

Universidad Nacional de Córdoba



Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de grado para optar por el título de Bióloga

Sistemática molecular del complejo *Phyllotis xanthopygus* con énfasis en las poblaciones de la provincia de Córdoba

Tesinista: Victoria Vaccaro

Firma: 

Director: Dr. Raúl E. González Ittig

Firma: 

Lugar de trabajo: Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución

Tesina de grado para optar por el título de Bióloga

**Sistemática molecular del complejo *Phyllotis xanthopygus*
con énfasis en las poblaciones de la provincia de Córdoba**

Tesinista: Victoria Vaccaro

Director: Dr. Raúl E. González Ittig

Tribunal examinador

Dra. Marina B. Chiappero

Firma: .....

Dra. M. Cristina Acosta

Firma: .....

Dra. Noelia S. Vera

Firma: .....

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 16/12/2021

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Córdoba que me dio la oportunidad de formarme en esta carrera.

A mi director Raúl y la cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución por permitirme llevar a cabo mi tesina en el contexto actual, de manera virtual. Por la predisposición y por todo lo aprendido en este trayecto, que es un montón.

A todos aquellos profesores que con la pasión que enseñan conmueven y dejan su marca.

A mi familia un enorme agradecimiento por el apoyo incondicional en mi decisión de comenzar esta carrera y por estar en cada una de las etapas, las buenas y no tan buenas.

A mis amigos que conocí durante la carrera por los consejos, mates, apuntes compartidos, salidas de campo, días de estudio y de catarsis. No fue fácil, pero lo estamos logrando. A mi novio por mostrarme que puedo, por alentarme siempre a seguir y aconsejarme.

Victoria

Índice

Resumen	5
Palabras clave	5
Introducción	6
1. Clasificación y filogenias.....	6
1.1.Métodos de reconstrucción filogenética	8
1.1.1. Máxima Parsimonia (MP).....	8
1.1.2. Máxima Verosimilitud (ML por sus siglas en inglés)...9	
1.1.3. Reconstrucción por Inferencia Bayesiana (IB)	9
2. Conceptos de especies y Métodos de delimitación.....	10
3. Características del género <i>Phyllotis</i>	11
3.1. <i>Phyllotis xanthopygus</i> (Waterhouse 1837)	12
Objetivos	14
Materiales y Métodos	15
1. Análisis filogenéticos	15
2. Delimitación de especies	21
3. Tiempos de divergencia.....	21
Resultados	22
1. Análisis filogenéticos	22
2. Delimitación de especies	25
3. Tiempos de divergencia.....	27
Discusión	28
Bibliografía	32

Resumen

Phyllotis xanthopygus (Waterhouse 1837) ha sido considerada la especie con mayor rango de distribución del género, pudiéndose encontrar poblaciones desde el centro de Perú hasta el sur de Argentina y Chile. Actualmente y gracias a estudios previos de sistemática molecular, se la reconoce como un complejo de especies crípticas que abarca ocho clados principales (aún hay controversias acerca de las relaciones filogenéticas entre ellos), algunos de los cuales tienen nombres formales: *P. bonariensis*, *P. caprinus*, *P. limatus*, *P. vaccarum*, *P. xanthopygus*, *P. posticalis*/*P. rupestris*, *P. pehuenche* y *Phyllotis* sp.1. Este último clado se definió en base a individuos de Pampa de Achala en la provincia de Córdoba; se encuentra diferenciado tanto geográfica como genéticamente del resto de los clados y se lo considera restringido a zonas de gran altura (por encima de los 2000 m.s.n.m.) de las Sierras Grandes. En 2016 se capturaron dos ejemplares catalogados en base a su morfología externa como pertenecientes al género *Phyllotis* en roquedales rodeados de pastizal de altura dentro de la Reserva Natural Vaquerías ubicada en el departamento de Punilla en las Sierras Chicas de Córdoba. Con el fin de confirmar si pertenecen a este género y si pertenecen a alguno de los clados del complejo *P. xanthopygus*, llevamos a cabo dos análisis filogenéticos (usando máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana) a partir de secuencias del gen citocromo b. En el primer análisis, los resultados mostraron que los individuos de la Reserva efectivamente corresponden al género *Phyllotis*. Con el segundo análisis, se pudo confirmar que forman parte del clado *Phyllotis* sp. 1, por lo que el mismo ya no debería considerarse como restringido a zonas de mayores alturas. Además, mediante análisis de delimitación de especies utilizando los métodos distancia genética Kimura-2 parámetros (K2P), “Bayesian implementation of the Poisson tree processes (bPTP)” y “generalized mixed Yule-coalescent (GMYC)” demostramos que este clado es un linaje independiente y que debería considerarse como una especie válida, haciendo énfasis en la necesidad de hacer más estudios de morfología cuantitativa para su reconocimiento formal. También se calcularon los tiempos de divergencia entre los ocho clados del complejo *P. xanthopygus*, en donde se observó que el ancestro común más reciente del complejo tendría 3,81 millones de años y particularmente el del clado *Phyllotis* sp. 1 tendría 480 mil años.

