familia

A todos mis amigos y compañeros

A Raúl y compañeros de laboratorio

# INDICE

## Agradecimientos

## Introducción

1. Una visión general de la filogenia	2
- Métodos más utilizados para la reconstitución filogenética	4
Máxima Parsimonia (MP)	4
- Métodos probabilísticos	5
Estadística o análisis Bayesiano (EB)	5
Máxima Verosimilitud (ML)	6
2. Características generales del género <i>Calomys</i>	7
3. Importancia sanitaria	11
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13

## Materiales y métodos

1. Muestras	15
2. Técnicas moleculares: Extracción de ADN, Amplificación por PCR y Secuenciación	17
3. Análisis filogenético	18

## Resultados

1. Análisis de la Región Control del ADN mitocondrial	22
2. Análisis del gen mitocondrial Cit-b	24
3. Análisis del gen nuclear IRBP	26
4. Análisis de los genes Cit-b y Región Control concatenados	28
5. Análisis de los genes IRBP, Cit-b y Región Control concatenado	30
6. Árbol de especies con el programa BEST	32
7. Árbol de especies y tiempos de divergencia	32

## Discusión

1. Contribución a la sistemática del género *Calomys* 36
2. Tiempos de divergencia e implicancias biogeográficas 39

## Bibliografía

1. Bibliografía 45

## Material suplementario

1. Extracción salina de ADN con buffer CTAB 53
2. Figura S1: Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP del gen mitocondrial Región Control 54
3. Figura S2 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de ML del gen mitocondrial Región Control 55
4. Figura S3 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de EB del gen mitocondrial Región Control 56
5. Figura S4 Árbol consenso de mayoría obtenido con el análisis de MP del gen mitocondrial Cit-b 57
6. Figura S5 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de ML del gen mitocondrial Cit-b 58
7. Figura S6 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de EB del gen mitocondrial Cit-b 59
8. Figura S7 Arbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP del gen nuclear IRBP 60
9. Figura S8 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de ML del gen nuclear IRBP 61
10. Figura S9 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de EB del gen nuclear IRBP 62
11. Figura S10 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP con los genes Región control y Cit-b concatenados 63
12. Figura S11 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de ML con los genes Región control y Cit-b concatenados 64

- 13.** Figura S12 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de EB con los genes Región control y Cit-b concatenados 65
- 14.** Figura S13 Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de EB con los genes Región control, Cit-b e IRBP concatenados con el programa BEST 66

## **Agradecimientos**

Desde el comienzo por allá en el 2008, tomé la difícil decisión de comenzar una nueva carrera después de dejar otra. Con un poco de incertidumbre si realmente sería una buena elección, si podría terminarla o no, y miles de preguntas se acabaron con el paso de las materias y los semestres, clase a clase, parcial a parcial, final a final me fui enamorando cada vez más de esta carrera, cada nueva clase quedaba fascinada y más convencida que la decisión tomada aquel 2008 fue la correcta. Cada aspecto de la vida estudiado, memorizado, comprendido, compartido con mis compañeros se llevó una de las mejores etapas de mi vida.

Mi familia, que siempre estuvo presente, se lleva primordialmente uno de mis mayores agradecimientos, con sus dudas, sus alegrías y miedos me han acompañado en el tiempo que me llevó a finalizar la carrera. A mi madre un agradecimiento especial por los años invertidos, el apoyo, las alegrías y las desilusiones y por el simple acompañamiento emocional. A mi abuela que quedó en parte de mi camino pero me acompañó entusiasmada y curiosa. Mi tía y primas que con alegría vivieron mis avances. Durante la mitad de mi carrera apareció lo más importante que tengo en la vida y que me dio el mayor impulso para seguir sin saber lo que hacía, mi hija Alina. Si bien su llegada hizo que todo fuese más difícil y complicado, la recompensa de cada logro fue aún más valorada.

A mis compañeros de facultad que al comienzo fueron variando, apareciendo nuevos, otros dejando la carrera y que con el transcurso de la misma ya éramos los mismos locos de siempre que nos fuimos acompañando, apoyando en esos momentos de crisis, compartiendo risotadas en clases, salidas de campo, desayunos, meriendas, almuerzos, horas en la biblioteca, libros y más libros y más libros, risotadas contenidas en clases, miradas cómplices en parciales y parcialitos, los resúmenes e incontables anécdotas que con cariño quedarán siempre en mi memoria. Forman todos y cada uno de ellos una parte de la Bióloga en la que me he convertido.

A todos mis profesores que con cada materia, con cada clase despertaban una pasión en mí que no conocía, mis mayores agradecimientos a los que fueron unos excelentes docentes y personas sin dejar de lado la humildad que los caracteriza.

Un especial agradecimiento a mi director de tesina, Raúl que desde un principio, a pesar de mi condición complicada de madre primeriza y con algunos finales



por rendir, me dio la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo y con paciencia y profesionalismo me enseñó a encarar un proyecto de investigación y a llevarlo a cabo. Apoyándose en los altibajos que tiene todo proceso de investigación, nunca dejó de confiar en mí y apoyarme ante todo. Si bien todo se extendió más de lo proyectado por razones que escapan a cualquier calendario, Raúl siempre estuvo ahí, conteniéndome, guiándome, aconsejándome, ayudando a buscar soluciones, por eso se merece mis mayores respetos, mis infinitos agradecimientos y el principal contribuyente a mi profesionalismo en el trabajo de laboratorio.

A mis colegas de laboratorio de distintas disciplinas en las mañanas compartidas, charlas, mates y consejos, un agradecimiento por cada colaboración en la culminación de mi trabajo.

El final de la carrera se hace presente con un sentimiento ambiguo, el hecho de que no se termina más porque aparecen conflictos que uno no se esperaba y que uno aprende a sortearlos y las ganas de que todo eso no se termine por la nostalgia de extrañarlo, las personas que aparecen en este trayecto vulnerable son las más importantes porque solo depende de una simple palabra para seguir adelante o dejarse vencer por el cansancio, y es ahí donde aparece mi compañero de la vida, que con todo su apoyo y amor me llevo a finalizar con lo comenzado aquel 2008, a vos Juan un especial agradecimiento porque ante tanto saber y tanta razón te llevaste mi corazón y me apoyaste incondicionalmente en todo.

Gracias infinitas.

# Introducción

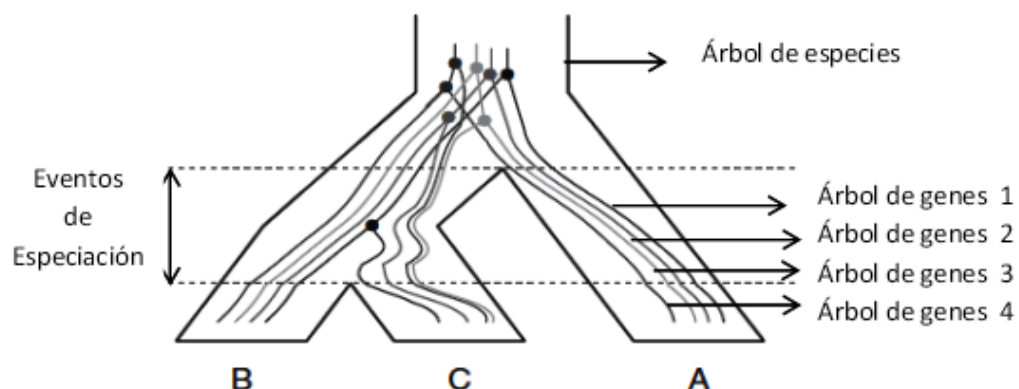
# Introducción

## *Una visión general de la filogenia*

Una de las grandes misiones de la sistemática es reconstruir y proporcionar detalles sobre el gran árbol de la vida de las especies y taxas superiores; además, en muchos casos se intenta estimar el tiempo transcurrido de divergencia entre ellos desde el último ancestro en común. Las relaciones evolutivas inferidas para un grupo de especies se representan gráficamente mediante un árbol filogenético o sea un diagrama ramificado que muestra cuáles taxa comparten entre sí ancestros comunes cercanos, es decir, las relaciones evolutivas entre ellos. Para realizar las estimaciones filogenéticas, se utilizan caracteres que son compartidos entre los taxones (desde datos morfológicos hasta moleculares), los cuales idealmente debieran ser homólogos (mismo origen aun cuando puedan tener la misma o distinta función), ya que reflejan la verdadera historia evolutiva. La secuencia de eventos de especiación que condujo a la formación de un grupo de especies es históricamente único, por lo que sólo uno de todos los arboles posibles para un grupo determinado de especies representará la verdadera historia evolutiva. Éste árbol se denomina árbol verdadero y el que se construye utilizando un cierto conjunto de datos y métodos, se denomina árbol inferido (Ridley, 2004; Futuyma, 2003). La historia de un grupo de taxa (especies, géneros, familias, etc.) comprende evento de cladogénesis (separación de un linaje en dos o más ramas por el proceso de especiación) y anagénesis (cambios direccionales dentro de un linaje). Uno de los problemas que se encuentra cuando se analiza un conjunto de especies es la presencia de politomías, que no logran resolver las relaciones entre las especies que se ven afectadas. Existen dos tipos de politomías, las blandas y las duras o verdaderas. Las politomías duras, esconden eventos simultáneos de división que no pueden ser resueltos; en cambio, las blandas pueden resolverse adicionando más linajes o más marcadores moleculares o mayor tamaño del fragmento de ADN utilizado, lo cual presenta un riesgo si la radiación fue antigua y rápida porque lejos de resolver la politomía puede llegar a producir mayor confusión en las relaciones filogenéticas (Kornilios, 2017). Además, existe otro proceso denominado “evolución reticular”, que es la transferencia de material genético entre taxa, ya sea cuando ocurre hibridación entre especies relacionadas o debido a la acción

de retrovirus que llevan material genético al infectar a los organismos (Freeman & Herron, 2007; Futuyma, 2003).

En sistemática se pueden obtener árboles de genes cuando la filogenia se reconstruye a partir de un solo gen o se pueden obtener árboles de especies, que representan el patrón evolutivo de un grupo de especies a partir de la utilización de varios árboles de genes. Ambos pueden diferir ya que la divergencia de genes podría haber ocurrido antes de que la especie se diferencie. Estrictamente, la filogenia de un gen sólo describe la evolución de ese gen particular. En realidad al árbol de especies hay que verlo como el conjunto de árboles de genes teniendo en cuenta que no todas las separaciones de genes coinciden con las separaciones de las especies (Figura 1). Una secuencia puede evolucionar más o menos rápido que otros genes o puede tener una historia evolutiva diferente del resto del genoma dando una cierta estructura al árbol de genes determinada por eventos de hibridación, transferencia horizontal de genes y otros mecanismos que empañan la imagen de la historia de las especies. Es decir, la evolución de una secuencia en particular no necesariamente se corresponde con el camino evolutivo de las especies, porque el árbol de genes está determinada por procesos como la mutación, deriva genética, migración, etc. (Knowles & Kubatko, 2010). Por esta razón, para obtener un árbol de especies, es necesario construir árboles filogenéticos de una variedad de genes para ofrecer una comparación global de la evolución (Ridley, 2004).



**Figura 1:** Los diferentes arboles de genes, que en conjunto forman el árbol de especies.

## ***Métodos más utilizados para la reconstrucción filogenética***

### **Máxima Parsimonia (MP)**

Para la reconstrucción filogenética los métodos se dividen en estadísticos (que requieren de un modelo explícito de evolución molecular) y no estadísticos. Dentro de estos últimos se encuentra el método de la Cladística basado en el principio de Máxima Parsimonia que parte del supuesto de que la evolución tomó el camino más simple y que los cambios se dieron de manera tal que se necesitó el menor número de pasos evolutivos para producir ese árbol. Por ejemplo si se observa un carácter en una especie actual y el mismo estado del carácter en una especie fósil, este principio propone que éste se heredó de su ancestro, ya que es poco probable que el estado del carácter haya cambiado y que luego haya revertido a su estado ancestral. En la búsqueda exhaustiva se construyen todas las hipótesis o árboles filogenéticos posibles para los taxones analizados y se elige la o las hipótesis que menor cantidad de pasos evolutivos propongan para explicar las relaciones entre taxones. Una vez que se tiene un árbol consenso estricto, para ver el grado de soporte de un nodo hay varios métodos, siendo el más utilizado el bootstrap que permite obtener un árbol consenso de mayoría. El soporte se obtiene de comparar árboles producidos mediante pseudoréplicas y se contabiliza el número de veces que cada nodo del árbol se presentó en las pseudoréplicas durante la elaboración del árbol consenso). En general, se considera que si una rama aparece en el 70% de los árboles ese nodo es confiable (Hillis & Bull, 1993). Para intentar obtener el árbol más parsimonioso se pueden realizar diferentes tipos de búsquedas; la búsqueda puede ser exhaustiva (al buscar todos los árboles posibles, lo cual lleva mucho tiempo), o puede ser heurística (es un algoritmo que elige los agrupamientos más cortos y descarta combinaciones más largas, de esta forma acorta los tiempos de búsqueda).

Si se quiere enraizar el árbol (darle polaridad) se pueden elegir varios métodos, como ser la utilización de fósiles para datos morfológicos o de extragrupos para datos moleculares y morfológicos, o sea un taxón viviente que posee un ancestro común con todos los taxones cuya filogenia se desea estimar (Goloboff & Pol, 2005; Freeman & Herron, 2007). Los estados del carácter que coincidan con el fósil o con el extragrupo

serán considerados ancestrales, mientras que los estados que no coincidan, serán considerados derivados. De esta forma al obtener relaciones filogenéticas se logran obtener nodos derivados y nodos internos o antiguos.

### **Métodos estadísticos o probabilísticos**

Los métodos probabilísticos más comúnmente utilizados son la Máxima verosimilitud y la Estadística Bayesiana, en los que se establecen supuestos de un modelo de evolución molecular: por ejemplo, se tiene en cuenta si hay igual tasa de sustitución en todos los casos, o si la tasa de sustitución de una base púrica a una pirimídica (transversión) es igual que la tasa de sustitución de una base púrica por otra púrica (transición) y de una pirimídica a una pirimídica (transición). Se calcula cual es la probabilidad de que cada uno de esos eventos se dé en diferentes opciones de agrupamientos y cuál es la más probable en base a los supuestos que se fijaron en el modelo de evolución.

#### **a) Estadística o análisis Bayesiano (EB)**

La EB estima la probabilidad de que el modelo evolutivo seleccionado sea verdadero, utilizando el teorema de Bayes. Arroja la filogenia más probable luego de comparar el modelo establecido y los datos disponibles. El algoritmo utilizado es MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para obtener una aproximación de la distribución de la probabilidad posterior. Parte de un árbol al azar con una combinación aleatoria de topologías, incluyendo longitudes de ramas y parámetros del modelo. Los algoritmos MCMC modifican ligeramente una de las variables del árbol inicial (ya sea la posición o longitud de una rama en concreta, o el valor de un parámetro del modelo evolutivo) y evalúan el nuevo árbol. Esto es lo que se conoce como una generación. Tras cada generación, el cambio propuesto se acepta o se rechaza en función del valor de la razón entre las probabilidades posteriores de los estados actual y anterior. Si esta razón es mayor que uno o próximo a ese valor (el nuevo estado es más probable) el cambio se acepta y la cadena MCMC continúa desde este punto. Si por el contrario, la

razón es menor de uno, el cambio se rechaza y la cadena MCMC continúa la búsqueda. La aproximación de la probabilidad posterior sería más exacta cuantas más generaciones se evalúen en la cadena MCMC. En filogenia la inferencia bayesiana genera la probabilidad posterior de un parámetro, un árbol filogenético y/o un modelo evolutivo, basada en la probabilidad anterior de ese parámetro y la función de verosimilitud de los datos. Se calcula la probabilidad de que nuestro árbol sea correcto condicionada por los datos que se tienen:  $P(\text{árbol}|\text{datos})$ . Durante las generaciones iniciales de las cadenas MCMC, los árboles suelen tener una probabilidad posterior baja como resultado de haber comenzado a partir de combinaciones aleatorias de topología, longitudes de rama y valores de parámetros. Esto es lo que se conoce como la fase de calentamiento o *burnin* (en inglés). Tras esta fase inicial, las cadenas MCMC alcanzan una fase estacionaria donde los árboles muestreados tienen una probabilidad posterior elevada. Para la estimación del árbol final mediante EB es necesario descartar los árboles del *burnin* y todo el resto de árboles con probabilidad posterior elevada se resumen mediante un árbol consenso (Goloboff & Pol 2005).

#### **b) Máxima Verosimilitud (ML)**

El método de ML busca determinar la organización de las ramas y su longitud en un árbol filogenético, para evaluar las hipótesis evolutivas de un grupo de taxones, u OTUs (unidades taxonómicas operacionales) como también suelen ser denominados los extremos de las ramas. Este método usa técnicas estadísticas estándar para inferir la distribución de probabilidad, al asignar probabilidades a posibles árboles; calcula la probabilidad de que nuestros datos se adapten al árbol:  $P(\text{datos}|\text{árbol})$ . Una de sus características principales, es que requiere un modelo de sustitución de bases, o modelo evolutivo (al igual que EB) para establecer la probabilidad de cada tipo de mutación en las secuencias. En términos generales se puede decir que un árbol que requiere más mutaciones en sus nodos internos para explicar los datos observados, es menos verosímil. Algunas de las principales ventajas, es que todos los sitios de las secuencias son informativos y permite estudiar la información que mejor se ajuste a

los datos observados. Además, debido a que requiere que la evolución de diferentes sitios y entre distintos linajes sea estadísticamente independiente, es apropiado para el análisis de secuencias relacionadas de forma distante. No obstante tiende a presentar inconvenientes cuando taxones muy cercanos presentan ramas de gran longitud (Bergsten, 2005). El cálculo de ML es una probabilidad condicional de obtener una hipótesis verdadera a partir de los datos observados. Así para evaluar la verosimilitud de un árbol, se estima la probabilidad de que este pueda haber generado los datos obtenidos bajo el modelo elegido, si la elección del modelo es incorrecto, el árbol generado también lo será. (Hall, 2004; Schmidt & von Haeseler, 2009).

### **Características generales del género *Calomys***

El género *Calomys* Waterhouse 1837 (Familia Cricetidae, subfamilia Sigmodontinae), presenta una distribución Neotropical que se extiende desde Venezuela hasta el extremo sur del Continente Americano. Una de las características más relevantes y conflictivas es que varias especies son muy similares morfológicamente, posiblemente debido a su condición ancestral dentro de la Tribu Phyllotini (Carrizo & Catalano, 2015). Los resultados de las filogenias basadas en caracteres morfológicos han sido ambiguos e incluso la monofilia del género fue cuestionada (Steppan, 1995). Este desorden e inconsistencia se debe a que muchos géneros de roedores no han sido revisados desde su descripción (Salazar-Bravo et al., 2002). Un claro ejemplo de esto se puede encontrar en las revisiones a lo largo de la historia en donde el número de especies fue variando según diferentes investigadores (Tabla 1). Los análisis que incluyeron marcadores moleculares ratificaron la monofilia del género (Salazar-Bravo et al., 2001; Almeida et al., 2007; Haag et al., 2007). Otra característica interesante es la alta variación cromosómica interespecifica que presentan, con números diploides que van desde  $2n = 36$  a  $66$  (Mattevi et al., 2005; Salazar-Bravo et al., 2001). En la última revisión del género se reconocen a las siguientes especies: *C. tener*, *C. venustus*, *C. boliviae*, *C. expulsus*, *C. callosus*, *C. cerqueirai*, *C. callidus*, *C. tocantinsi*, *C. hummelincki*, *C. lepidus*, *C. laucha*, *C. musculus* y *C. sorellus* (Salazar-Bravo, 2015). No obstante, este número puede cambiar con



nuevas revisiones; por ejemplo, a *C. sorellus* del Perú se la identificó como un complejo que involucraría al menos cinco especies (Zeballos et al., 2014). En Bolivia en los Llanos de Moxos (Departamento Beni) habría otra especie de tamaño mediano identificada molecularmente por Salazar-Bravo et al. (2001) como *Calomys* sp, que Enríe et al (2011) nombraron como *C. hildebrandii*, pero que Jorge Salazar-Bravo (comunicación personal al Dr González-Ittig) considera que debería llamarse *C. moxosensis* (esta denominación se utilizará en la Tesina).