Palabras clave: complejo *Phyllotis xanthopygus*, gen Cit-b, reconstrucción filogenética, delimitación de especies, Córdoba, divergencia

Introducción

1. Clasificación y filogenias

El análisis filogenético, es decir, el estudio de las relaciones entre especies, históricamente se ha asociado con la clasificación y denominación de organismos. En el siglo XVIII, el botánico sueco Carl von Linné (1707-1778) introdujo un sistema de clasificación que fue adoptado entonces y que hoy continúa en uso. Consiste en una nomenclatura binomial, es decir, un sistema de nombres de dos partes que consta de un nombre de género y un epíteto específico. Propuso además un sistema jerárquico de agrupación de especies en el que existen grupos anidados dentro de grupos más grandes (como géneros anidados dentro de familias). Los niveles de clasificación se denominan categorías taxonómicas, mientras que un grupo particular de organismos asignados a una categoría es un taxón (plural: taxa). Es importante destacar que, para esa época, los naturalistas europeos creían que Dios había creado a las especies de acuerdo con un esquema ordenado y, por lo tanto, era un trabajo de gran devoción crear un sistema para descubrir el “plan de la creación” describiendo una clasificación “natural”. Es por esto que Linné usó para la clasificación características que agrupaban o aproximaban a distintos grupos de organismos según el esquema creativo de Dios, sin utilizar un marco evolutivo.

La clasificación adquirió un significado completamente diferente partir de la publicación de “El Origen de Las Especies” en 1859. Allí Charles Darwin propuso, luego de 20 años de innumerables observaciones y colecta de evidencia, que una especie ancestral puede dividirse en dos especies descendientes, las cuales en un principio son muy similares entre sí, pero que divergen, es decir, acumulan diferencias con el tiempo. Cada una de esas especies, a su vez, puede dividirse y divergir para producir dos especies descendientes, y el proceso puede repetirse una y otra vez a lo largo de la historia de la vida. Darwin entonces aventuró que todas las especies de organismos descendieron, por la repetición interminable de tales eventos, a lo largo de grandes períodos de tiempo, de un solo ancestro común: el ancestro universal de toda la vida. En palabras de Darwin, todas las especies, existentes y extintas, forman un gran "árbol de la vida" o árbol filogenético (Futuyma, 2005).

Actualmente, muchos sistemáticos consideran que el nacimiento de la práctica moderna para inferir relaciones filogenéticas se dio gracias al entomólogo alemán Willi Hennig (1966), el cual, a través de la influencia de otros investigadores como Haeckel,

Zimmerman y Neaf, desarrolló lo que hoy se conoce como Sistemática Filogenética a partir de cinco ideas básicas: (1) Las relaciones que proporcionan la cohesión de organismos vivos y extintos son relaciones genealógicas. (2) Estas relaciones existen para los individuos dentro de las poblaciones, las poblaciones dentro de las especies y entre las propias especies. (3) Todos los demás tipos de relaciones (por ejemplo, similitud, ecología) tienen la máxima relevancia cuando se entienden dentro del contexto de la ascendencia genealógica. (4) La ascendencia genealógica entre especies puede recuperarse buscando caracteres particulares (innovaciones evolutivas, sinapomorfías) que documenten estas relaciones. (5) De las formas posibles de clasificar organismos, el mejor sistema es aquel que refleja exactamente las relaciones genealógicas de las especies clasificadas.