En cuanto al origen del género *Calomys*, existen varias teorías según diferentes autores. Reig (1986) propuso que el género se originó en la Cordillera de los Andes con la posterior dispersión hacia los hábitats de tierras bajas, como lo sugiere la alta diversidad de roedores de la tribu Phyllotini en la Cordillera. Una fauna ancestral de filotinos, estrechamente relacionada al género *Calomys* habría llegado a la Puna en el Mioceno-tardío y que luego se habría diversificado pasando de un estado herbívoro/pastoreador a uno generalista (característico del grupo actual). Haag et al. (2007) revelaron que el género *Calomys* se divide en dos grandes clados. Uno asociado a hábitats de montaña de Bolivia, Perú, Chile y Argentina, que incluye las especies *C. musculus*, *C. lepidus*, y *C. sorellus*, y el otro, asociado a hábitats de tierras bajas de Brasil, Bolivia, Argentina y Paraguay que incluye las especies *C. callosus*, *C. expulsus*, *C. laucha*, *C. tener*, *C. venustus*, *C. boliviae*, *C. moxosensis*, *C. callidus* y *C. tocantinsi*.

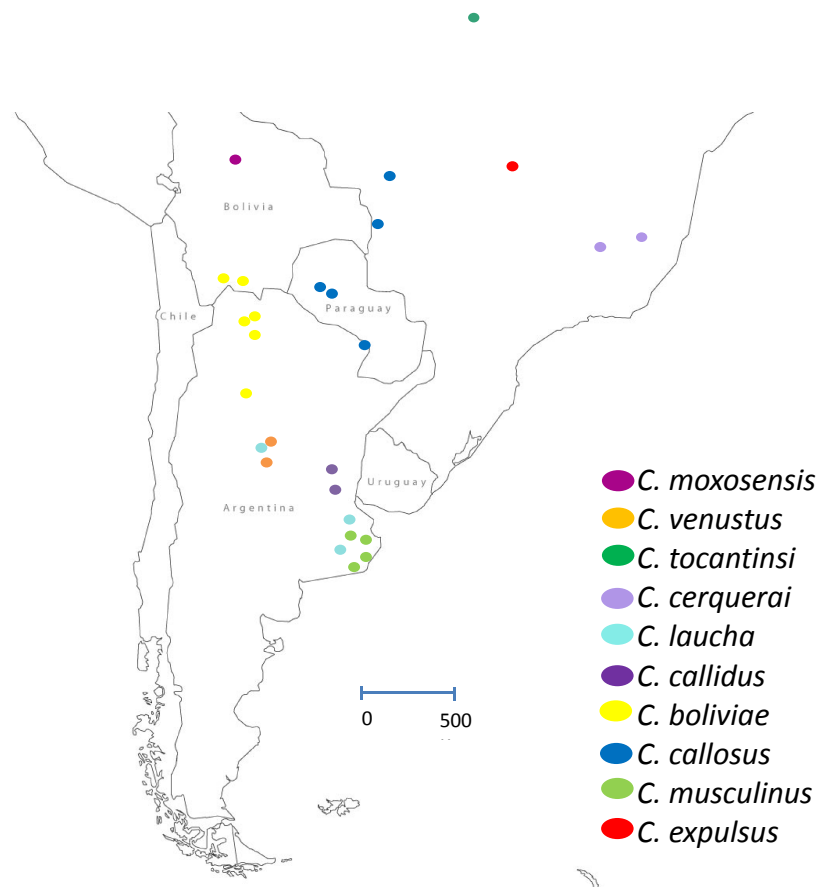
**Tabla 1:** Especies reconocidas del género *Calomys* según diferentes investigadores.

Olds (1988)	Musser & Carleton (1993)	Espinosa et al. (1997)	Salazar-Bravo et al. (2001)	Musser & Carleton (2005)	Almeida et al. (2007)
<i>C. bimaculatus</i>					
	<i>C. bolivae</i>	<i>C. bolivae</i>	<i>C. fecundus</i>	<i>C. bolivae</i>	<i>C. fecundus</i>
	<i>C. callidus</i>	<i>C. callidus</i>		<i>C. callidus</i>	
<i>C. callosus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callosus</i>
<i>C. hummelincki</i>	<i>C. hummelincki</i>	<i>C. hummelincki</i>	<i>C. hummelincki</i>	<i>C. hummelincki</i>	<i>C. hummelincki</i>
<i>C. laucha</i>	<i>C. laucha</i>	<i>C. laucha</i>	<i>C. laucha</i>	<i>C. laucha</i>	<i>C. laucha</i>
	<i>C. lepidus</i>	<i>C. lepidus</i>	<i>C. lepidus</i>	<i>C. lepidus</i>	<i>C. lepidus</i>
<i>C. musculus</i>	<i>C. musculus</i>	<i>C. musculus</i>	<i>C. musculus</i>	<i>C. musculus</i>	<i>C. musculus</i>
<i>C. sorellus</i>	<i>C. sorellus</i>	<i>C. sorellus</i>	<i>C. sorellus</i>	<i>C. sorellus</i>	<i>C. sorellus</i>
<i>C. tener</i>	<i>C. tener</i>		<i>C. tener</i>	<i>C. tener</i>	<i>C. tener</i>
<i>C. venustus</i>		<i>C. venustus</i>	<i>C. venustus</i>	<i>C. venustus</i>	<i>C. venustus</i>
<i>C. murillus</i>				<i>C. expulsus</i>	<i>C. expulsus</i>
				<i>C. tocantinsi</i>	
			<i>Calomys</i> sp.(Beni) ( <i>moxosensis</i> )		<i>Calomys</i> sp.(Beni) ( <i>moxosensis</i> )
					<i>Calomys</i> sp.nov ( <i>cerquyai</i> )

Braun (1993) propuso, basándose en la hipótesis de Marshall (1979), que el género se originó en Venezuela (donde está presente *C. hummelincki*) y se fue diversificando hacia el sur. En esta hipótesis, un corredor de vegetación abierta habría aparecido hace unos 3,5 millones de años en las laderas orientales de las Cordillera de los Andes permitiendo la migración de los sigmodontinos que habitaban al norte de Sudamérica hacia el sur de la sabana / pastizal. Por otro lado, Salazar-Bravo et al. (2001) sugirieron que el género apareció directamente al sur de la Amazonía hace aproximadamente 8,5 – 9 Ma y que desde allí se fue dispersando. En esta hipótesis se vincula la dispersión y evolución del género con la propagación de las hierbas C4 en Sudamérica y un aumento de CO2 atmosférico.

En la actualidad se puede observar que en las tierras bajas existen dos morfologías. Los de pequeño tamaño que incluyen a *C. laucha* y *C. tener* y los de

tamaños medianos a grandes, denominado *C. callosus* sensu lato (s.l.) que en realidad sería un “complejo” de al menos 6 especies: *C. callosus* sensu stricto (s.s.) (número cromosómico  $2n=50$ ) de Bolivia y Paraguay; *C. venustus* presente en Córdoba, Argentina ( $2n=56$ ); *C. moxosensis* en Bolivia ( $2n=50$ ); *C. boliviae* ( $2n=54$ ) del NOA de Argentina y Sur de Bolivia, *C. callidus* de la Mesopotamia Argentina y de Brasil ( $2n=48$ ); y *C. tocantinsi* ( $2n=46$ ) del centro norte Brasil (Bonvicino et al., 2010) (Figura 2).



**Figura 2:** Mapa de América del sur, ubicación geográfica de los ejemplares utilizados en este estudio

## **Importancia sanitaria**

En Sudamérica en general, y en Argentina en particular, se ha detectado a partir de mediados del siglo pasado la emergencia de enfermedades zoonóticas de tipo fiebre hemorrágica, producidas por virus ARN de las familias Bunyaviridae (género *Hantavirus* que causan el Síndrome Pulmonar por Hantavirus [SPH]) y Mammarenaviridae (género *Mammarenavirus* que causan, por ejemplo, la Fiebre Hemorrágica Argentina [virus Junín] y la Fiebre Hemorrágica Boliviana [virus Machupo]) (Enría & Levis, 2004; Rivera et al., 2015).

La importancia de estudios en las especies dentro de la subfamilia Sigmodontinae se debe a su asociación con esas zoonosis virales. Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre un virus y una especie de roedor, junto con el hecho de que las filogenias de virus y reservorios muestran cierto grado de correspondencia topológica, que originaron la hipótesis de que la relación roedor-virus se trataría de una forma de parasitismo surgida por co-evolución (Schmaljohn & Hjelle, 1997; Plyusnin & Morzunov, 2001; Jackson & Charleston, 2004). Sin embargo, autores como Ramsden et al. (2009), Irwin et al. (2012) y Rivera et al. (2015) han rechazado esta hipótesis, basándose en que se ha observado que una sola especie de virus puede detectarse en varias especies de roedores. Por ejemplo, el hantavirus Laguna Negra fue detectado en roedores del género *Calomys* (Cricetidae: Sigmodontinae): *C. laucha* en Paraguay, *C. callosus* en Bolivia y *C. boliviae* en Argentina (Johnson et al., 1997; Levis et al., 2004; Carroll et al., 2005; Pini et al., 2012). Esta discrepancia se podría originar, al menos en parte, en el hecho de que el conocimiento de la taxonomía de estos roedores y de los virus es muy parcial y se ve dificultado por los confusos criterios morfológicos y morfométricos utilizados para definir diferentes especies en la subfamilia Sigmodontinae y por el hecho de que virus diferentes reciben el mismo nombre y en otros casos, algunos virus que forman un solo linaje reciben distintos nombres (Musser & Carleton, 2005; Rivera et al., 2015).

El área geográfica de distribución de cada reservorio brindaría un indicador claro del área máxima potencial donde la enfermedad puede ser endémica (Mills & Childs, 1998; Mills, 2006). A fin de clarificar las relaciones entre hospedador-huésped,

se han realizado varios estudios taxonómicos en el género *Oligoryzomys* (González-Ittig et al., 2002a, 2010, 2014a; Rivera et al., 2007) y en el género *Calomys* (González-Ittig et al., 2002b, 2014b). De esta manera, en Argentina se han podido identificar diferentes genotipos de *Hantavirus* que producen enfermedad en humanos que se asocian con distintas especies del género *Oligoryzomys* (Cricetidae: Sigmodontinae) (ej. genotipo Oran-*O. chacoensis*, Lechiguanas-*O. flavescens* “Este”, Bermejo-*O. flavescens* “Oeste”, Andes-*O. longicaudatus*, Juquitiba-*O. nigripes*) (González-Ittig et al., 2014a).

En relación a *Calomys callosus* s.l. los estudios filogenéticos han detectado varias inconsistencias en las clasificaciones, dado que en los distintos estudios se obtuvieron resultados diferentes y en ninguno de ellos se incluyeron a las 6 especies (Salazar-Bravo et al., 2001; Salazar-Bravo et al., 2002; Dragoo et al., 2003; Almeida et al., 2007; Haag et al., 2007). Del complejo *Calomys callosus* algunas especies putativas serían reservorios de virus patógenos para humanos: *C. moxosensis* del Beni en Bolivia se asocia con el mammarenavirus Machupo, causante de la Fiebre Hemorrágica Boliviana (Salazar-Bravo et al., 2001, 2002); las especies *C. boliviae* del NOA y sur de Bolivia, *C. callosus* s.s. del sureste de Bolivia y *C. callidus* del Mato Grosso en Brasil serían reservorios del hantavirus Laguna Negra causante de HPS en dichas zonas (Levis et al., 2004; Carroll et al., 2005; Pini et al., 2012; Travassos da Rosa et al., 2012). , Un dato adicional es que en individuos de *C. venustus* y *C. boliviae* se han detectado infecciones con el mammarenavirus Latino-like, aunque aún no se conoce si produce alguna enfermedad al hombre (Calderón et al., 2010; Pini et al., 2012).

Dada la importancia sanitaria de *Calomys callosus* s.l. sería importante obtener una filogenia confiable de las especies del complejo que actúan como reservorio de zoonosis virales. En este estudio se realizó un nuevo análisis de la filogenia de las especies del complejo en base a datos moleculares de varios genes. Como en Argentina viven 4 de las especies del complejo, se obtuvieron datos moleculares tratando de incorporar un poco de la variación intraespecífica que es necesaria para la delimitación de especies. Se obtuvieron datos de los genes Cit-b y Región Control del ADN mitocondrial y del gen nuclear IRBP de 4 de las 6 especies conocidas del complejo. Además, se incorporaron datos moleculares disponibles en el GenBank para así realizar análisis filogenéticos con las 6 especies que conforman de *Calomys callosus* s.l. de diferentes partes de Sudamérica, abarcando Argentina, Paraguay, Bolivia y Brasil. Los

resultados de esta Tesina también fueron comparados con datos publicados anteriormente sobre el cariotipo, la distribución geográfica y las asociaciones del virus del huésped para arrojar luz sobre informes taxonómicos contradictorios.

## Hipótesis

El “complejo” *Calomys callosus* comprende varias especies monofiléticas.

## Objetivos

1.- Inferir las relaciones filogenéticas entre especies del “complejo” *Calomys callosus* comparando secuencias de ADN de Argentina con especímenes de Paraguay, Bolivia y Brasil.

2.- Integrar los resultados moleculares con la información disponible en la literatura sobre los números cromosómicos de las especies y las relaciones parásito-hospedador reportados para los géneros *Hantavirus* y *Mammarenavirus*.

## **Materiales y métodos**

# Materiales y métodos

## Muestras

En el laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución se disponía de tejidos de varias especies del género *Calomys* que habían sido preservados por más de 15 días en alcohol al 85% inactivando cualquier partícula viral que potencialmente pudiera estar presente. Para esta Tesina se utilizaron tejidos de 30 individuos de diferentes especies: a) *C. boliviae* de varias localidades de Jujuy, b) *C. venustus* de varias localidades de Córdoba, c) *C. callidus* de Victoria y del Parque Nacional El Palmar ambas en Entre Ríos y d) *C. callosus* s.s. de Colonia Buena Vista en Formosa. Para ser utilizados como extragrupos se incluyeron individuos de las especies *C. laucha* y *C. musculinus* (Tabla 2).

**Tabla 2:** Especies del complejo *C. callosus* utilizadas en este estudio. Se especifica la localidad de procedencia y las referencias bibliográficas de dónde se obtuvieron las secuencias. En la columna "Código de identificación" figuran los números de acceso al GenBank para secuencias de otros estudios y los nombres de campo para los especímenes de esta Tesina (algunos individuos fueron utilizados en estudios previos y se generaron secuencias donde se especifica el número de acceso al GenBank).

Especie	Código de identificación	Cit-b	Región Ccontrol	IRBP	Localidad	Fuente
<i>C. laucha</i>	AF385593	Si	-	-	Máximo Paz, Buenos Aires, Arg.	Salazar-Bravo et al. (2001)
<i>C. laucha</i>	Chillar1882	Si	-	Si	Chillar, Buenos Aires, Arg.	Este estudio
<i>C. laucha</i>	CE41	-	Si (DQ926662)	-	Capilla de los Remedios, Córdoba, Arg.	Gonzalez-Ilttig et al. (2008)
<i>C. musculinus</i>	JQ434405	-	-	Si	Sud América, no especificado	Salazar-Bravo et al. (2013)
<i>C. musculinus</i>	AI9299	-	Si (DQ029211)	-	Alcorta, Buenos Aires, Arg.	Gonzalez-Ilttig et al. (2008)
<i>C. musculinus</i>	SN19630	-	Si (DQ029205)	-	San Nicolas, Buenos Aires, Arg.	Gonzalez-Ilttig et al. (2008)
<i>C. musculinus</i>	JQ434404	-	-	Si	Sud América, no especificado	Salazar-Bravo et al. (2013)
<i>C. musculinus</i>	LTU804	Si	-	-	Arroyo de las Brusquitas, Buenos Aires, Arg.	Este estudio
<i>C. musculinus</i>	LTU63	Si	-	-	INTA Hilario Ascasubi, Buenos Aires, Arg.	Este estudio
<i>C. expulsus</i>	DQ447284	Si	-	-	Mimoso de Goiás, Goiás, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. expulsus</i>	DQ447285	Si	-	-	Mimoso de Goiás, Goiás, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. moxosensis</i>	AY033153	Si	-	-	El Valle, Departamento Beni, Bol.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. moxosensis</i>	AY033156	Si	-	-	Chumano, Departamento Beni, Bol.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. moxosensis</i>	AY033157	Si	-	-	La Republica, Departamento Beni, Bol.	Almeida et al. (2007)
<i>C. cerquerei</i>	DQ447273	Si	-	-	Capitão Andrade, Minas Gerais, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. cerquerei</i>	DQ447274	Si	-	-	Capitão Andrade, Minas Gerais, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. cerquerei</i>	DQ447275	Si	-	-	Lagoa Santa, Minas Gerais, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. boliviae</i>	AY033164	Si	-	-	Tucumilla, Departamento Tarija, Bol.	Salazar-Bravo et al. (2002)



<i>C. boliviae</i>	AY033170	Si	-	-	Camantindy, Departamento Tarija, Bol.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. boliviae</i>	AY033173	Si	-	-	Yerba buena, Tucumán, Arg.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. boliviae</i>	35595	Si	Si	-	El Ceibal, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	1305	Si	Si	Si	Libertador San Martín, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	1306	Si	Si	Si	Libertador San Martín, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	36531	Si	Si	Si	Yuto, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	36518	Si	Si	-	Yuto, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	29681	-	Si	-	El Bananal, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	29674	-	Si	-	El Bananal, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. boliviae</i>	29598	-	Si	-	El Bananal, Jujuy, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	AY033174	Si	-	-	2km S Espinillo, Córdoba, Argentina	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. venustus</i>	AY033175	Si	-	-	Espinillo, Córdoba, Argentina	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. venustus</i>	Sgotemp2	Si	Si (DQ926661)	Si	Santiago de Temple, Córdoba, Arg.	Gonzalez-Ittig et al. (2008) y este estudio
<i>C. venustus</i>	CE35	-	-	Si	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	CE36	-	Si	-	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	CE39	-	Si	-	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	CE40	-	Si	-	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	CE44	-	Si	-	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. venustus</i>	CE46	Si	Si	Si	Campo experimental, Córdoba, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	AY033187	Si	-	-	Monte Palma, Dpto Alto Paraguay, Par.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. callosus</i>	AY033188	Si	-	-	Boqueron, Departamento Filadelfia, Par.	Salazar-Bravo et al. (2002)
<i>C. callosus</i>	DQ447279	Si	-	-	Barão de Melgaço, Mato Grosso, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. callosus</i>	DQ447280	Si	-	-	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. callosus</i>	DQ447282	Si	-	-	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. callosus</i>	36092	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36094	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36096	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36100	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36109	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36124	Si	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. callosus</i>	36180	-	Si	Si	Colonia Buena Vista, Formosa, Arg.	Este estudio
<i>C. tocantinsi</i>	DQ447277	Si	-	-	Parna Araguaia, Tocantins, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. tocantinsi</i>	DQ447278	Si	-	-	Parna Araguaia, Tocantins, Bra.	Almeida et al. (2007)
<i>C. callidus</i>	32471	Si	Si	Si	Victoria, Entre Ríos, Arg.	Este estudio
<i>C. callidus</i>	32412	Si	Si	Si	Victoria, Entre Ríos, Arg.	Este estudio
<i>C. callidus</i>	32453	-	Si (DQ926660)	-	Victoria, Entre Ríos, Arg.	González-Ittig et al. (2008)
<i>C. callidus</i>	Elpalmar6	-	Si	-	El Palmar, Entre Ríos, Arg.	Este estudio

## ***Técnicas moleculares: extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación***

La extracción de ADN de cada ejemplar, se realizó a partir de musculo esquelético o punta de cola en mesa de flujo laminar, mediante la técnica estándar de fenol-cloroformo-isoamílico (Sambrook et al., 1989); el protocolo se encuentra detallado en Material Suplementario. Se eligió esta metodología debido a que, entre los pasos del procedimiento de extracción, los homogeneizados de tejidos son tratados con: a) la enzima proteinasa K (que además de eliminar las proteínas celulares, degrada las proteínas de la cápside de los virus que pudieran estar presentes), b) con el detergente de membranas celulares SDS (que degrada también la cubierta lipoproteica del virus), y c) la enzima ARNasa que degrada el ARN (tanto genómico como el viral).

Las amplificaciones se realizaron en una termociclador UNO-II Thermoblock (Biometria, Göttingen, Alemania). La Región Control de ADN mitocondrial, fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores 464 y 282 con las secuencias 5'-TGAATTGGAGGACAACCGT-3' y 5'-AAGGCTAGGACCAAACCT-3', respectivamente (González Ittig et al., 2002b), obteniéndose un fragmento aproximado de 1253 pares de bases (pb), correspondientes a una pequeña porción del extremo 3' del Citocromo b (Cit-b; 110 pb), la Región control completa, los genes ARNt<sup>tre</sup>, ARNt<sup>pro</sup>, ARNt<sup>fen</sup> y una pequeña parte del gen de ARN ribosomal 12S del ADN mitocondrial. La reacción comenzó con una desnaturalización a 94° C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94° C, hibridación del cebador por 90 segundos a 55° C y extensión durante 90 segundos a 72° C. Finalmente hubo un periodo de extensión final a 72° C durante 5 minutos.

Para la amplificación del gen completo de Cit-b de ADN mitocondrial, se utilizaron los cebadores Mus14095 (Cadena ligera), 5'-GACATGAAA AATCATCGTTGTAATTC-3' y Mus15398 (cadena pesada), 5'-GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG-3' (Anderson & Yates, 2000), obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1098 pb. La reacción comenzó con una

desnaturalización a 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, hibridación del cebador por 45 segundos a 52° C y extensión a 72° C por 45 segundos. Finalmente hubo un periodo de extensión final a 72° C por 5 minutos. Para la amplificación del gen nuclear IRBP, se utilizaron los cebadores externos IRBP-A1 5'-ATGCGGAAGGTCCTCTTGGATAAC-3' e IRBP-B2 5'-ATGAGGTGTTCCGTGTCCTG-3' (Jansa & Voss, 2000; Weksler, 2003) y los cebadores internos IRBP-F 5'-CTCCACTGCCCTCCCATGTCT-3' e IRBP-E2 5'-AGCAGATGCGCAGAGCCATAGTGGT-3'. La amplificación comenzó con una desnaturalización a 95° C durante 2,5 minutos, seguido de 5 ciclos de desnaturalización a 95° C por 20 segundos, hibridación del cebador a 58, 56 o 54° C por 15 segundos y extensión a 72° C, una etapa de 23 ciclos de desnaturalización a 95° C por 20 segundos, hibridación del cebador por 15 segundos a 52° C y una extensión a 72° C por 60 segundos, y una extensión final por 7 minutos a 72° C. Los fragmentos se secuenciaron en algunos casos utilizando los cebadores externos con la combinación A1/B2, y en otros casos utilizando una combinación de internos con externos: A1/F o E2/B2.

Los productos de PCR se purificaron con el kit Silica Bead DNA Gel Extraction (Fermentas, EEUU) y secuenciados tanto en el Instituto de Biotecnología, Unidad de Genómica, INTA Castelar (Hurlingham, Argentina) como en la empresa Macrogen Corea (<http://www.macrogen.com>).

### **Análisis filogenéticos**

Para el análisis de las secuencias se empleó el programa de Chromas 2.1.1 ([http://technelysium.com.au/?page\\_id=13](http://technelysium.com.au/?page_id=13)) y fueron alineadas con el programa Muscle (dentro del paquete MEGA7; Kumar et al., 2016) utilizando los parámetros por defecto. Se incorporaron secuencias de los genes Cit-b, Región Control e IRBP, disponibles en el GenBank de las especies *C. tener*, *C. moxosensis*, *C. tocantinsi*, *C. cerquerei* y *C. expulsus*. Se incluyeron mayoritariamente secuencias de donde se pudieron establecer las localidades de procedencia en Bolivia, Paraguay y Brasil (Tabla 2).

Para los análisis filogenéticos se utilizaron métodos tradicionales basados en la estadística Bayesiana (EB), de máxima verosimilitud (ML) y máxima parsimonia (MP) para cada gen, obteniendo “árboles de genes”. Previo al uso de EB, se determinó el

modelo de sustitución de nucleótidos más apropiado para el set de datos con el programa jModeltest 2 (Darriba et al. 2012) utilizando el criterio BIC. Los modelos obtenidos fueron TPM3uf+I para Región Control, HKY+I+G para Cit-b, K80+I para IRBP, TPM2uf+G para el concatenado de los dos genes mitocondriales y TIM2+I+G para el concatenado de los 3 genes. Los parámetros de dichos modelos se utilizaron posteriormente para inferir las relaciones filogenéticas con el programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2012). Los análisis se realizaron con 2000000 generaciones para cada gen de forma individual y 6000000 generaciones para el análisis concatenados (2 y 3 genes juntos) y los árboles fueron muestreados cada 1000 generaciones. En todos los casos los análisis se realizaron dos corridas en simultáneo, cada una con 4 cadenas independientes (tres cadenas calientes y una fría) de MCMC y se descartaron como *burn-in* al 25% de los muestreos que realiza el programa. Para estar seguros de la convergencia de las dos corridas, se chequeó que el valor de desviación media estándar (average standard deviation) fuera menor a 0.01.

Los análisis de MP se realizaron con el programa PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003); a los nucleótidos se les dio el mismo peso y para la Región Control los gaps fueron considerados como un quinto estado del carácter. Los genes Cit-b e IRBP carecían de gaps. Se realizaron búsquedas heurísticas para hallar los árboles más parsimoniosos utilizando 1000 réplicas de árboles de Wagner y TBR, reteniendo hasta 100 árboles por réplica y los soportes de los nodos fueron estimados mediante bootstrap=1000. Los árboles más parsimoniosos obtenidos se resumieron en un árbol consenso estricto.

Los análisis de ML se realizaron con el programa online PhyML v3 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>; Guindon et al., 2010). Los parámetros de los modelos obtenidos con jModeltest 2 según el criterio de Akaike (AIC) fueron incorporados para los análisis: Se calculó el árbol de mayor probabilidad o likelihood y posteriormente se obtuvo un consenso de mayoría para conocer el soporte de los nodos mediante 1000 repeticiones de bootstrap.

Dado que cada gen tiene una tasa de mutación diferente y que los genes nucleares pueden sufrir recombinación, es posible que se obtengan resultados diferentes. Para integrar las topologías de cada uno de los genes se utilizaron programas que permitan obtener “árboles de especies”; estos son: a) BEAST 1.8.2

(Drummond & Rambaut 2007); es un método basado en EB que permite estimar los tiempos de divergencia entre especies como las del complejo *C. callosus*. El análisis se realizó con 30 millones de generaciones para las secuencias concatenadas de la Región control y de Cit-b, con una tasa de mutación de 0,0393 sustituciones por millón de años, resultante de promediar las tasas de la Región control (0.056 sustituciones por sitios por millón de años; Goios et al., 2007) y la de Cit-b (0.023 sustituciones por sitios por millón de años; Smith & Patton, 1993). Se utilizó un modelo de sustitución HKY+G, un reloj relajado lognormal y la opción "Speciation: Birth-Death Process". Los resultados fueron chequeados con el programa Tracer 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk>), se consideró que la búsqueda había convergido cuando los tamaños efectivos de muestreo (ESS) eran superiores a 200. b) BEST 2.3.1 (Liu, 2008); es otro método bayesiano que estima árboles de especies a partir de secuencias multilocus y de alelos múltiples. Este programa es una adaptación de MrBayes y para ver la convergencia se utiliza el mismo criterio que en aquel programa. Este análisis se realizó utilizando los dos genes mitocondriales o utilizando los dos genes mitocondriales y el gen nuclear de manera particionada. Se utilizaron los parámetros estimado para cada gen como se describió con anterioridad para los análisis de MrBayes. El árbol de especies se estimó utilizando dos corridas independientes con una sola cadena con muestreos cada 1000 generaciones.

Todos los árboles de los diferentes métodos utilizados fueron visualizados con el programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

El cálculo de las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas se llevó a cabo bajo el modelo de "Kimura dos parámetros" (K2P) utilizando el programa PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003).

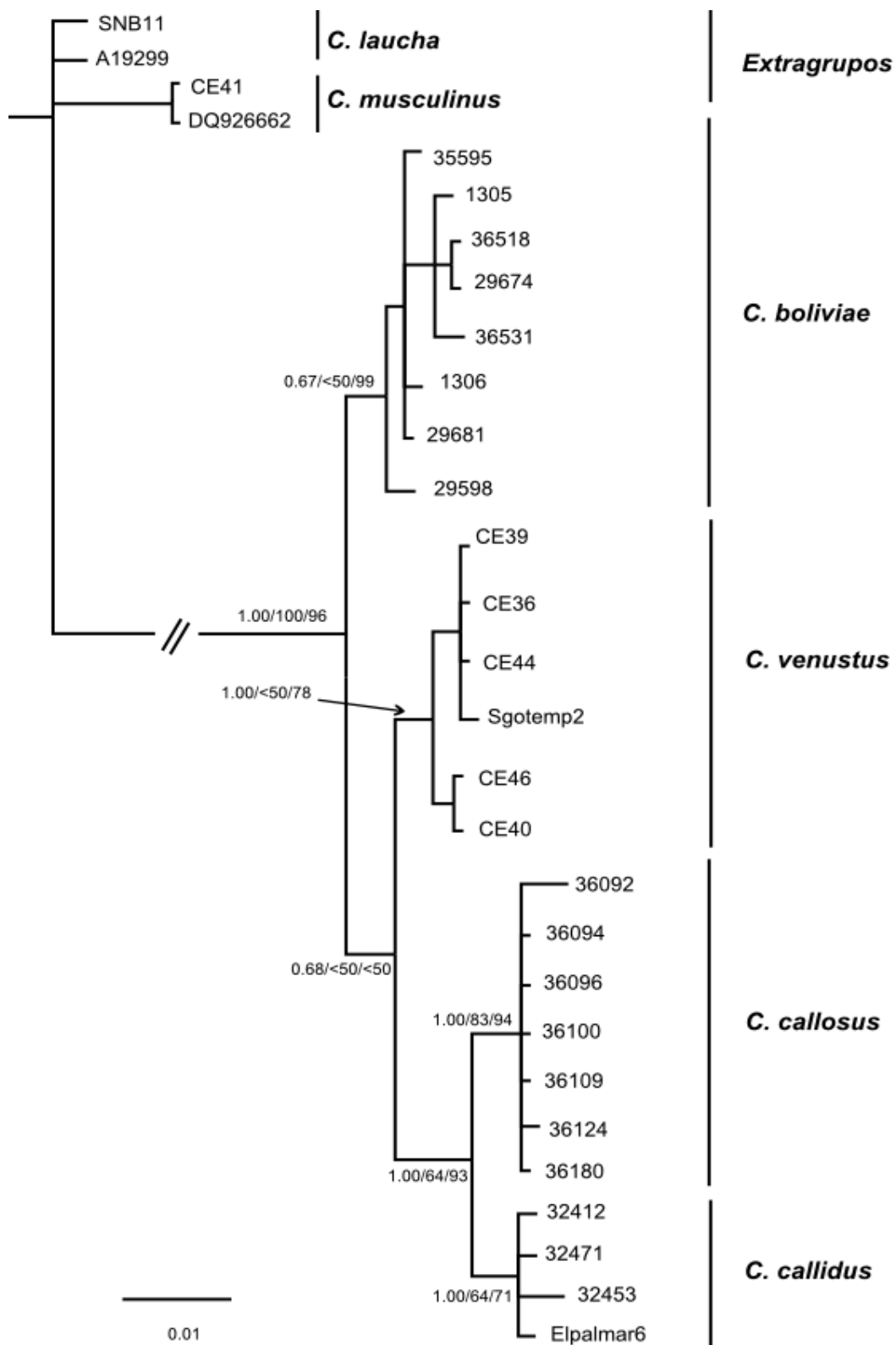
## **Resultados**

# Resultados

## ***Análisis de la Región Control del ADN mitocondrial.***

La Región Control se analizó con diferentes métodos (EB/MP/ML). Se analizaron un total de 1253 caracteres, resultando 189 caracteres informativos. La topología varió de acuerdo al método; en la Figura 3 se muestra el árbol obtenido con EB y los valores de soporte de los nodos de los tres métodos utilizados. Con EB, arroja la siguiente topología (*C. boliviae*, (*C. venustus*, (*C. callidus* y *C. callosus*))). Con el método de ML, la topología del árbol es diferente, ya que separa como grupo hermano, aunque con un bajo soporte, a *C. venustus* y agrupa a *C. boliviae* con *C. callosus* y *C. callidus*. Es decir, la topología es: (*C. venustus*, (*C. boliviae*, (*C. callidus* y *C. callosus*))). En la Figura S1 (Material Suplementario) se muestra la topología del árbol consenso estricto obtenido con MP, presenta una politomía de la cual derivan *C. venustus*, *C. boliviae* y un clado que agrupa a *C. callosus* y *C. callidus* (es el único nodo con un valor de soporte alto). En las Figuras S2 y S3 se muestran los árboles con mayor probabilidad obtenidas con ML y EB respectivamente. En todos los casos se muestra el soporte de los nodos.

En la Tabla 3 se representan las distancias genéticas K2P interespecíficas. Las mismas son muy bajas; ninguna de las distancias ente las especies del complejo llegan al 2%. Posiblemente la baja diferenciación genética genera diferentes topologías y politomías ente las especies aquí analizadas.



**Figura 3:** Árbol Bayesiano obtenido a partir del análisis de la Región Control. El orden de los valores de soporte de los nodos es EB / MP/ ML. Las secuencias de *C. laucha* y *C. musculus* fueron utilizadas como extragrupos.



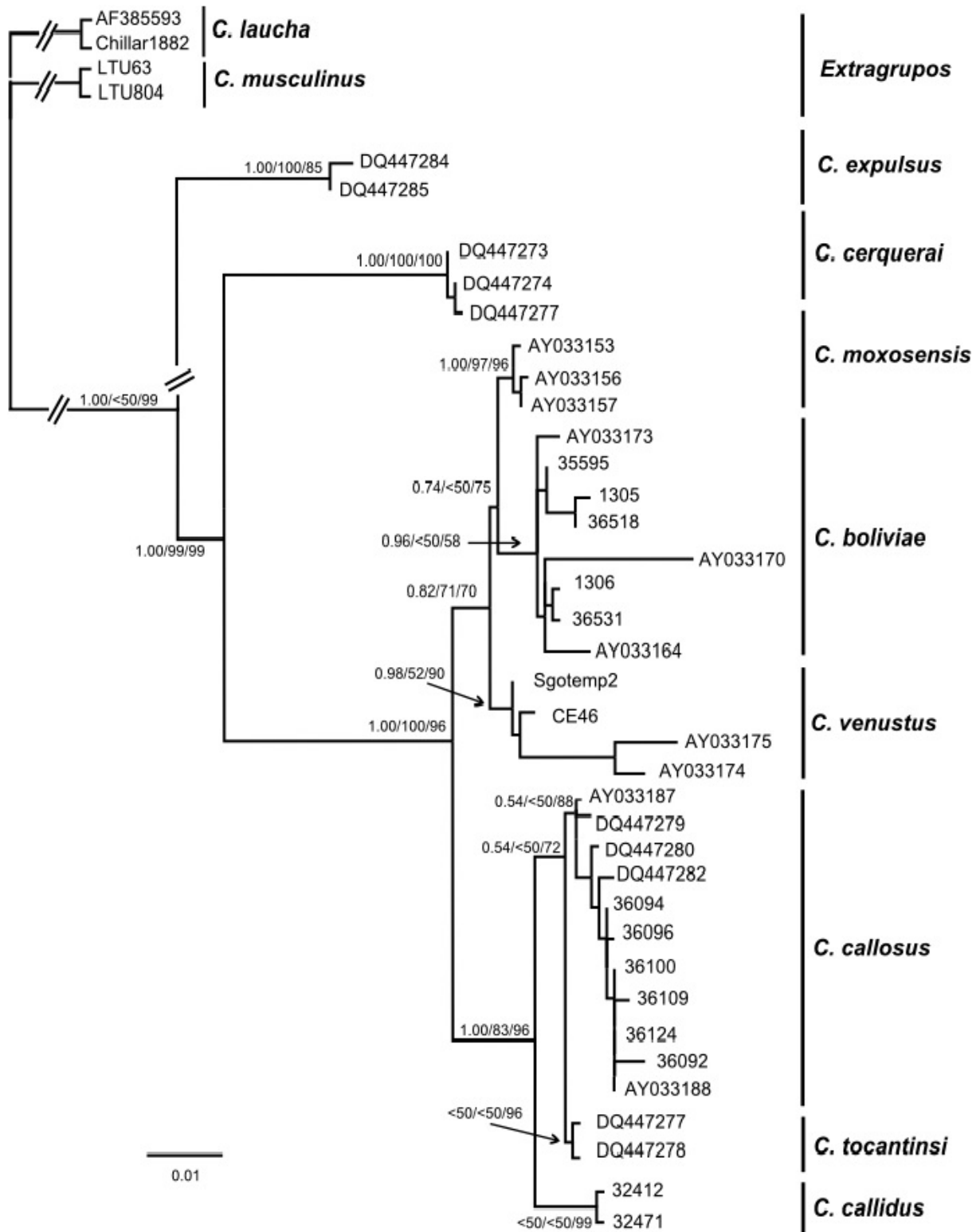
**Tabla 3:** Distancias genéticas de Kimura 2 parámetros obtenidas del análisis de la Región Control entre las 4 especies de *Calomys* analizadas con este gen.

	<i>C. boliviae</i>	<i>C. venustus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callidus</i>
<i>C. boliviae</i>	0.0028			
<i>C. venustus</i>	0.0089	0.0015		
<i>C. callosus</i>	0.0159	0.0012	0.0011	
<i>C. callidus</i>	0.0149	0.0142	0.0088	0.0028

### **Análisis del gen mitocondrial *Cit-b***

La Figura 4 representa la topología del árbol obtenido mediante el método de ML en base al análisis del gen *Cit-b*. Se analizaron un total de 1098 caracteres, resultando 274 caracteres informativos. Con este gen se pudieron incluir en el análisis las secuencias disponibles en el GenBank de otras especies del complejo de las cuales no se disponía de tejidos. En general todos los métodos muestran una separación de dos grandes clados, uno que incluye a *C. venustus*, *C. boliviae* y *C. moxosensis* y el otro que agrupa a *C. callosus*, *C. tocontinsi* y *C. callidus*. El método de ML (material suplementario Figura S5) es el que mejor recupera a todas las especies del grupo como monofiléticas. Sólo *C. boliviae* y *C. callosus* s.s. presentan bajo soportes. Las relaciones que se obtienen son (*C. venustus*, (*C. boliviae* y *C. moxosensis*)) y (*C. callidus*, (*C. tocontinsi* y *C. callosus*)). En cambio, los métodos de EB y MP (Figura S6 y S4, respectivamente del material suplementario) logran un buen soporte de los nodos para la separación de los grupos monofiléticos correspondientes a (*C. venustus*, (*C. boliviae* y *C. moxosensis*)), pero genera una politomia entre el grupo de especies de *C. callosus*, *C. tocontinsi* y *C. callidus*.

En la Tabla 4, se representan las distancias genéticas interespecíficas. Se puede destacar que entre *C. tocontinsi* - *C. callosus* s.s. la diferenciación es baja, seguida en orden creciente entre *C. callosus* - *C. callidus* y *C. callidus* - *C. tocontinsi*; este podría ser el motivo de la pobre resolución de las relaciones entre estas especies en algunos análisis.



**Figura 4:** Árbol consenso de mayoría de ML obtenido del análisis del gen *Cit-b*. El orden de los valores de soporte de los nodos es EB / MP / ML. Las secuencias de *C. laucha* y *C. musculus* fueron utilizadas como extragrupo.