Desde entonces, la filogenética ha proporcionado una herramienta que permite a los investigadores ubicar dentro del contexto histórico sus observaciones acerca de la descendencia y descubrir aquellos factores históricos y proximales que contribuyen a las mismas. Se han desarrollado métodos que prueban las hipótesis de la descendencia de especies y han dado como resultado árboles filogenéticos rigurosamente probados. Las topologías de los árboles resultantes dependen principalmente de dos procesos: cladogénesis, es decir, separación de un linaje en dos o más ramas gracias a procesos de evolución divergente y anagénesis, el cual refiere a la evolución (acumulación de cambios) dentro de un linaje a través de fenómenos genético-poblacionales (Wiley, 2011). Existe un tercer proceso menos frecuente denominado evolución reticular, el cual refiere a hibridaciones que ocurren entre taxa y a la transferencia lateral de genes (Futuyma, 2005). Estos árboles forman la base del conocimiento para los científicos que van desde la investigación de la dinámica macro evolutiva de la especiación y extinción hasta el estudio de la distribución de determinadas características entre grupos de organismos.

Cuando el árbol representa el patrón evolutivo de un grupo de especies y es construido en base a varios genes, se denomina árbol de especies. En cambio, cuando es construido en base a un solo gen, se denomina árbol de genes y representa referencias acerca de las relaciones históricas entre distintas variantes en las secuencias de un gen. Los árboles de genes pueden diferir de los árboles de especies por varias causas; como por ejemplo la transferencia lateral de genes, la hibridación o duplicación génica que pueden hacer que la historia de cada gen difiera de la historia evolutiva de las especies (Knowles & Kubatko, 2010; Futuyma, 2005).

Para poder realizar una reconstrucción filogenética, se construyen matrices utilizando caracteres que son propiedades que varían entre los taxa considerados. Dichas variantes son conocidas como estados. Los caracteres filogenéticamente informativos poseen dos o más estados. Algunos de los caracteres más utilizados incluyen características morfológicas externas e internas, diferencias en comportamientos, estructura celular, cromosómica y bioquímica. Además, gracias al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, actualmente se utilizan secuencias de ADN, como por ejemplo el gen citocromo-b, en donde la presencia de las distintas bases (A, T, C o G) en determinado sitio de la secuencia es considerado un carácter (Futuyma, 2005).

Las matrices de caracteres se pueden analizar bajo distintos algoritmos según diferentes métodos, que pueden ser los basados en Máxima Parsimonia o los llamados probabilísticos como la Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud. A continuación, se describe brevemente cada uno de ellos.

1.1. Métodos de reconstrucción filogenética

1.1.1. Máxima Parsimonia (MP)

Los científicos y filósofos utilizan el concepto de parsimonia generalmente atribuida a William de Ockham (1285-1347) el cual, de manera resumida, consta de que la explicación más simple o que requiere la menor cantidad de supuestos no documentados, debe preferirse frente a las hipótesis más complejas que requieren más supuestos para los cuales falta evidencia. En el análisis filogenético, el principio sugiere que entre los diversos árboles filogenéticos que se pueden obtener para un grupo de taxa, la mejor estimación de la verdadera filogenia es la que obliga a postular la menor cantidad de cambios evolutivos. Este método se encuentra entre los más simples y es uno de los más utilizados (Futuyma, 2005).

Para el análisis, la búsqueda del árbol más parsimonioso puede realizarse en base a distintas estrategias entre las que se encuentran: búsqueda exhaustiva, búsqueda por “Branch and Bound”, búsqueda heurística (Wiley, 2011) y por “Tree bisection reconnection” (Goloboff et al., 2008).