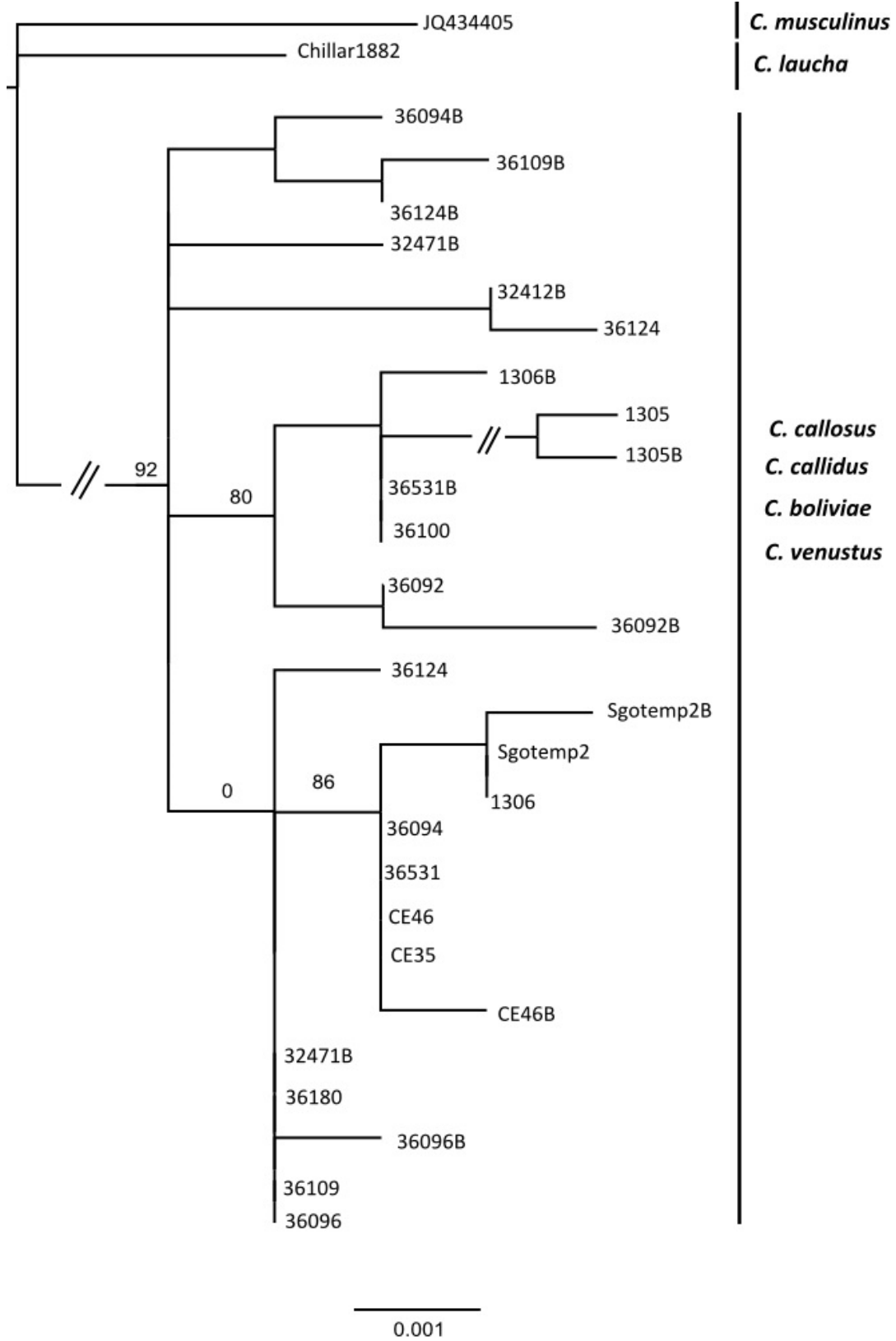
**Tabla 4:** Distancias genéticas de Kimura 2 parámetros obtenidas del análisis de Cit-b entre las 7 especies de *Calomys* analizadas con este gen.

	<i>C. boliviae</i>	<i>C. venustus</i>	<i>C. moxosensi</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. tocantinsi</i>	<i>C. callidus</i>
<i>C. boliviae</i>	0.0099					
<i>C. venustus</i>	0.0198	0.0142				
<i>C. moxosensi</i>	0.0124	0.0176	0.0018			
<i>C. callosus</i>	0.0239	0.0287	0.0241	0.0039		
<i>C. tocantinsi</i>	0.0252	0.0296	0.0248	0.0097	0.0018	
<i>C. callidus</i>	0.0300	0.0334	0.0299	0.0144	0.0141	0.0018

### **Análisis del gen nuclear IRBP**

La Figura 5 representa la topología del análisis del gen IRBP con MP. Se analizaron un total de 1201 caracteres, resultando 14 caracteres informativos. Sólo se analizaron las especies de las cuáles se disponía de tejidos para amplificar este gen nuclear. Todos los análisis realizados (MP, EB, ML) arrojaron resultados similares, sin poder resolver la politomia que presenta. Con MP (Figura S7 del material suplementario) hay una gran politomia que solo separa a los extragrupos; si bien muestra dentro de esta politomia a las especies en orden no logra agruparlas. El resultado es similar con EB y ML (Figura S9 y S7 respectivamente del material suplementario), es decir, solo se separan los extragrupos pero las demás especies y grupos aparecen entremezclados. En todos los casos se muestra además el soporte de los nodos.

En la Tabla 5 se ven las distancias de K2P interespecíficas de este gen son todas bajas y similares, lo cual es compatible con la imposibilidad de resolver las separaciones entre los linajes.



**Figura 5:** Árbol consenso estricto obtenido del análisis de MP del gen nuclear *IRBP*. Las secuencias de *C. laucha* y *C. musculus* fueron utilizadas como extragrupos. Se agregan los valores de soportes obtenidos para el árbol consenso de mayoría.

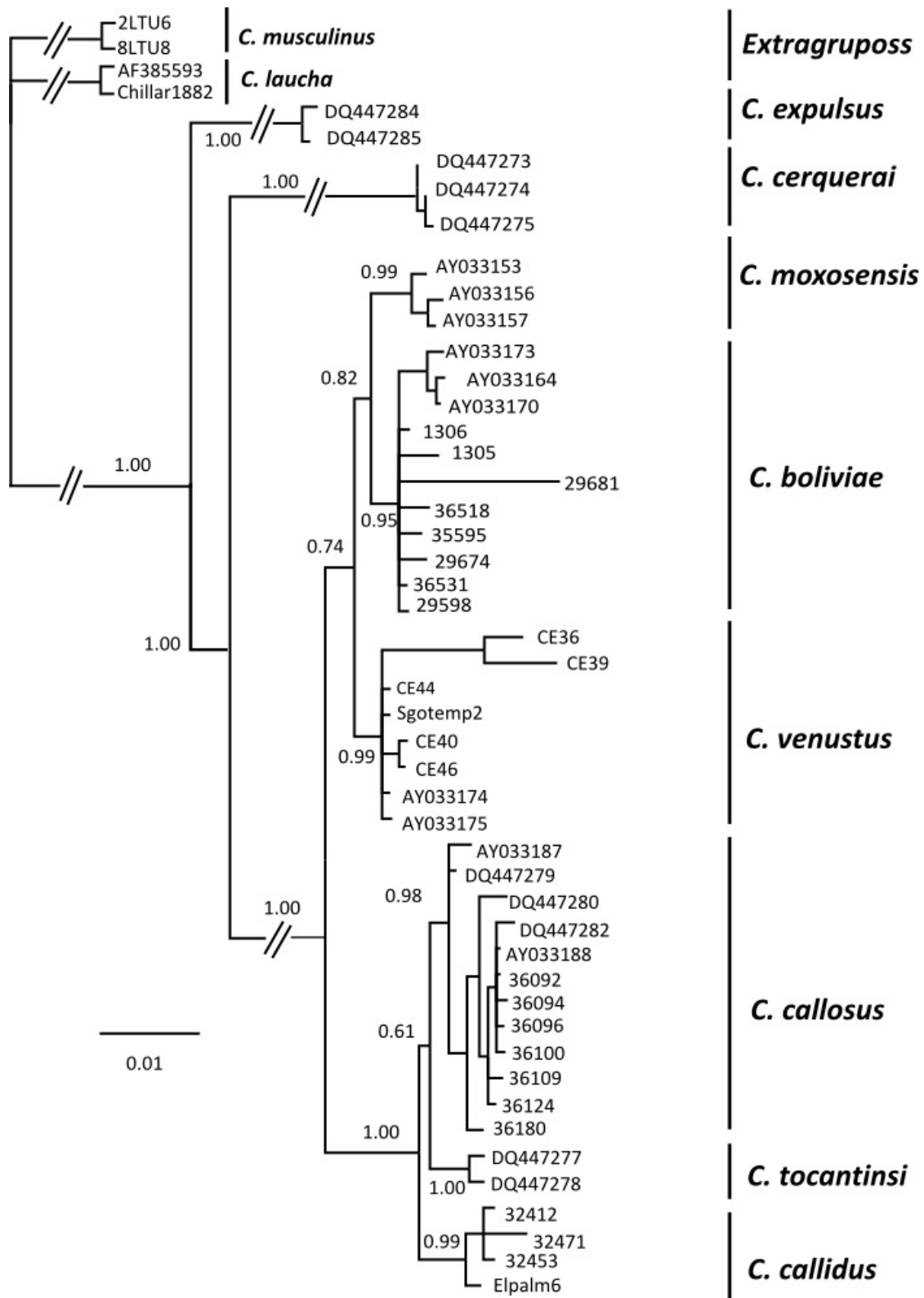
**Tabla 5:** Distancias genéticas de Kimura 2 parámetros obtenidas del análisis de IRBP entre las 4 especies de *Calomys* analizadas con este gen

	<i>C. boliviae</i>	<i>C. venustus</i>	<i>C. callosus</i>	<i>C. callidus</i>
<i>C. boliviae</i>	0.0049			
<i>C. venustus</i>	0.0039	0.0011		
<i>C. callosus</i>	0.0044	0.0027	0.0025	
<i>C. callidus</i>	0.0056	0.0038	0.0338	0.0033

### **Análisis de los genes *Cit-b* y Región Control concatenados**

La Figura 6 muestra la topología del árbol obtenido a partir del análisis de EB de los genes mitocondriales *Cit-b* y Región Control de manera concatenada. En esta matriz se incluyeron a todas las especies del complejo, pero algunos individuos solo presentaron la Región Control y otros sólo el *Cit-b*; en estos casos la matriz se completó con signos de interrogación para mantener el alineamiento. Se analizaron un total de 2351 caracteres, resultando 423 caracteres informativos. Con este método se logra una excelente resolución de los nodos que separa a los grupos monofiléticos. Al igual que en la topología del *Cit-b* se recupera una gran división de dos grandes clados: (*C. venustus*, (*C. boliviae* y *C. moxosensis*)) y el otro integrado por (*C. callidus*, (*C. tocantinsi* y *C. callosus*)). Utilizando esta matriz concatenada con los métodos EB y ML (ver consenso estricto en Material Suplementario Figura S12 y S11 respectivamente) se logra una muy buena resolución en las relaciones filogenéticas entre las especies. Sin embargo, si bien también con MP se encuentra la gran división de estos dos grandes clados, no logra resolver las relaciones dentro de ellas y se encuentra una politomía que agrupa a las especies de *C. moxosensis* y *C. boliviae* (ver consenso estricto en Material Suplementario Figura S10) y dentro del otro gran grupo genera otra politomía agrupando a las especies de *C. tocantinsi* y *C. callosus* s.s. En todos los casos se muestra además el soporte de los nodos.

Con este análisis concatenado no pudo generarse una matriz de distancias genéticas debido a que no había datos para los dos genes de todas las especies.

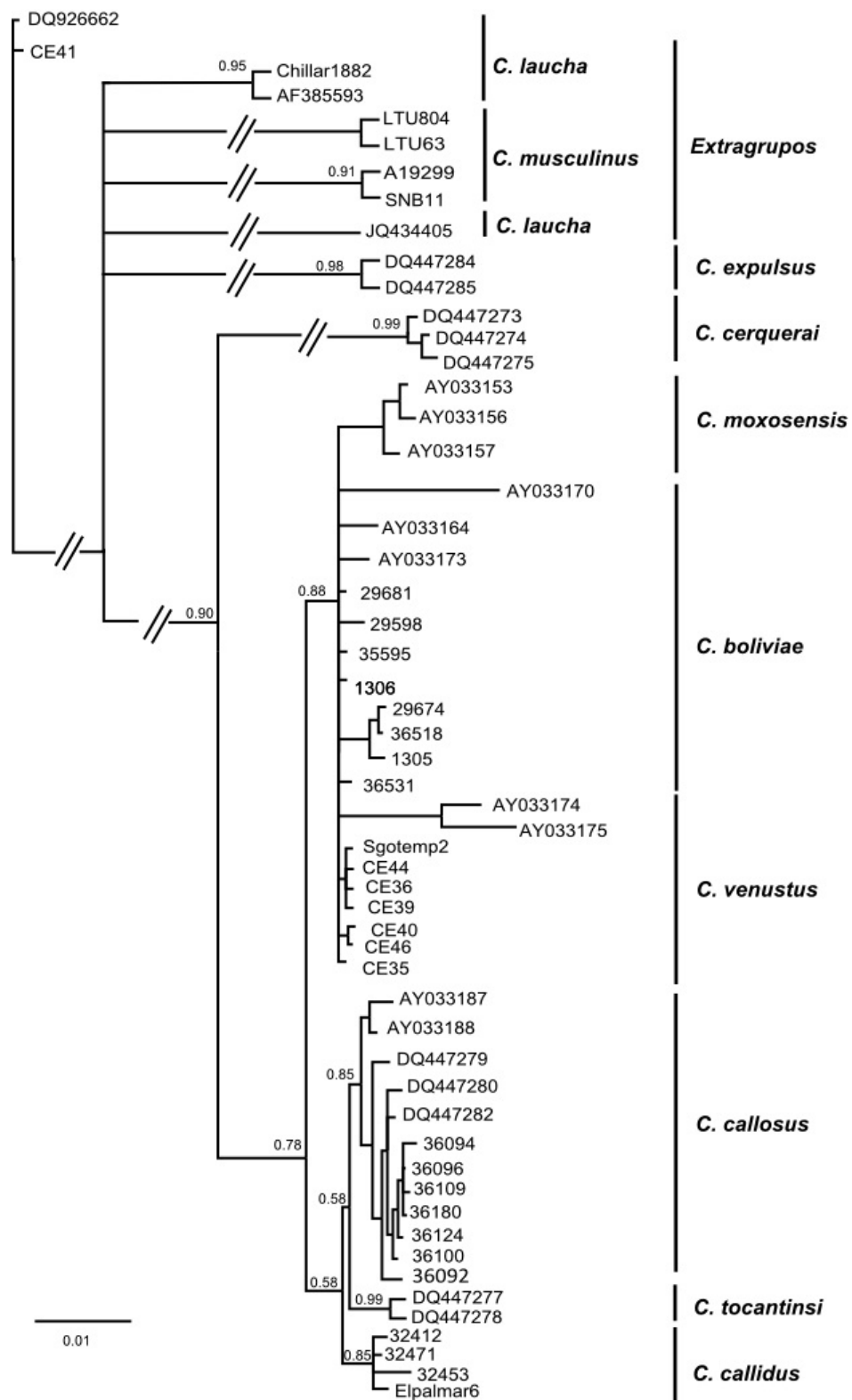


**Figura 6:** Árbol Bayesiano obtenido del análisis concatenado de los genes mitocondriales Cit- *b* y Región Control. El orden de los valores de soporte de los nodos es EB / MP / ML. Las secuencias de *C. laucha* y *C. musculus* fueron utilizadas como extragrupos.

### **Análisis de los genes IRBP, Cit-b y Región Control concatenados.**

La Figura 7, muestra el resultado del análisis de EB de los tres genes (IRBP, Región Control y Cit-b) en conjunto, después de 6 millones de generaciones. A los extragrupos los separa claramente del grupo interno pero la especie *C. laucha* resulta ser parafilética, posiblemente porque el individuo identificado como JQ434405 sólo presenta el gen IRBP, mientras que el individuo Chillar 1882, presenta los genes Cit-b e IRBP y el individuo correspondiente a la secuencia AF385593 solo el Cit-b. En el grupo interno se logra la gran separación de los dos grandes grupos de *Calomys* que se había recuperado anteriormente. Sin embargo, en el gran clado de *C. venustus*, *C. boliviae* y *C. moxosensis* no logra resolver las relaciones entre ellas y se observa una politomia entre las tres especies. En el segundo gran grupo *C. callosus*, *C. tocantinsi*, y *C. callidus* se recupera la monofilia de las tres especies, con un buen soporte estadístico.

Dado que el árbol de genes del IRBP mostró muy poca resolución, con tan solo 14 caracteres informativos de la totalidad de 1201 evidenciado en el resultado de este análisis de la Figura 7, se decidió no hacer MP y ML de esta matriz con los tres genes porque probablemente el aporte no sería significativo y el resultado final no sería bueno.

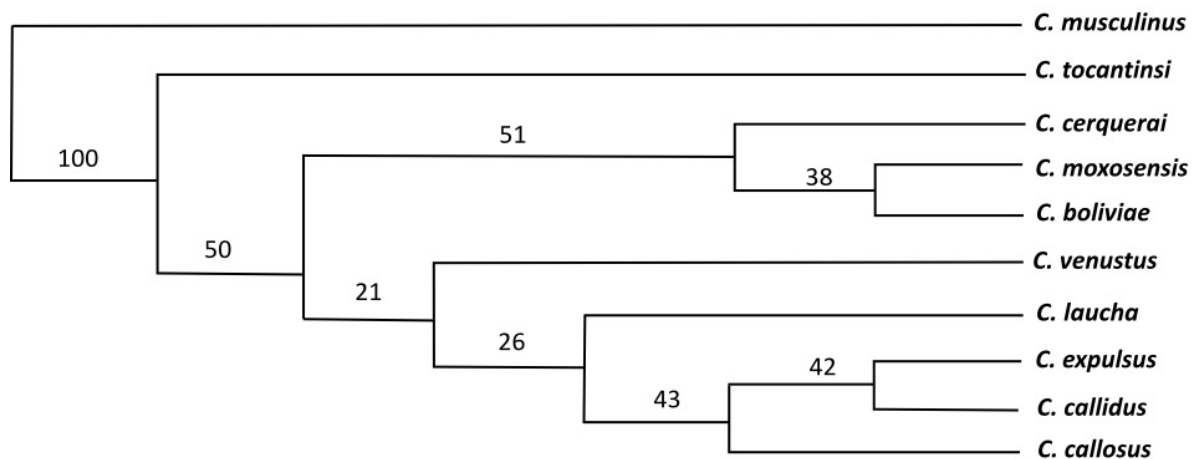


**Figura 7:** Árbol Bayesiano obtenido en base al análisis de los tres genes juntos (IRBP, Cit-b y Región Control). En este análisis se utilizaron 6 millones de generaciones.



### **Árbol de especies con el programa BEST.**

La Figura 8, representa el árbol de especies obtenido luego de realizar un análisis de los dos genes mitocondriales particionados en una sola matriz, utilizando el programa BEST, el cual no logró converger después de 13 millones de generaciones. A su vez, se realizó el análisis de los 3 genes (los dos mitocondriales y el nuclear) particionados en una sola matriz y tampoco logró convergir después de casi 30 millones de generaciones (árbol en Material Suplementario Figura S13). Este programa analiza si existe congruencia entre las topologías de los distintos genes para obtener un árbol de especies. Como puede observarse, los grupos se encuentran entremezclados, incluso *C. laucha* se mete dentro del intragrupo, esto se debería a la poca resolución que brinda el gen IRBP.



**Figura 8:** Árbol de especies obtenido en el análisis de EB realizado por el programa BEST en base a los 2 genes mitocondriales juntos. Este análisis es incompleto puesto que no se logró convergencia. Se muestran los valores de soporte de las relaciones obtenidas con este método.

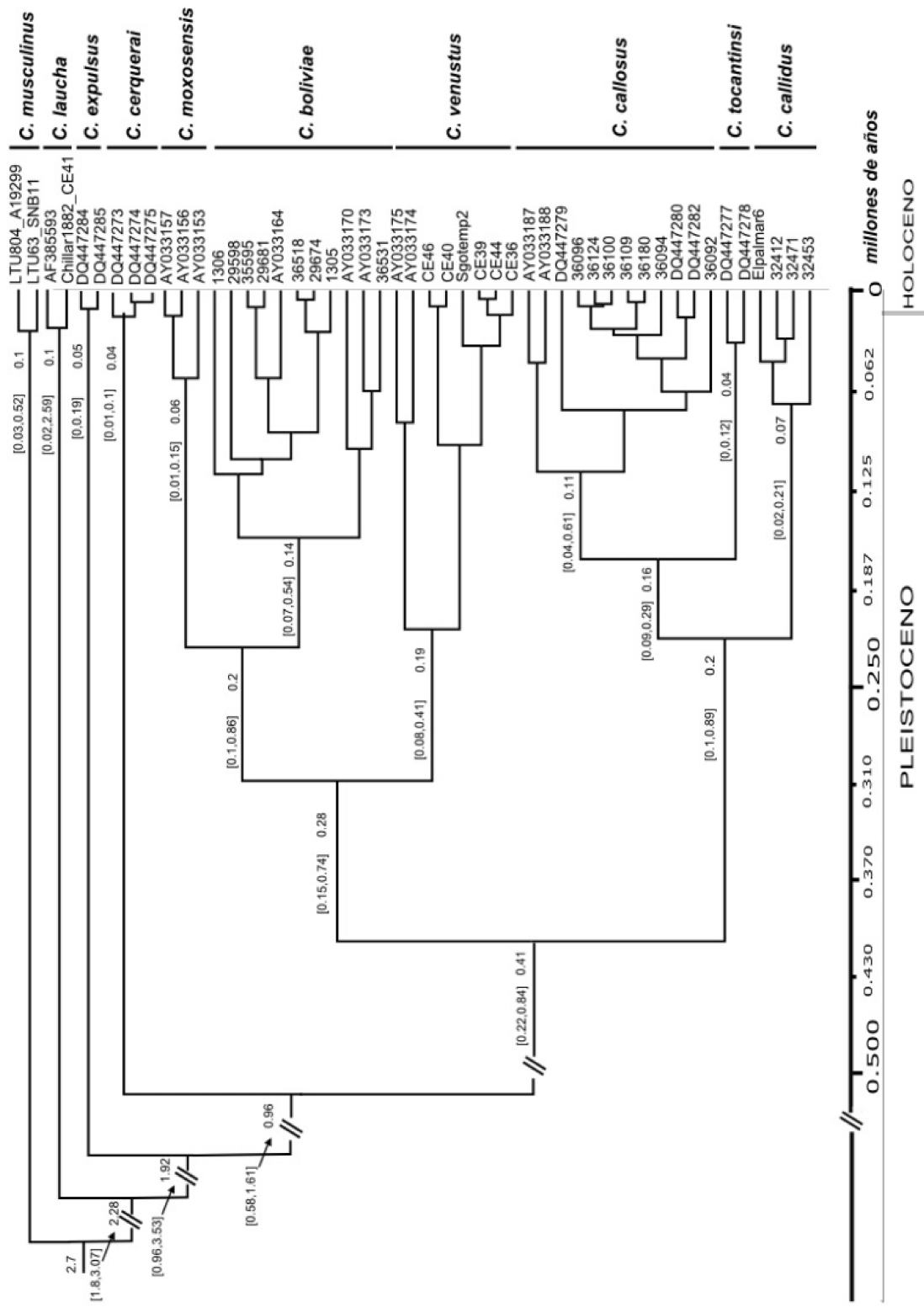
### **Árbol de especies y tiempos de divergencia**

La Figura 9 representa el árbol de especies obtenido a partir del análisis de los genes concatenados de Cit-b y Región Control, donde se muestran los tiempos de divergencia entre los linajes según el programa BEAST v.1.8.2, luego de 30 millones de generaciones. Las estimaciones cuentan con un intervalo de confianza del 95 % o highest probability density (95% HPD)

Hace aproximadamente 410 mil años (95% HPD= entre 220 a 840 mil años) se habrían separado los dos grandes grupos de especies del complejo *Calomys callosus*, es decir, aquel que agrupa a *C. moxosensis*, *C. venustus* y *C. boliviae* y el otro que está formado por *C. callosus*, *C. tocantinsi* y *C. callidus*. Del primer grupo, el ancestro de *C. venustus* se habría separado del resto hace 280 mil años (95% HPD= 150 a 740 mil años). La separación entre los ancestros de *C. moxosensis* y *C. boliviae*, habría ocurrido hace 200 mil años (95% HPD= 100 a 860 mil años). El ancestro en común más reciente de todos los *C. venustus* aquí analizados tendría 190 mil años (95% HPD= 80 a 410 mil años), mientras que los de *C. boliviae* y *C. moxosensis* tendría 140 mil (95% HPD= 70 a 540 mil años) y 60 mil años (95% HPD= 10 a 150 mil años), respectivamente.

En el otro gran grupo del complejo, el ancestro de *C. callidus* se habría separado del resto hace aproximadamente 200 mil años (95% HPD= 100 a 890 mil años). A su vez, la separación entre los ancestros de *C. callosus* s.s. y *C. tocantinsi* habría ocurrido hace 160 mil años (95% HPD= 90 a 290 mil años). El ancestro común más reciente de todos los *C. callidus* aquí analizados tendría 70 mil años (95% HPD= 20 a 210 mil años), el de *C. callosus* 110 mil años (95% HPD= 40 a 610 mil años) y el de *C. tocantinsi* 40 mil años (95% HPD= 0 a 120 mil años).

Este tipo de análisis no se realizó con los tres genes puesto que la incorporación del gen IRBP generaría, muy probablemente, una mezcla en las relaciones filogenéticas de las especies del complejo *C. callosus*.



**Figura 9:** Árbol de Máxima Credibilidad del complejo *C. callosus* calculado con el programa BEAST v.1.8.2 en base a los dos genes mitocondriales concatenados. La escala temporal se indica en millones de años y se calibró con una tasa de sustitución de 0.0393 sustituciones/millón de años (es el promedio de las tasa de la región control [Goios et al. 2007] y del Cit-b [Smith y Patton, 1993]). Se indican el tiempo de divergencia sólo sobre los nodos de interés dentro del complejo. Entre paréntesis en cada rama se encuentra representado el intervalo de confianza del tiempo de cada nodo que se encuentra a continuación.

## **Discusión**

# Discusión

## ***Contribución a la sistemática del género Calomys***

Esta Tesina se focalizó en el estudio de un complejo de especies pertenecientes al género *Calomys*, el cual se denomina “complejo” *callosus* que incluye a *C. moxosensis*, *C. boliviae*, *C. callosus* s.s., *C. venustus*, *C. callidus* y *C. tocantinsi*. La revisión de este grupo es importante ya que corresponde a especies relacionadas a enfermedades zoonóticas en diferentes regiones de América del sur. A nivel sanitario la importancia de determinar una filogenia confiable y que garantice una buena clasificación de las especies, ayuda a delimitar las áreas con mayor potencial de contagio con el fin de tomar las precauciones y medidas necesarias establecidas por las entidades sanitarias.

En este estudio se realizaron varios análisis utilizando diferentes marcadores moleculares y métodos filogenéticos, incluyendo a todas las especies del “complejo”. Se utilizó un gen nuclear (IRBP) y dos mitocondriales (Cit-b y Región control) con el fin de incrementar la sensibilidad de los análisis. Los resultados obtenidos con el gen IRBP fueron poco claros, arrojando politomías en todos los análisis realizados. Incluso al concatenar el gen nuclear con los genes mitocondriales la resolución de las relaciones filogenéticas entre las especies fue muy mala. El mismo resultado se obtuvo aun cuando se implementaron análisis de diferentes como los realizados con los programas BEST y BEAST (Figuras 8 y 9). La falta de resolución del gen IRBP podría explicarse por su tasa de sustitución mucho menor (reflejado por distancias interespecíficas también muy bajas) y su tamaño poblacional efectivo cuatro veces más grande que el del ADN mitocondrial (Palumbi et al., 2001). Considerando el corto tiempo evolutivo transcurrido desde la divergencia de los clados del complejo, los árboles filogenéticos obtenidos con este marcador nuclear podrían revelar una separación incompleta de linaje (en inglés “incomplete lineage sorting”) y retención de polimorfismos ancestrales. Por este motivo, para el resto de la Discusión se descartaron los resultados que involucran el uso de este marcador, que también pueden deberse a la falta de datos en la matriz, ya que no se contaban con todos los genes de todos los terminales utilizados.

Por otro lado, los resultados obtenidos con los genes mitocondriales (Cit-b y Región Control) fueron mucho más informativos aún cuando las topologías de los árboles variaron de acuerdo al método de análisis. Al concatenarlos se obtuvieron mejores resultados con mayores valores de soporte en los nodos e incluso se resolvieron las politomías que se obtuvieron en los análisis con cada marcador en particular. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de árbol de especies (a diferencia de los árboles de genes obtenidos) se obtuvieron resultados contradictorios. Por ejemplo, el programa BEST no logró converger después de 13 millones de generaciones y varios días de corrida. En cambio, con el programa BEAST se obtuvo un árbol de especies y sus tiempos de divergencia luego de 30 millones de generaciones. Para el programa BEST los datos se deben particionar y luego se busca la compatibilidad entre las topologías de cada gen; en cambio, en el programa BEAST se utilizó una búsqueda en base a una matriz concatenada por lo que en realidad se buscó una sola topología y por ello probablemente no se entró en contradicción entre las topologías alternativas del Cit-b y de la Región Control. El resultado obtenido con el programa BEAST es mucho más lógico que el obtenido con el programa BEST (Figuras 8 y 9), ya que es congruente con las topologías obtenidas con los genes individuales. Es por ello que las relaciones filogenéticas mejor soportadas serían las que dividen al complejo en dos grandes clados: el que agrupa a *C. venustus*, *C. moxosensis* y *C. boliviae* y aquel que agrupa a *C. callidus*, *C. tocantinsi* y *C. callosus* s.s.

Estas relaciones resuelven lo que los trabajos previos de otros autores no pudieron, probablemente por no incluir a todas las especies del complejo, por utilizar un solo gen mitocondrial y por incluir muy pocos individuos de cada especie descartando así la variación intraespecífica que es necesaria para la delimitación de especies. En Salazar-Bravo et al. (2001) se utilizó como marcador molecular el gen Cit-b de sólo 4 especies del complejo (*C. venustus*, *C. moxosensis*, *C. boliviae* y *C. callosus* s.s.). Los resultados de sus análisis con MP y ML fueron contradictorios puesto que con MP obtuvieron: (*C. venustus*, (*C. callosus* s.s. (*C. moxosensis* - *C. boliviae*))), mientras que con ML recuperaron: (*C. callosus* s.s., (*C. venustus* (*C. moxosensis* - *C. boliviae*))). Este último resultado es coincidente con lo que se obtiene en los resultados de esta Tesina. Independientemente de la relación entre las especies, en esta Tesina se encuentran también diferencias en cuanto a los tiempos de divergencia en

comparación con Salazar-Bravo et al. (2001). Dichos autores sugirieron que el ancestro común más reciente del complejo tendría aproximadamente 1 millón de años, mientras que aquí se obtiene una antigüedad de 410 mil años (Figura 9). Como ya se mencionara, las diferencias pueden deberse a que dichos autores utilizaron un sólo gen y a que no se encuentran representadas todas las especies del complejo, en cambio, la estimación de esta Tesina tendría mayor precisión al incluir a todas las especies y a dos marcadores mitocondriales.

En otro estudio del mismo grupo de trabajo, Salazar Bravo et al. (2002), agregaron una parte de la Región Control para las mismas 4 especies del complejo. La topología del árbol obtenido con ML es congruente al de esta Tesina, al encontrar la relación (*C. callosus* (*C. venustus* (*C. boliviae*-*C. moxosensis*))). En otro estudio, Dragoo et al. (2003) utilizaron la técnica de AFLP (revela presencia-ausencia de bandas de diferentes regiones del genoma, principalmente nucleares) y obtuvieron resultados contradictorios al obtener la topología (*C. moxosensis* (*C. callosus* (*C. venustus* - *C. boliviae*))) según MP y dos clados según el método de Neighbor joining ((*C. moxosensis* - *C. callosus*) (*C. venustus* - *C. boliviae*)). Estas relaciones son totalmente diferentes a las obtenidas en los trabajos previos que utilizaron Cit-b o Región Control; los resultados de esta Tesina no avalan las relaciones obtenidas por Dragoo et al. (2003).

Almeida et al. (2007) en un estudio que involucró a gran parte de las especies del género, utilizó secuencias de Cit-b y datos citogenéticos de 5 especies del complejo (*C. callosus* s.s., *C. boliviae*, *C. moxosensis*, *C. venustus* y *C. tocantinsi*). Los autores encontraron con MP dos grandes clados (una topología similar a la que se obtuvo en esta Tesina con EB y MP); en uno se resuelven las relaciones filogenéticas del grupo (*C. venustus*, (*C. moxosensis* y *C. boliviae*)), no así con las especies del otro gran clado, ya que *C. callosus* y *C. tocantinsi* no se recuperan como recíprocamente monofiléticas. Con ML los autores encontraron el mismo resultado, pero esta vez *C. callosus* s.s. y *C. tocantinsi* resultaron monofiléticas. En otro estudio similar que comprende a gran parte del género *Calomys*, Haag et al. (2007) analizaron las relaciones entre 4 especies del complejo (*C. callosus* s.s., *C. venustus*, *C. boliviae* y *C. moxosensis*) en base a Cit-b; el resultado de ML arrojó una topología distinta a la de este estudio, dado que establecieron las siguientes relaciones: (*C. venustus*, (*C. callosus* s.s. ((*C. boliviae* - *C. moxosensis*))) Es decir, no agrupó a *C. venustus* con *C. boliviae* y *C. moxosensis*, como

en la mayoría de los estudios que utilizaron ese gen mitocondrial (incluida esta Tesina). En cambio, cuando Haag et al. (2007) utilizaron EB, separaron a *C. boliviae* y *C. moxosensis* como grupos monofiléticos pero se generó una politomia con las otras dos especies incluidas en aquella investigación. En base a la mayoría de los estudios previos y a los resultados de esta Tesina, se considera que esa relación invertida entre *C. venustus* y *C. callosus* s.s. no sería correcta.

En síntesis, las especies que integran el complejo se componen de dos grandes clados, uno que contiene a *C. moxosensis*, *C. boliviae* y *C. venustus*, cuyas relaciones filogenéticas más soportadas serían: (*C. venustus* (*C. moxosensis* - *C. boliviae*)). El otro gran clado contiene a *C. callosus*, *C. callidus* y *C. tocantinsi*; las relaciones filogenéticas entre ellas serían: (*C. callidus* (*C. callosus* - *C. tocantinsi*))

### ***Tiempos de divergencia e implicancias biogeográficas***

Una de las teorías de la Biogeografía sobre la distribución actual de las especies es la de formación de refugios durante los periodos glaciares, si bien los hielos glaciares no llegaron físicamente a la zona, el descenso de temperatura a escala global tuvo repercusiones sobre la biota (proceso de aridización seguido de un incremento de las pasturas) y los nuevos recursos disponibles que podrían haber favorecido a las poblaciones que allí se encontraban adaptándose a un nuevo ambiente, y fueron diferenciándose genéticamente dando origen a nuevas especies estrechamente relacionadas. También es probable que durante los periodos interglaciares se hayan expandido a nuevas regiones encontrando estos nuevos recursos y hábitats para colonizar. Cuando se analiza la Figura 9 que revela los tiempos de divergencia, se puede observar que hace aproximadamente 410 mil años habría ocurrido la divergencia en los dos grandes grupos del complejo: linaje este (*C. callosus*, *C. tocantinsi* y *C. callidus*) y linaje oeste (*C. venustus*, *C. boliviae* y *C. moxosensis*). Ese tiempo se corresponde con un período glacial, denominado Mindel, el cual se extendió desde los 580 a los 390 mil años (Brown & Lomolino, 1998). Es probable que durante este periodo, las poblaciones del ancestro hayan quedado aisladas en al menos dos refugios dando origen a dos linajes/especies diferentes a las iniciales. Los períodos glaciales se caracterizan por procesos de aridización y posiblemente la fragmentación



de hábitats favorables. Durante el periodo interglacial que le siguió, denominado Mindel-Riss, la fisonomía del ambiente ya no era la misma y las dos nuevas especies/linajes se habrían podido expandir hacia nuevos ambientes. Se estima que el ancestro de *C. venustus* se habría separado del ancestro común de *C. moxosensis* y *C. boliviae* hace 280 mil años. Si bien corresponde a un período interglacial, el ancestro en común de todo el linaje oeste podría haber ocupado ambientes fragmentados y la especiación podría haber ocurrido de igual manera en un contexto parapátrico. Es importante destacar que *C. venustus* habita un ambiente de Espinal y Chaco árido, el cual es absolutamente diferente al de *C. boliviae* que habita las selvas de las Yungas o el de *C. moxosensis* que habita llanuras inundables del río Beni en el norte de Bolivia. Cuando comienza en el periodo glacial Riss, hace aproximadamente 200 mil años (Brown & Lomolino, 1998), se habría producido una nueva fragmentación del ambiente permitiendo un proceso de especiación dado que en dicho período se produce la separación entre los ancestros de *C. moxosensis* y *C. boliviae*. Es decir, que en el período interglacial habría habido una expansión del linaje oeste desde la región centro hacia el norte de Argentina como sugiere Salazar-Bravo et al. (2002) y posteriormente desde las Yungas hacia las planicies del norte de Bolivia en un período glacial posterior (ver Figura 10).

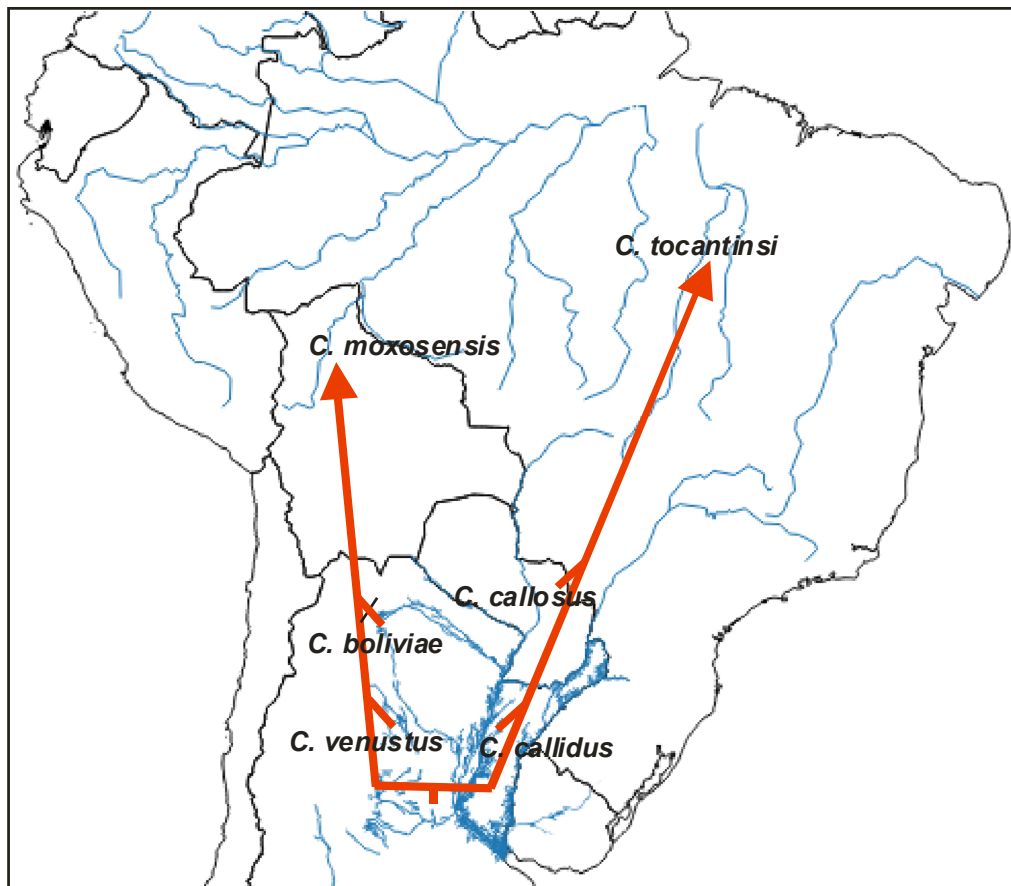
Del segundo gran grupo (linaje este), el ancestro de *C. callidus* se separa del ancestro de *C. callosus* s.s. y *C. tocantinsi* hace 200 mil años (al comienzo del periodo glacial Riss). La colonización de nuevos ambientes también habría ocurrido de sur (Mesopotamia) a norte, Chaco primero (*C. callosus* s.s.) y luego el Cerrado (*C. tocantinsi*). Luego durante el período glacial hace 160 mil años, se habrían separado los ancestros que luego dieron origen a *C. callosus* s.s. y *C. tocantinsi*. Durante el periodo interglacial posterior, denominado Riss-Wurm (que comenzó hace aproximadamente 130 mil años), ya se encontrarían todas las especies que integran al complejo *Calomys callosus* (Figura 9). La distribución que hoy se conoce de estas especies sería una consecuencia de todos estos procesos que se derivaron de los cambios ambientales que sufrió la biota durante el Pleistoceno. Los resultados obtenidos en esta Tesina sobre las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo *Calomys callosus* demuestran que en primera instancia se recuperan dos grandes grupos que se separaron tempranamente de su ancestro en común. Un grupo ubicado

geográficamente hacia el oeste integrado por tres especies. Una de ellas es *C. moxosensis* que se distribuye en el noroeste de Bolivia, específicamente en la sabana denominada Pampa de Moxo del departamento Beni, la cual se caracteriza por la inundación estacional de pastizales y se encuentra aislada de otras áreas de vegetación abierta por parches de bosque húmedo. Posee un cariotipo de  $2n=50$ ,  $FN=66$  y es el reservorio del mamarenavirus Machupo, que produce la Fiebre Hemorrágica Boliviana (BHF) (Salazar-Bravo et al., 2002). La otra especie con la que comparte un ancestro en común reciente es *C. boliviae* que se distribuye al suroeste de Bolivia y noroeste de Argentina en el ecotono del Chaco/Yungas y en toda las Yungas de Argentina. Esta especie posee un  $2n=54$ ,  $FN=66$  y sería el reservorio del hantavirus Laguna Negra que produce el Síndrome Pulmonar por Hantavirus (HPS) (Rivera et al., 2015). Finalmente, *C. venustus* se encuentra asociada al bioma del Espinal y el ecotono con el Chaco árido en el centro de Argentina, posee un  $2n=56$ ,  $FN=66$  y es reservorio del mamarenavirus Latino like; no se conocen los efectos de este virus sobre la salud humana (Gladys Calderón, INEVH, comunicación personal).