Con el fin de colocar intervalos de confianza en las filogenias, existe un método estadístico conocido como “bootstrap”. El mismo consiste en volver a muestrear puntos de los propios datos, con reemplazo (algunos caracteres estarán más de una vez y otros no estarán), para crear una serie de muestras del mismo tamaño que los datos originales

(pseudoréplicas). Se analiza cada una de ellas y se toma la variación entre las estimaciones resultantes para indicar el tamaño del error involucrado en hacer estimaciones a partir de los datos originales (Felsenstein, 1985).

A partir del árbol consenso estricto obtenido por el método de MP y a través del método de bootstrap puede obtenerse el árbol de consenso de mayoría que muestre todos los grupos monofiléticos inferidos que ocurrieron en la mayoría de las muestras de bootstrap. Se propone en general que si una rama aparece en el 70% de los árboles ese nodo es confiable (Hillis & Bull, 1993).

1.1.2. Máxima Verosimilitud (ML por sus siglas en inglés)

La probabilidad de que un evento que sucedió en el pasado produzca un resultado específico se denomina Verosimilitud. En los métodos de reconstrucción filogenética bajo este principio, se prefiere el árbol que tiene la mayor probabilidad de producir los datos que se observan dado un modelo específico de evolución que debe definirse antes del análisis (Wiley, 2011).

Los distintos modelos de evolución están dados por las diferencias entre pares de secuencias y considerando que las probabilidades de que ocurran cambios en una base por otra pueden no ser constantes. Así, por ejemplo, puede ocurrir que haya diferencias en tasas de transición y transversión, que una sea más probable que la otra; también puede haber diferencias en las frecuencias de las bases o bien, pueden ser iguales. Actualmente, uno de los softwares utilizados (aunque no es el único existente) para la elección del modelo dado un set de datos es jModeltest 2, el cual, cuenta con un conjunto de 1624 modelos posibles (Darriba et al., 2012).

1.1.3. Reconstrucción por Inferencia Bayesiana (IB)

Bajo este nombre se agrupan una serie de métodos que intentan clasificar a los especímenes utilizando los principios de la estadística bayesiana. Esta rama de la estadística fue desarrollada originalmente por el reverendo Thomas Bayes (1702-1761) y consiste en que la probabilidad de un determinado árbol filogenético (tree) dadas las secuencias de ADN observadas (data), es igual a la probabilidad del árbol (con un cierto número de clados y agrupamientos) por la probabilidad de los datos dado ese árbol, sobre la probabilidad total de los datos.

El análisis bayesiano utiliza cálculos de verosimilitud, pero a diferencia de ML, estima la probabilidad de la topología del árbol dados los datos y el modelo. Lo hace calculando una probabilidad posterior que puede ser interpretada como la probabilidad de que el árbol sea el verdadero; por lo que, en este tipo de técnicas, debe elegirse como mejor estimación de la filogenia aquel árbol con la probabilidad posterior más alta (Huelsenbeck et al., 2001).

La probabilidad posterior implica una suma de todos los árboles en conjunto y, para cada árbol, la integración de todas las combinaciones posibles de longitud de rama y valores de los parámetros del modelo de sustitución. Es por esto que el método utiliza el algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) que hace factible computacionalmente la integración de las probabilidades posteriores. Utiliza un mecanismo que consiste en generar modificaciones graduales desde un punto de partida (idealmente, elegido al azar), y alternativamente cambia algunos valores de parámetros (por ejemplo, topología, longitudes de rama, parámetros de sustitución), estocásticamente y aperiódicamente. La cadena de Markov avanza entonces hasta que alcanza un estado estacionario. Si la cadena de Markov es irreducible (es decir, es posible que la cadena visite todos los conjuntos posibles de parámetros y topologías de árbol), su estado estacionario converge con la distribución de probabilidad posterior conjunta de los parámetros que se modifican (Li et al., 2000; Goloboff & Pol 2005).