Del segundo gran grupo del complejo del cual se estima un ancestro en común de hace 200 mil años, primero se desprende el linaje que formará la especie *C. callidus* que posee una distribución del este de Argentina (Mesopotamia) y ha sido citada para el suroeste de Brasil (Travasso da Rosa et al., 2012; aunque no se ha confirmado de manera fehaciente de que se trate de la misma especie). Habita lugares boscosos húmedos y pastizales, posee un cariotipo de  $2n=48$ ,  $FN=66$  y en Brasil se asocia con el hantavirus Laguna Negra que provoca HPS. Otra especie del complejo es *C. tocantinsi* que tiene su distribución al noreste de Brasil donde habita cerca de ríos en praderas secas del Cerrado y el ecotono con la selva lluviosa amazónica, posee  $2n=46$ ,  $FN=66$ ; hasta ahora no ha sido asociado con ningún virus patógeno. Finalmente, la especie *C. callosus* s.s. es la que posee la mayor distribución geográfica asociada al bioma del Chaco (tanto árido como húmedo) y parches de áreas adyacentes. Vive desde el noreste de Argentina (Formosa) al sureste de Bolivia, por todo el Paraguay y en el suroeste de Brasil, posee un  $2n=50$ ,  $FN=66$  y también es reservorio del hantavirus Laguna Negra que produce HPS (Rivera et al. 2015).

Para concluir, en base a los resultados filogenéticos obtenidos en esta Tesina, se propone que el ancestro en común de todo el complejo habría vivido en la región

central de Argentina, posiblemente en un ambiente chaqueño-mesopotámico; en la Figura 10 se reproduce esquemáticamente como habría sido la dirección geográfica de la especiación. Esta propuesta ya había sido sugerida por Salazar-Bravo et al. (2002) con sólo 4 especies del complejo. Los resultados de esta Tesina, incluyendo a los 6 representantes conocidos del complejo, avalan dicha propuesta, pero permiten inferir el origen geográfico de todo el complejo y cuáles fueron los eventos de especiación que se fueron dando a través del tiempo.



**Figura 10:** Mapa de cómo habría sido la expansión del clado estudiado en esta Tesina.



## **Bibliografía**

## Bibliografía

- Almeida FC, Bonvicino CR, Cordeiro-Estrela P. (2007). Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42: 449-466.
- Anderson S & Yates TL. (2000) A new genus and species of phyllotine rodent from Bolivia. *Journal of Mammalogy* 8: 18–36.
- Bergsten, J. (2005). A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21(2), 163-193.
- Bonvicino, C. R., Oliveira, J. A. D., & Gentile, R. (2010). A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from eastern Brazil. *Zootaxa*, 2336, 19-25.
- Brown JH & Lomolino MV. (1998). *Biogeography*. Sunderland, Massachusetts.
- Braun JK. (1993). Systematic relationships of the tribe Phyllotini (Muridae: Sigmodontinae) of South America. Special Publication Oklahoma Museum of Natural History, University of Oklahoma, 50 pp.
- Calderón G, García J, Pini N, Gardenal C, González-Ittig RE, Ripoll C, Enría D & Levis S. (2010). Isolation of Latino Virus (Arenaviridae: Arenavirus) from *Calomys fecundus* captured in Jujuy Province, northwestern of Argentina. 59th Annual International Conference of the Wildlife Disease Association, 30 de Mayo al 04 de Junio de 2010 en Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina.
- Carrizo, L. V., & Catalano, S. A. (2015). First phylogenetic analysis of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae) combining morphological and molecular data. *Cladistics*, 31(6), 593-620.
- Carroll DS, Mills JN, Montgomery JM, Bausch DG, Blair PJ, Burans JP, Felices V, Gianella A, Iihoshi N, Nichol ST, Olson JG, Rogers DS, Salazar M & Ksiazek TG (2005). Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(1): 42-46.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9(8): 772-772.
- Dragoo JW, Salazar-Bravo J, Layne LJ & Yates TL. (2003). Relationships within the *Calomys callosus* species group based on amplified fragment length polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology* 31(7): 703-713. Drummond AJ & Rambaut A.

- (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Enría D & Levis S. (2004). Zoonosis virales emergentes: las infecciones por hantavirus. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris) 23:595-611.
  - Enría DA, Mills JN, Bausch D, Shieh WJ & Peters CJ. (2011). Arenavirus infections, pp. 449-461. En: *Tropical infectious diseases: Principles, pathogens and practice*, 3rd ed. Guerrant RL, Walker DH & Weller PF (eds). Edinburgh, Saunders Elsevier, v– xxiv + 1-1130 pp
  - Espinoza MB, Lasserre A, Plantanida M & Vitullo AD. (1997). Cytogenetics of vesper mice, *Calomys* (Sigmodontinae): a new karyotype from Puna region and its implication for chromosomal phylogeny. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 53(7): 583-586.
  - Freeman S & Herron JC. (2007). *Evolutionary analysis* (No. QH 366.2. F73 2007). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall 16:629-637.
  - Futuyma DJ. (2003). *Evolution*. Sinauer associates inc. 2:22-39; 8:171-179.
  - Goios A, Pereira L, Bogue M, Macaulay V & Amorim A. (2007). mtDNA phylogeny and evolution of laboratory mouse strains. *Genome Research* 17(3): 293–298.
  - Goloboff PA & Pol D. (2005). Parsimony and Bayesian phylogenetics. *Parsimony, phylogeny, and genomics*, 148-159.
  - Gonzalez-Ittig RE, Theiler GR & Gardenal CN. (2002a). A contribution to the subgeneric systematics of *Oligoryzomys* (Rodentia, Muridae) from Argentina by means of PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology* 30(1):23-33.
  - Gonzalez-Ittig RE, Chiappero MB, Blanco A, Provencal C & Gardenal CN. (2002b). Accurate identification of three cryptic species of rodents of the genus *Calomys* using RAPD-PCR and mitDNA RFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 30(5):425-432.
  - González-Ittig RE & Gardenal CN. (2004). Recent range expansion and low levels of contemporary gene flow in *Calomys musculinus*: its relationship with the emergence and spread of Argentine haemorrhagic fever. *Heredity* 93(6):535-541

- González-Ittig RE, Patton JL & Gardenal CN. (2007). The analysis of cytochrome b nucleotide diversity confirms a recent range expansion in *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae). *Journal of Mammalogy* 88(3):777-783.
- González-Ittig RE, Salazar-Bravo J, Barquez RM & Gardenal CN. (2010). Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South America. *Zoologica Scripta* 39(6):511-526.
- González-Ittig RE, Rivera PC, Levis SC, Calderón GE & Gardenal CN. (2014a). The molecular phylogenetics of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia: Cricetidae) clarifies rodent host-hantavirus associations. *Zoological Journal of the Linnean Society* 171:457-474.
- González-Ittig RE, Kandel N, Levis S, Calderón G, Salazar-Bravo J & Gardenal CN. (2014b). Molecular systematics of the South American rodent *Calomys laucha* (Cricetidae: Sigmodontinae), a reservoir of the Laguna Negra hantavirus. *Canadian Journal of Zoology* 92(12):1093-1098.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W & Gascuel O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3):307-21.
- Haag T, Muschner VC, Freitas LB, Oliveira LFB, Langguth AR & Mattevi MS. (2007). Phylogenetic relationships among species of the genus *Calomys* with emphasis on south American lowland taxa. *Journal of Mammalogy* 88:769-776.
- Hall BG. (2004). *Phylogenetic trees made easy: A how to manual*. Second edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. USA. 221 p.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42:182–92
- Irwin NR, Bayerlova M, Missa O & Martinkova N. (2012). Complex patterns of host switching in New World arenaviruses. *Molecular Ecology* 21(16):4137-4150.
- Jackson AP & Charleston MA. (2004). A cophylogenetic perspective of RNA-virus evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21:45-57.
- Jansa SA & Voss RS. (2000). Phylogenetic studies on Didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7:43–77.



- Johnson MA, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ & Nichol ST. (1997). Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238:115-127.
- Knowles LL & Kubatko LS. (2010). Estimating species trees: an introduction to concepts and models. En: Knowles LL, Kubatko LS (eds). *Estimating species trees: practical and theoretical aspects*. Wiley-Blackwell Hoboken (NJ): p. 1–14.
- Kornilios P. (2017). Polytomies, signal and noise: revisiting the mitochondrial phylogeny and phylogeography of the Eurasian blindsnake species complex (Typhlopidae, Squamata). *Zoological Scripta*, en prensa.
- Kumar S, Stecher G & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and Evolution* 33(7):1870-1874.
- Levis S, Calderón G, Pini N, García J, Sen C & Enría D. (2010). Natural co-infection of *Calomys callosus* rodent host population with the Hantavirus Laguna Negra and Arenavirus Latino in Northwestern Argentina. VIII Conferencia Internacional FRS, HPS y Hantavirus. Atenas, Grecia, 20-22 de mayo de 2010.
- Levis S, García J, Pini N, Calderón G, Ramírez J, Bravo D, St. Jeor S, Ripoll C, Bego M, Lozano E, Barquez R, Ksiazek TG. & Enría D. (2004). Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71:658-663.
- Liu L. (2008). BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics* 24(21):2542-2543.
- Mattevi, MS, Haag T, Oliveira LFB & Langguth AR. (2005). Chromosome characterization of Brazilian species of *Calomys* Waterhouse, 1837 from Amazon, Cerrado and Pampas domains (Rodentia, Sigmodontinae). *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro* 63:175-181.
- Marshall LG. (1979). A model for paleobiogeography of South American cricetine rodents. *Paleobiology* 5(02): 126-132.
- Mills JN. (2006). Biodiversity loss and emerging infectious disease: an example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Biodiversity* 7: 9-17.

- Mills J & Childs JE. (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerging Infectious Disease* 4:529-537.
- Musser GG. & Carleton MD. (1993). Family Muridae. En: *Mammal species of the world*, 2nd ed., 501– 755. Wilson DE and Reeder DM (eds) Washington, DC: Smithsonian Institution Press, xviii + 1,206 pp.
- Musser GG & Carleton MD. (2005). Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (eds), *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*. Vol. 2. 3rd Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Olds N. (1988). A revision of the genus *Calomys* (Rodentia: Muridae). Ph.D. diss., City University of New York.
- Pini N, García J, Sen C, Calderón G, González Ittig RE, Gardenal CN, Jayat P, Ripoll C & Levis S. (2012). Infección natural por arenavirus y hantavirus en roedores silvestres (Cricetidae: Sigmodontinae) de la provincia de Jujuy. II Congreso Latinoamericano de Mastozoología, XXV Jornadas Argentinas de Mastozoología. Lugar: Buenos Aires.
- Plyusnin A & Morzunov SP. (2001). Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Schmaljohn C., Nichol S (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 256: 47-75.
- Palumbi SR, Cipriano F & Hare MP. (2001). Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55:859–868.
- Ramsden C, Holmes EC & Charleston MA. (2009). Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Molecular Biology and Evolution* 26:143-153.
- Reig, O.A. 1986. Diversity pattern and differentiation of High Andean rodents. Pp. 404-439, in: *High altitude tropical biogeography*. Vuillemier F & Monasterio M (eds.). New York: Oxford University Press.
- Ridley M (2004). The Reconstruction of Phylogeny, in: *Evolution*. 3rd edition. Blackwell Publishing company: p.423-47015: 424-449.
- Rivera PC, Gonzalez Ittig RE, Rossi Fraire HJ, Levis S & Gardenal CN. (2007). Molecular identification of species of the genus *Oligoryzomys*, putative reservoirs of

- hantaviruses and phylogenetic relationships among the species present in Argentina. *Zoologica Scripta* 36:231-239.
- Rivera PC, González-Iltig RE & Gardenal CN. (2015). Preferential host switching and its relation with Hantavirus diversification in South America. *Journal of General Virology* 96(9):2531-2542.
  - Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.
  - Salazar-Bravo J, Dragoo J, Tinnin D & Yates T. (2001). Phylogeny and evolution of the neotropical rodent genus *Calomys*: inferences from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20:173-184.
  - Salazar-Bravo J, Dragoo JW, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG & Yates TL. (2002). Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infection, Genetics and Evolution* 1:191-199.
  - Salazar-Bravo (2015) Genus *Calomys* Water house, 1837, pp 481-507. En: *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*. Patton JL, Pardiñas UFJ & D’Elía G (eds). University of Chicago Press.
  - Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - Schmaljohn C & Hjelle B. (1997). Hantavirus: a global disease problem. *Emerging Infectious Disease* 3:95-103.
  - Schmidt HA & von Haeseler A. (2009). Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. En: *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*, Lemey P, Slemi M, Vandamme AM (eds.). Published by Cambridge University Press.
  - Smith MF & Patton JL. (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.
  - Stepan SJ. (1995). Revision of the tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae), with a phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. *Fieldiana Zoology* 146:1-112.

- Swofford DL. (2003). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Travassos da Rosa ES, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, Pereira AS, Elkhoury MR, Santo ED, Lavocat M, Marques AA, Via AVG, Kohl VA, Tercas ACP, D'Andrea P, Bonvicino CR, Lemos ER & Vasconcelos PFC. (2012). Molecular epidemiology of Laguna Negra virus, Mato Grosso state, Brazil. *Emerging Infectious Disease* 18:982-985.
- Weksler M (2003) Phylogeny of neotropical Oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:331-349.
- Zeballos H, Palma E, Marquet PA & González GC. (2014). Phylogenetic relationships of *Calomys sorellus* complex (Rodentia: Cricetidae), with the description of two new species. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)* 4(1):1-23.

## **Material suplementario**

# Material suplementario

## *Extracción salina de ADN con buffer CTAB*

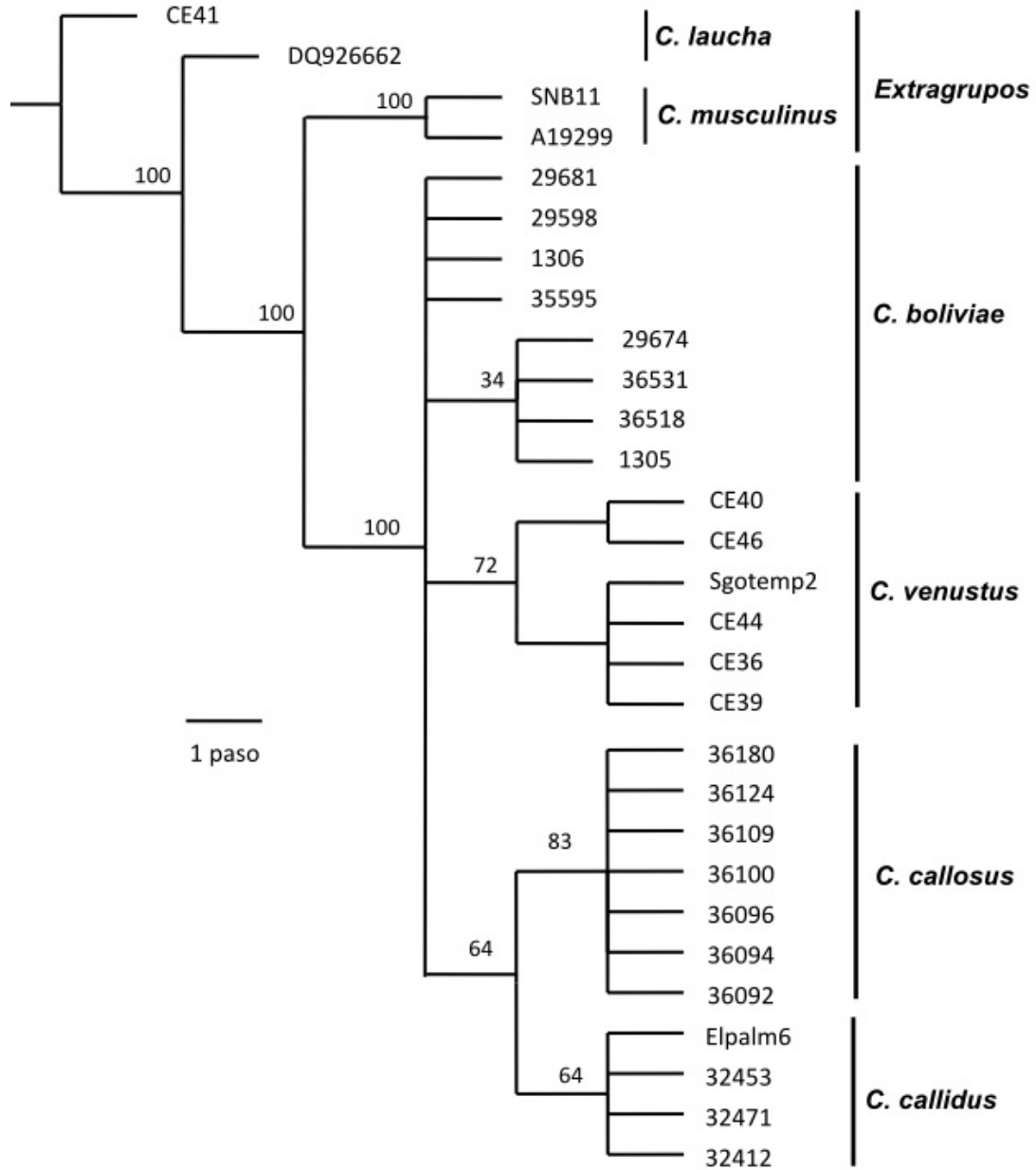
### Homogeneizado

1. Homogeneizar el tejido en 400 µl de buffer CTAB en tubos estériles tipo Eppendorf de 1,5 ml con una tijera esterilizada. Una vez homogeneizado el tejido agregar 7 µl de proteinasa K (20mg/ml) y 200 µl de buffer. Luego incubar a 65° C por 90 min.
2. Finalizada la incubación del homogeneizado agregar 10 µl de ARNasa (200 µg/ml de concentración final) e incubar, nuevamente, a 37° C por 30 min.
3. Agregar un volumen (400 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión durante, aproximadamente, 3min. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min y pasar el sobrenadante a otro tubo tipo Eppendorf.
4. Agrega un volumen (400 µl) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) al tubo con el sobrenadante. Mezclar por aproximadamente 3 min. y centrifugar a 10.000 rpm por 10min. Transferir el sobrenadante a otro tubo tipo Eppendorf.
5. Repetir el punto 4 y centrifugar a 10.000 rpm por 7 min.

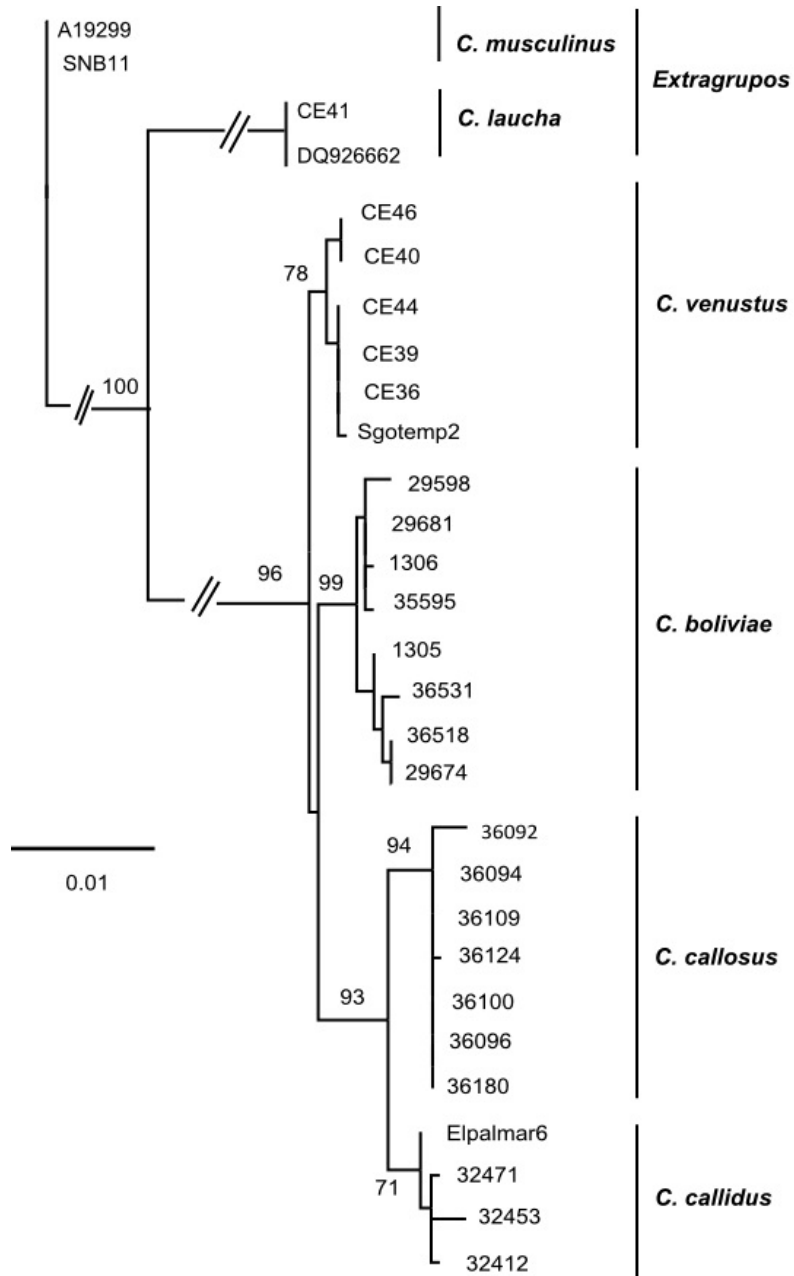
### Precipitado

6. Posteriormente agregar al tubo con el sobrenadante 0,1 volumen de acetato de sodio 3M pH 6 y 2,5 volúmenes (1 ml) de etanol absoluto (100%). Mezclar suavemente (8 veces aproximadamente) hasta que el precipitado de ADN se haga visible. Luego dejar los tubos a -20° C por una hora.
7. Centrifugar en frio a velocidad máxima (13.400 rpm) por 20 min. Aspirar el sobrenadante con cuidado de no tomar el precipitado de ADN o pellet. Lavar con 1ml de etanol 70% y se centrifugar a velocidad máxima (13.400 rpm) por 10 min. Y aspirar el sobrenadante con cuidado, nuevamente, de no tomar el pellet.
8. Dejar secar el pellet.

**Figura S1: Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP del gen mitocondrial Región Control. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría.**

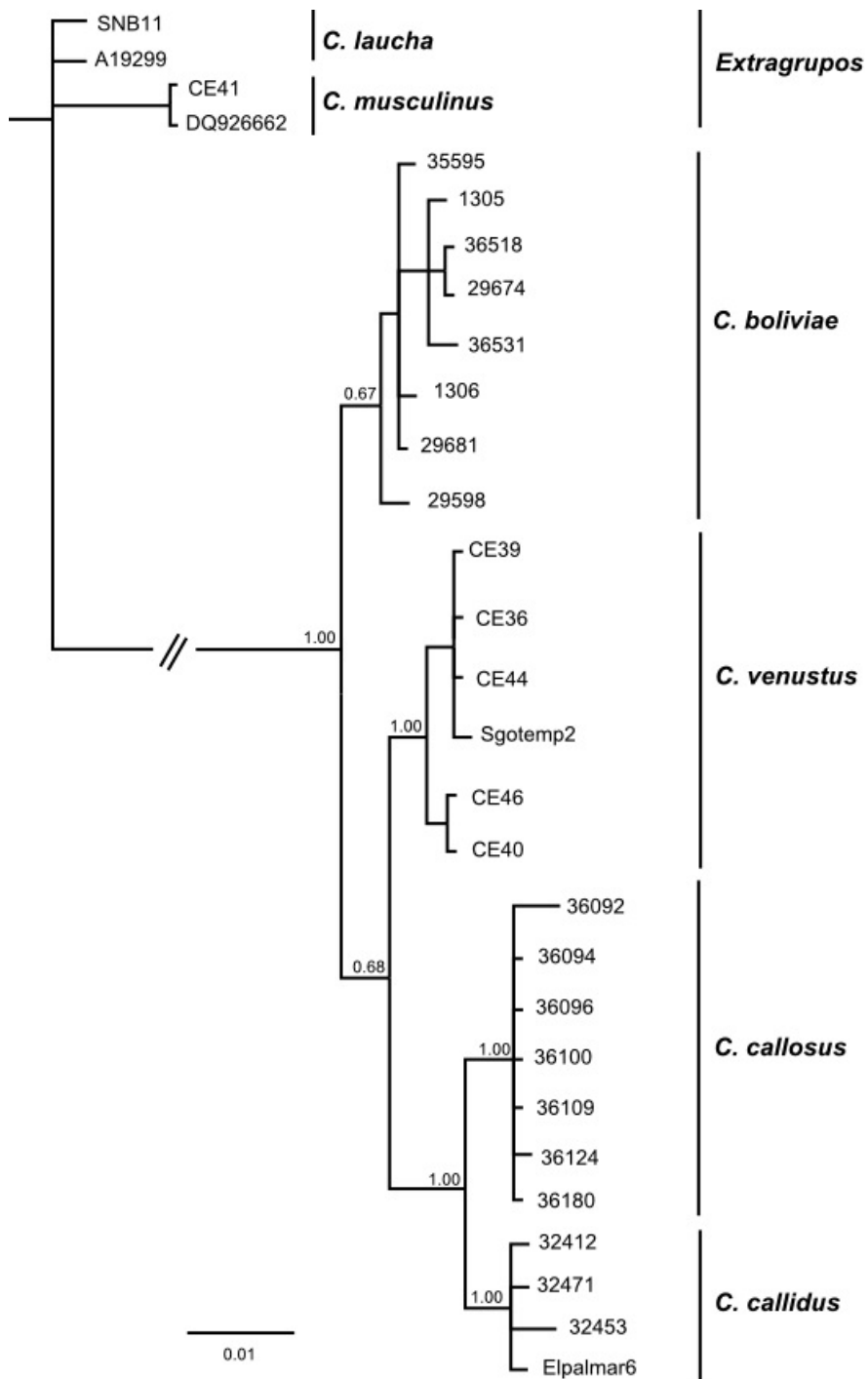


**Figura S2: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de ML del gen mitocondrial Región Control. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría.**

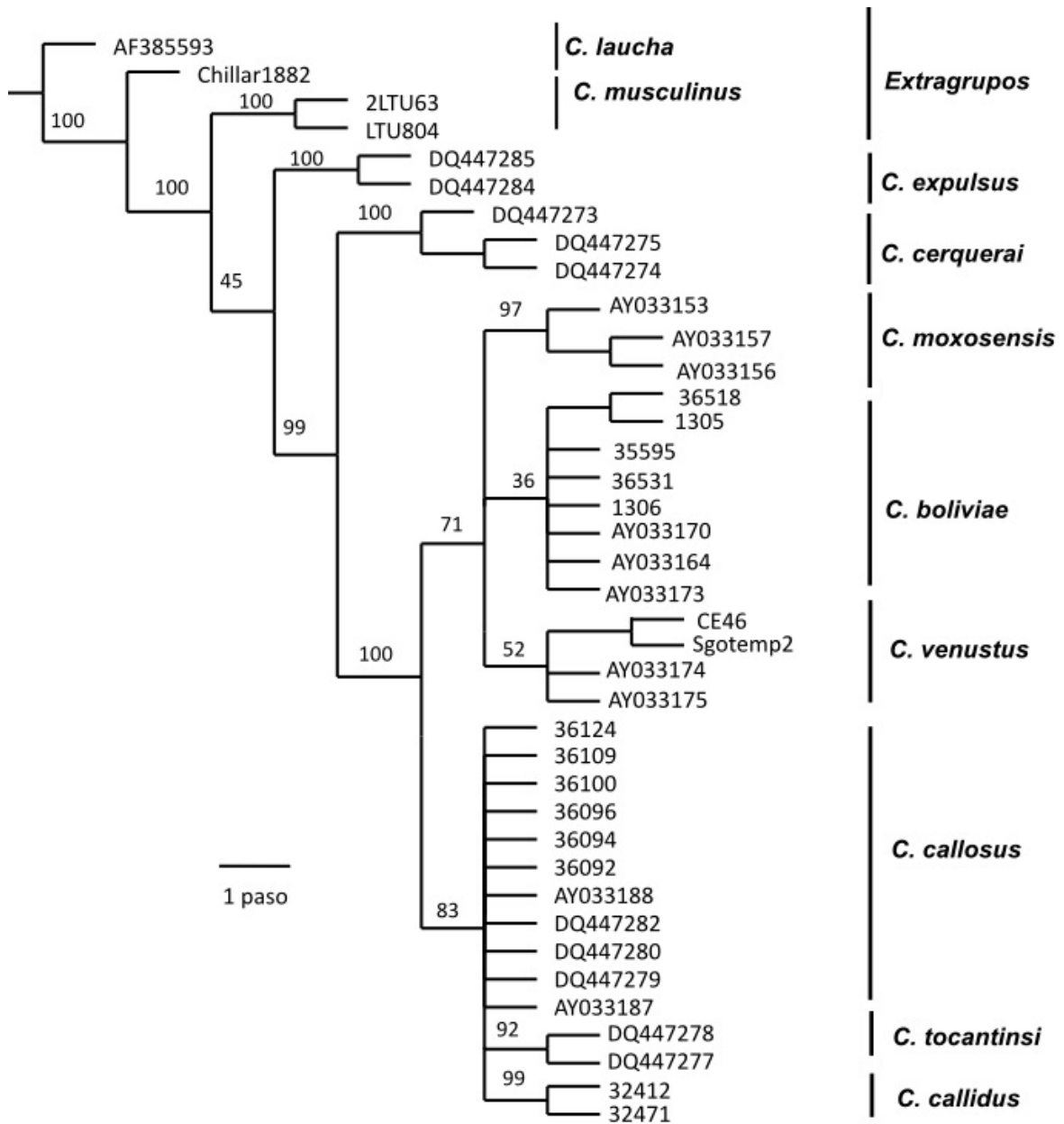




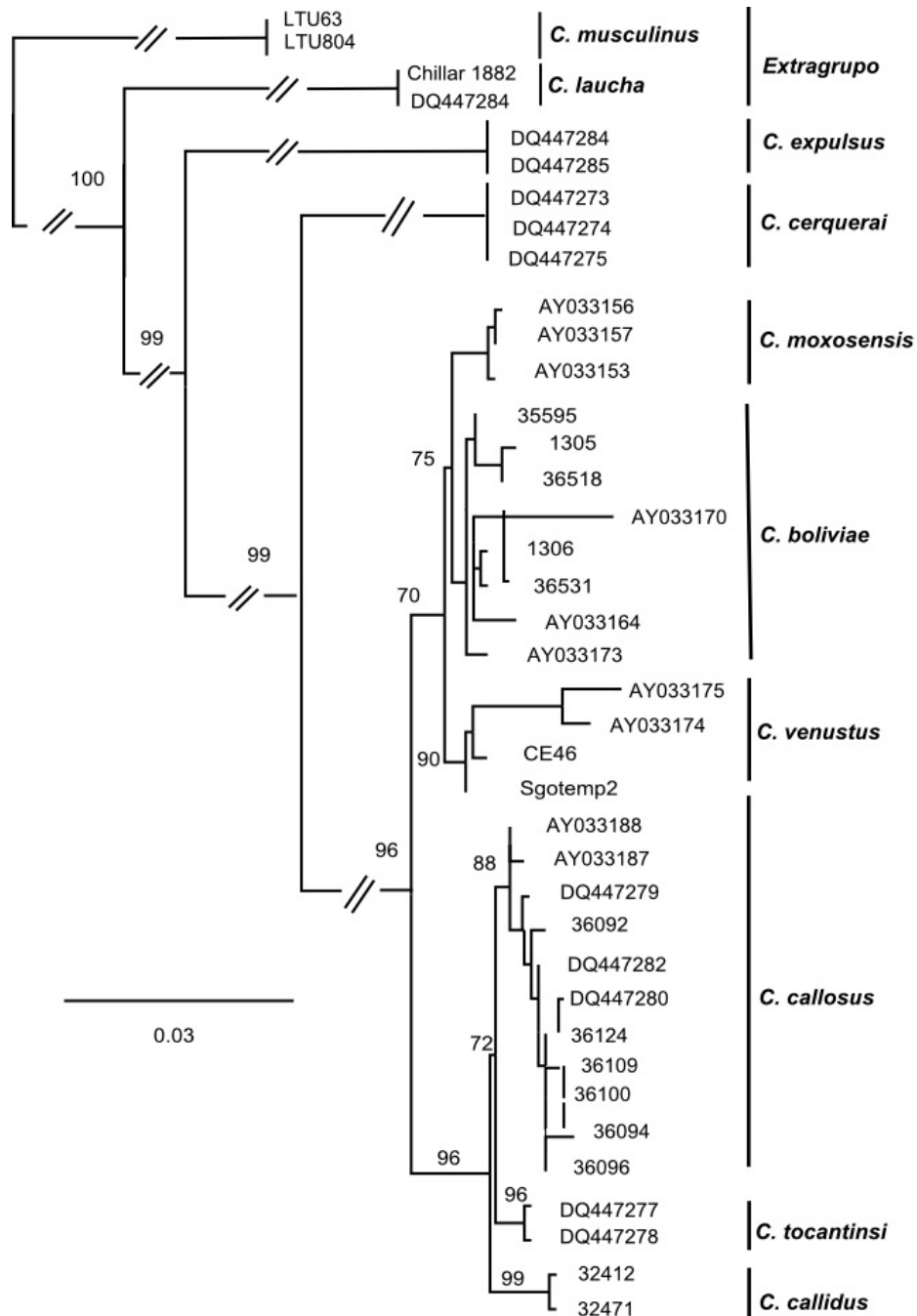
**Figura S3: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de EB del gen mitocondrial Región Control.**



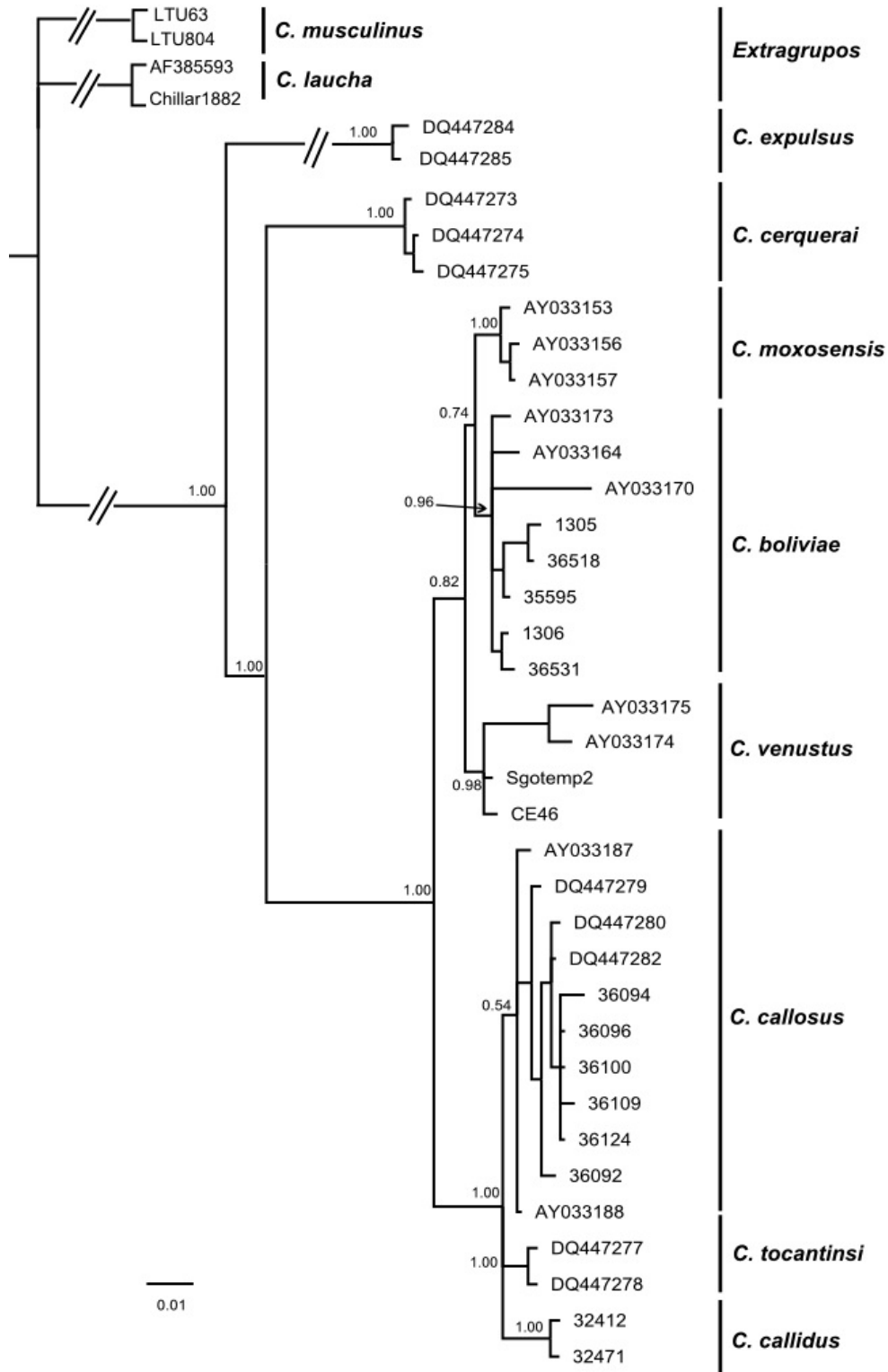
**Figura S4: Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP del gen mitocondrial *Cit-b*. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría**



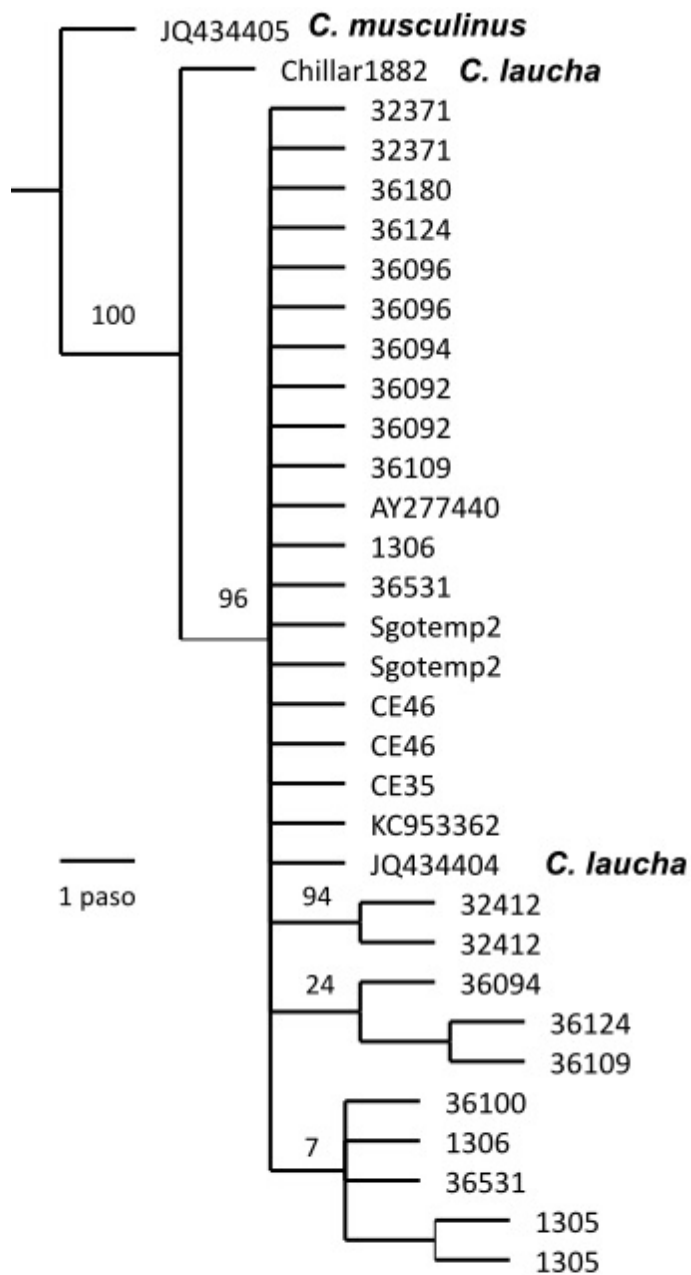
**Figura S5: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de ML del gen mitocondrial *Cit-b*. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría.**