2. Conceptos de Especie y Métodos de delimitación

Las especies son una de las unidades básicas para comparar en casi todos los campos de la biología, desde la anatomía hasta el comportamiento, el desarrollo, la ecología, la evolución, la genética, la biología molecular, la paleontología, la fisiología y la sistemática. Sin embargo, el concepto de especie siempre ha sido un tema de controversia en la clasificación debido a lo difícil que resulta marcar una frontera entre distintas especies, las cualidades que las definen y las características propias de cada una de ellas (Aldhebiani, 2018). Actualmente, existen al menos 22 conceptos y probablemente ninguno de éstos sea suficiente para todos los contextos en los que se utiliza un concepto de especie (Mayden, 1997). A los fines de la presente Tesina enmarcada en el campo de la sistemática molecular y a la metodología propuesta, se desarrollarán dos de ellos, el concepto genético y filogenético.

El concepto genético de especie fue propuesto por Dobzhansky (1950) y Mayr (1969) y podría definirse como una medida de las diferencias genéticas que se utiliza para inferir el aislamiento reproductivo y la independencia evolutiva (Mayden, 1997). Uno de los desafíos para este concepto es la determinación de la diferenciación genética necesaria para distinguir entre dos especies putativas. Bradley & Baker (2001) propusieron que los valores de distancia genética <2% indican variación intraespecífica; los valores entre 2 y 11% tienen una alta probabilidad de ser indicativos de poblaciones conespecíficas o especies válidas y merecen un estudio adicional sobre el estado específico; y los valores >11% indican especies válidas.

Por otro lado, el concepto filogenético de especie las define como las unidades más pequeñas de las que se pueden inferir de forma fiable relaciones filogenéticas. Para este concepto se pueden utilizar diferentes métodos de delimitación de especies. Uno de ellos es el denominado “Poisson tree processes (PTP)”, que consiste en modelar la tasa de especiación usando directamente el número de sustituciones. Las diferencias significativas (en el sentido estadístico) entre las relaciones reconstruidas entre y dentro de las especies se reflejan en las longitudes de las ramas que representan el número medio esperado de sustituciones por sitio entre dos eventos de ramificación. Por lo tanto, la suposición fundamental es que el número de sustituciones entre especies es significativamente mayor que el número de sustituciones dentro de las especies (Zhang et al., 2013). Otro método es el “Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC)” el cual fue diseñado para delimitar especies en evolución independiente utilizando datos de un solo locus. Este método modela separadamente el ajuste al modelo de Yule y los procesos coalescentes sobre un árbol ultramétrico (Pons et al., 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013; Tang et al., 2014).

3. Características del género *Phyllotis*

El género *Phyllotis* Waterhouse 1837 (Familia Cricetidae; Subfamilia Sigmodontinae) comprende a roedores conocidos como pericotes o lauchas orejadas (Fig. 1).

Son ratones generalmente de tamaño pequeño a mediano con pelaje



Fig. 1 *Phyllotis andium*. Reserva de Producción Faunística Antisana, Napo, Ecuador. Fotografiado por Jorge Brito

largo, fino y de color variable, siendo la zona ventral generalmente mucho más clara que la dorsal. La cola tiene una longitud inferior a la de la cabeza y el cuerpo combinados y las orejas son de tamaño mediano a grande. Se distribuyen desde las tierras altas de Ecuador a lo largo de los Andes, y a través de los hábitats áridos a semiáridos adyacentes, hasta el extremo sur de América del Sur continental. Sus hábitats comprenden sitios abiertos, rocosos y con matorrales, desde el nivel del mar hasta cerca de los 5.000 m. Se reconocen 20 especies dentro de este género: *P. alisosiensis*, *P. amicus*, *P. andium*, *P. anitae*, *P. bonariensis*, *P. caprinus*, *P. darwini*, *P. definitus*, *P. gerbillus*, *P. haggardi*, *P. limatus*, *P. magister*, *P. occidentis*, *P. osgoodi*, *P. osilae*, *P. pearsoni*, *P. pehuenche*, *P. stenops*, *P. vaccarum* y *P. xanthopygus* (Kramer et al., 1999; Pacheco et al., 2014; Stepan & Ramírez, 2015; Rengifo & Pacheco, 2015, 2018; Jayat et al., 2021).