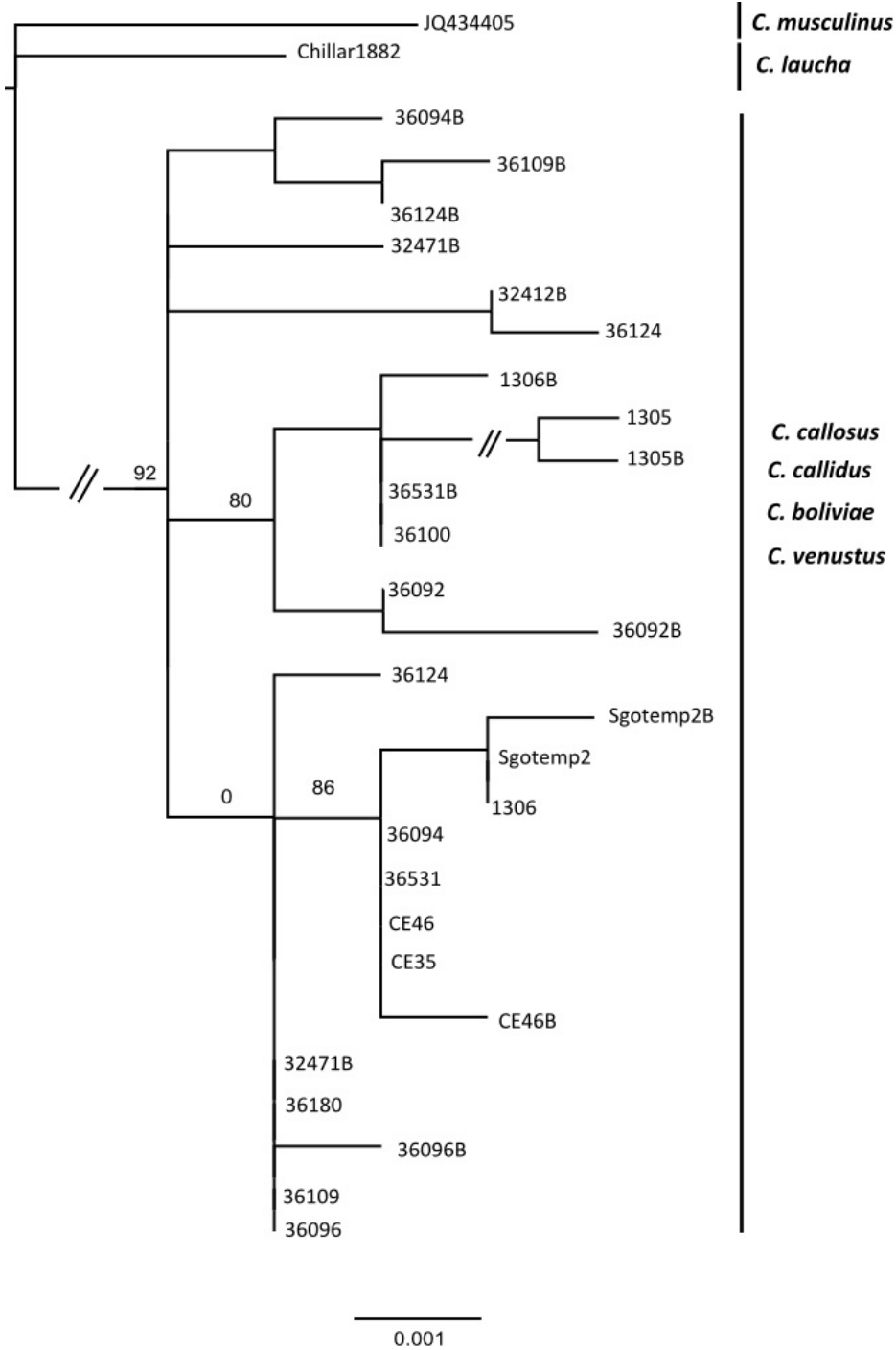
**Figura S6: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de EB del gen mitocondrial *Cit-b*.**



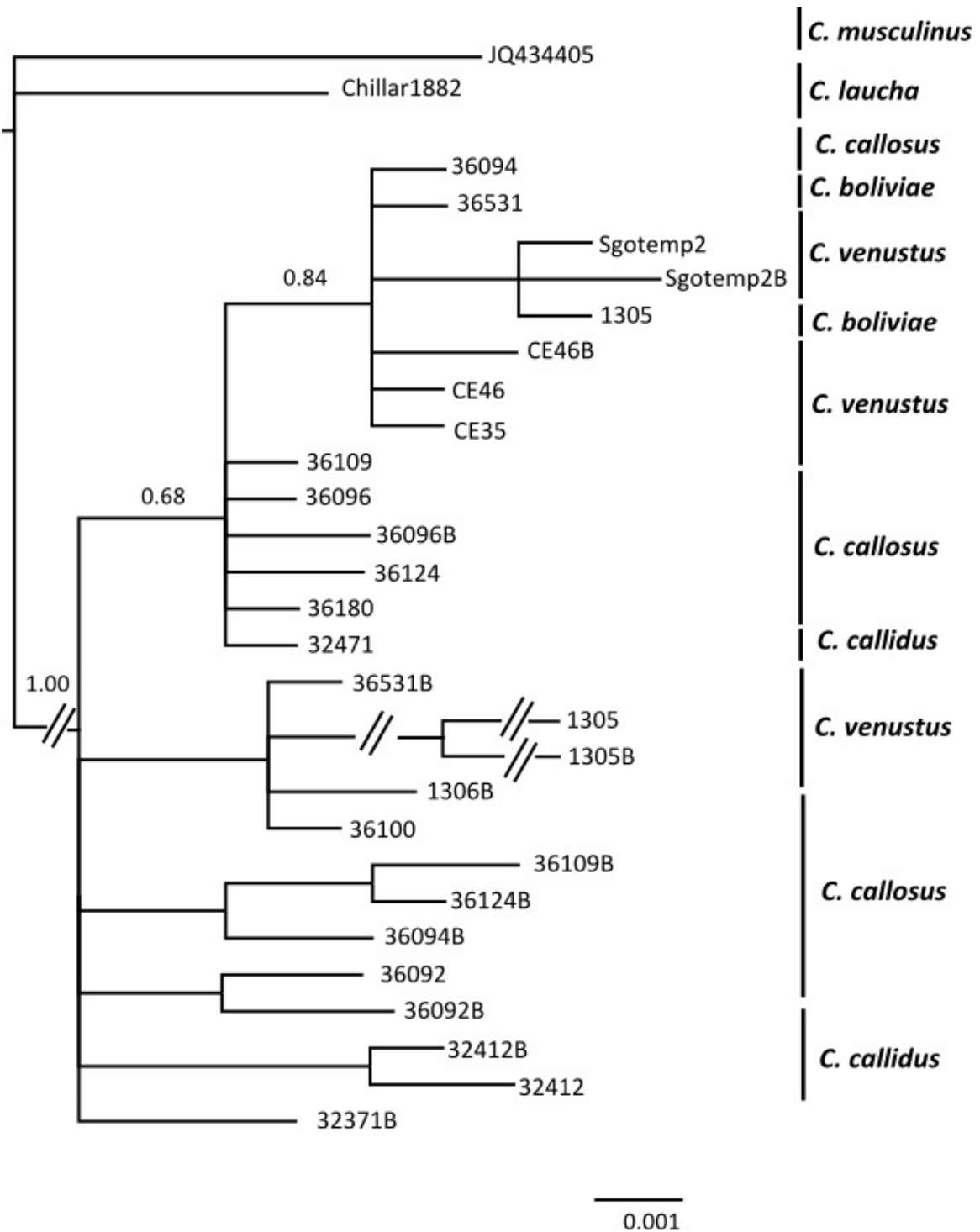
**Figura S7: Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP del gen nuclear IRBP. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría**



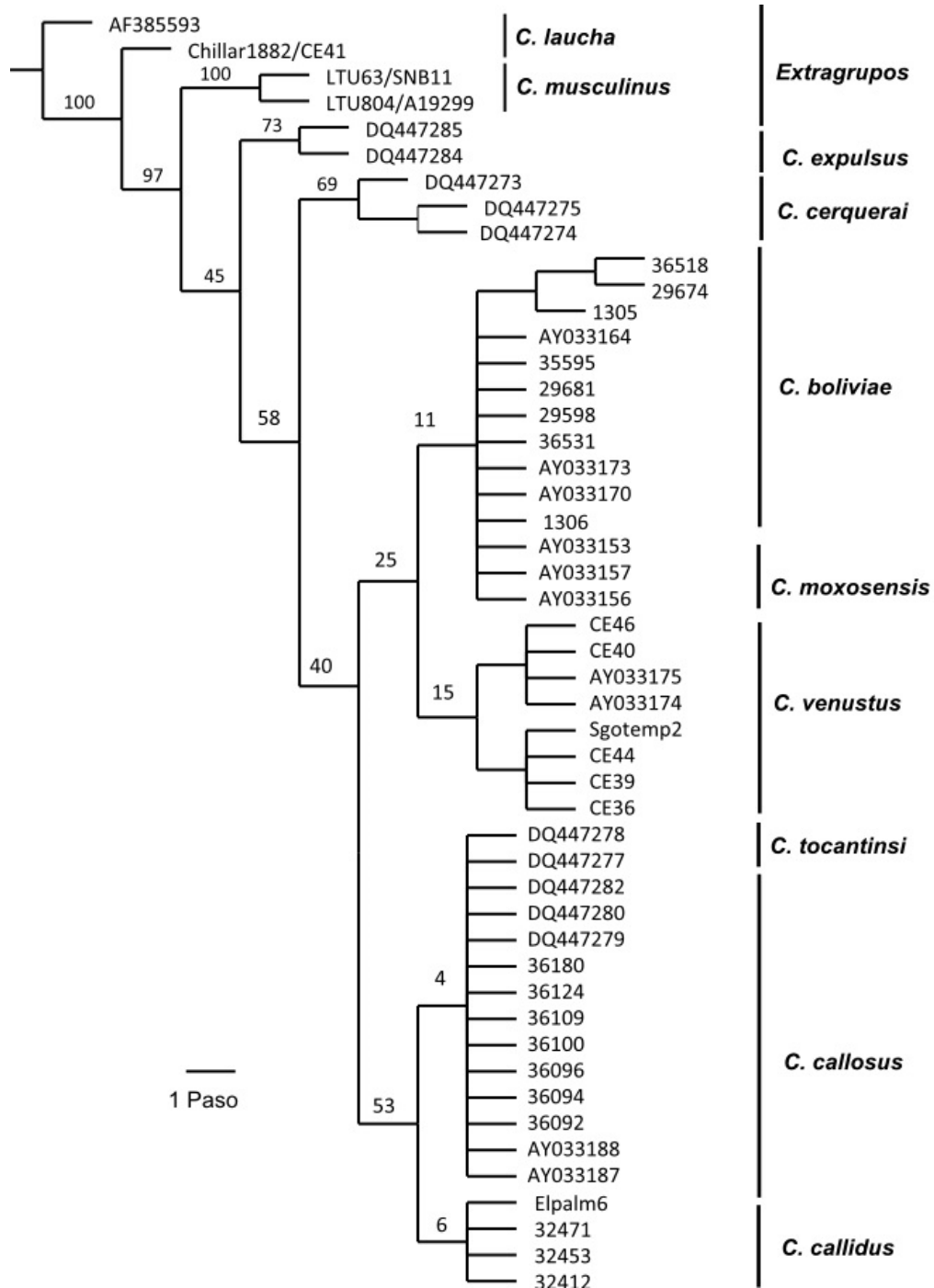
**Figura S8: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de ML del gen nuclear IRBP. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría.**



**Figura S9: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de EB del gen nuclear IRBP.**

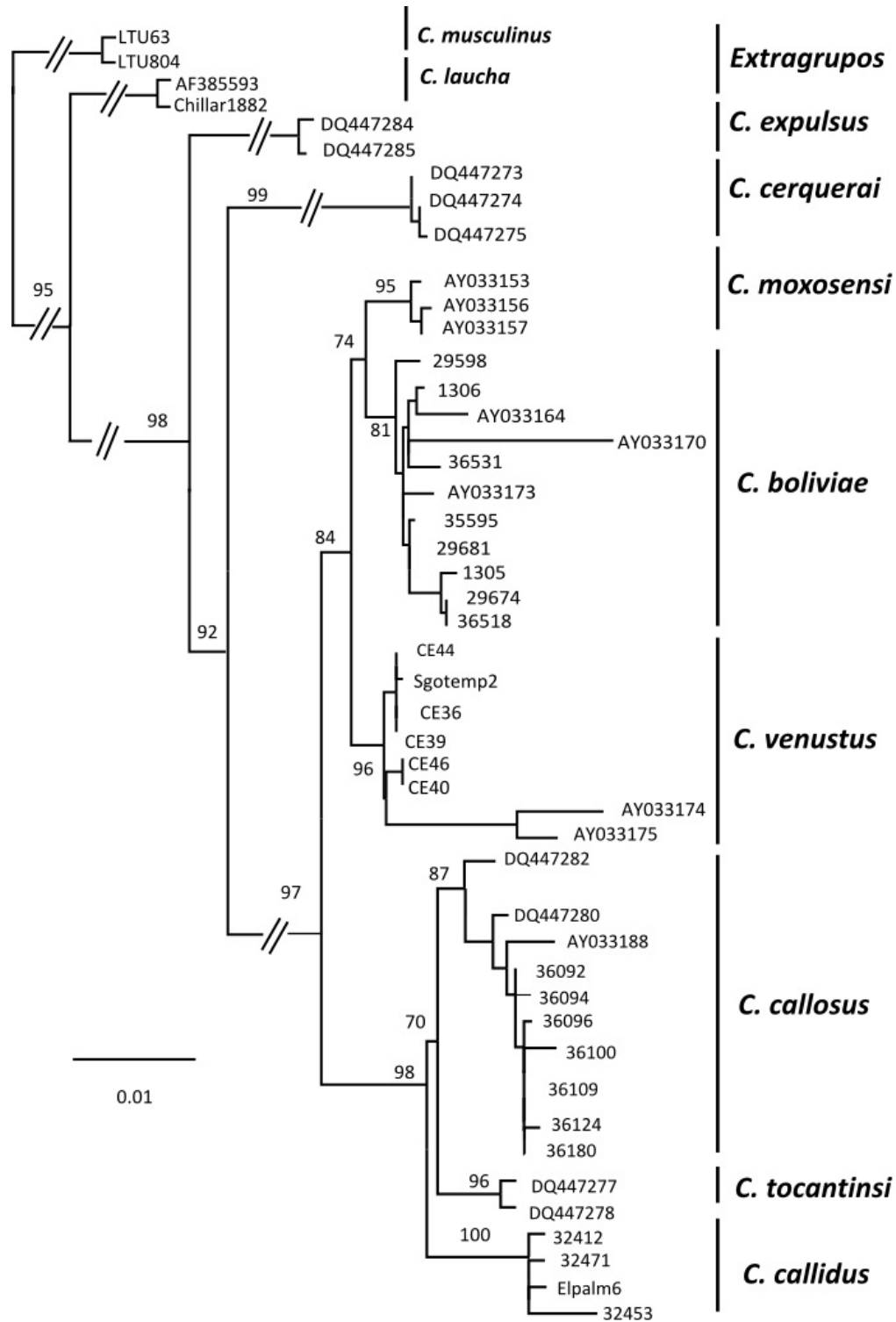


**Figura S10: Árbol consenso estricto obtenido con el análisis de MP con los genes Región control y Cit-b concatenados. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría**

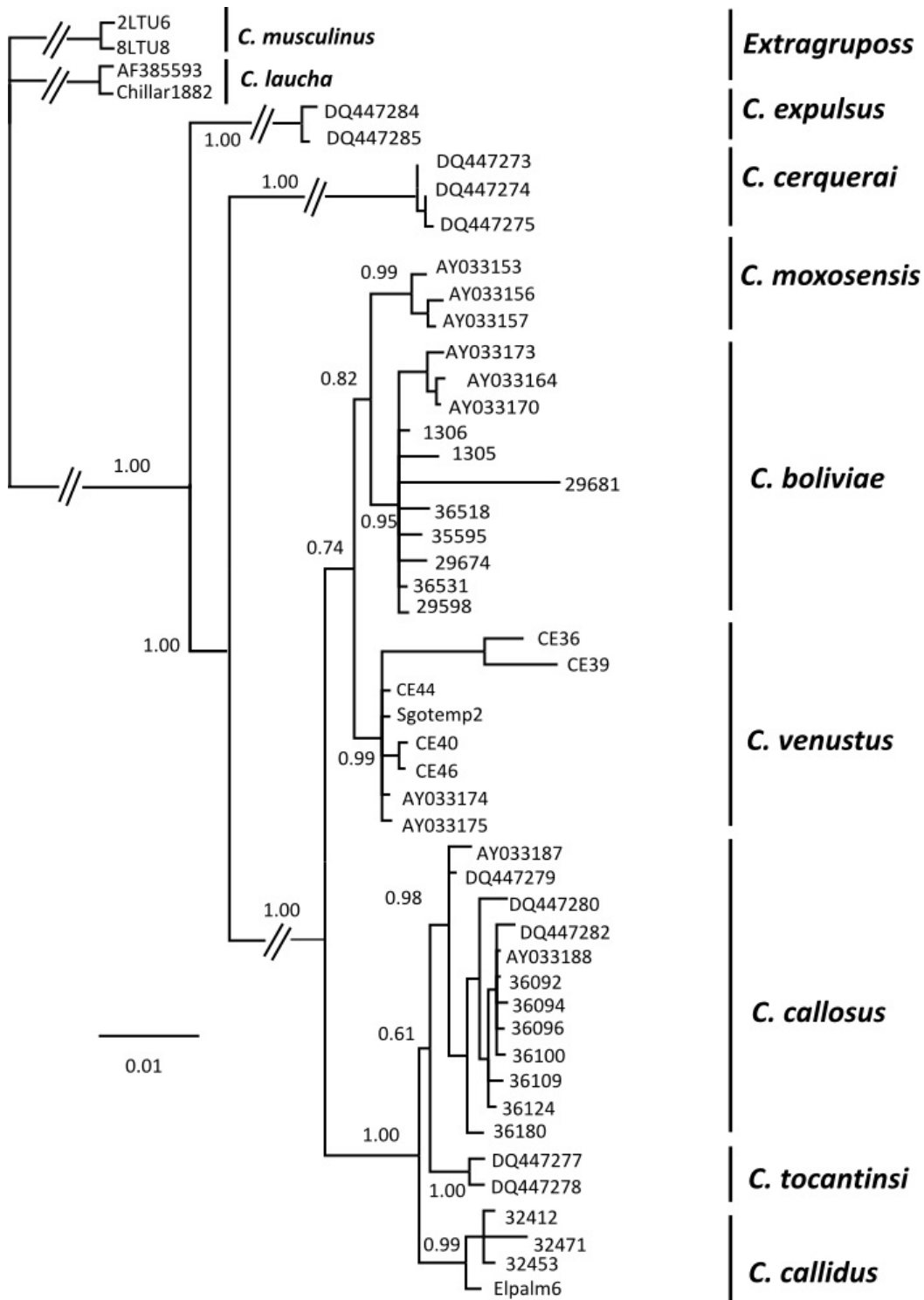




**Figura S11: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de ML con los genes Región control y Cit-b concatenados. Se agregan los valores de soporte de árbol consenso de mayoría.**



**Figura S12: Árbol de mayor probabilidad obtenido con el análisis de EB con los genes Región control y Cit-b concatenados.**



**Figura S13: Árbol consenso de mayoría obtenido con el análisis de EB con los genes Región control, Cit-b e IRBP concatenados con el programa BEST.**