3.1 *Phyllotis xanthopygus* (Waterhouse 1837)

Phyllotis xanthopygus es la especie con mayor rango de distribución del género, encontrándose poblaciones desde el centro de Perú hasta el sur de Argentina y Chile. Es un roedor de microhábitats rocosos en las laderas andinas. En Argentina, también se encuentra en afloramientos rocosos en las ecorregiones del Monte y la Estepa Patagónica y en elevaciones más altas en las Sierras de San Luis y Córdoba (Kramer et al., 1999; Stepan & Ramírez, 2015). Son estrictamente nocturnos y se alimentan de vegetales, granos e insectos (Bozinovic & Rosenmann, 1988; Pizzimenti & De Salle, 2008).

Se trata de una especie politípica y existen controversias acerca de las relaciones filogenéticas de los clados que comprende. En una primera instancia, Pearson (1958) y Hershkovitz (1962) consideraron a *P. darwini* como una especie ampliamente distribuida, que incluía varias formas nominales que los autores consideraban subespecies entre las que se encontraban *xanthopygus*, *chilensis*, *vaccarum*, *rupestris* y *posticalis*. Posteriormente, Walker et al. (1984) demostraron que el verdadero *P. darwini* está en realidad restringido a la región central de Chile y todas las demás formas nominales se incluyeron entonces dentro de *P. xanthopygus*, con localidad tipo en Santa Cruz, provincia de Santa Cruz, Argentina. Sin embargo, la identificación de especímenes basada únicamente en caracteres morfológicos sigue siendo problemática (Kramer et al., 1999).

En un estudio de sistemática molecular, Sabrina Riverón (2011) demostró, utilizando secuencias del gen citocromo b (Cit-b), que *P. xanthopygus* es una especie

parafilética compuesta por varios clados que presentan una marcada estructuración geográfica. Algunos clados reconocidos formalmente como *P. xanthopygus* se asociaron a *P. limatus* y otros a *P. bonariensis*. Es interesante destacar que en dicho estudio se detectó un clado bien diferenciado correspondiente a dos individuos de la provincia de Córdoba (capturados en la Pampa de Achala a más de 2000 metros sobre el nivel del mar [m.s.n.m.], cuyas secuencias se encuentran disponibles en GenBank) y un individuo de la provincia de San Luis capturado en el camino entre San Francisco del Monte de Oro y La Carolina, aunque dicha secuencia no se subió a GenBank. La autora lo llamó *P. x. vaccarum* al igual que a dos clados más, pertenecientes a individuos de Mendoza y Neuquén y a la Región Metropolitana de Chile; es decir, los especímenes con la misma denominación se distribuían en varios clados revelando relaciones parafiléticas.

Recientemente, otro estudio llevado a cabo por Ojeda et al., (2021) utilizando también el gen *Cit-b* denotó la presencia de ocho clados principales dentro de lo que los autores reconocen como el complejo de especies crípticas *P. xanthopygus*. Algunos de estos clados monofiléticos dentro del complejo, corresponden a especies con nombres formales: *P. bonariensis*, *P. caprinus*, *P. limatus*, *P. vaccarum* y *P. xanthopygus sensu stricto* (s.s.). Los clados monofiléticos restantes permanecieron sin status específico reconocido y se los denominó como clado *P. posticalis/P. rupestris*, *Phyllotis* sp.1 y *Phyllotis* sp. 2. Posteriormente, en una revisión taxonómica de estos clados, Jayat et al. (2021) profundizaron los conocimientos sobre estas especies y reconocieron que *P. vaccarum* abarca individuos cuya distribución va desde la región norte de Chile hasta el centro de ese país y en Argentina desde el sur de Jujuy, hasta la región centro-oeste. Además, en el mismo estudio se reconoció formalmente el status específico del clado *Phyllotis* sp. 2 que comprende individuos de Mendoza y se le asignó el nombre de *Phyllotis pehuenche*. En estos análisis, nuevamente el clado que comprende a individuos procedentes de Córdoba, denominado *Phyllotis* sp 1, presentó una marcada diferenciación genética respecto a los otros clados y se lo consideró restringido a la región central de Argentina. Agrupó a las dos secuencias de Córdoba utilizadas por Riverón (2011) e incorporó secuencias de otros dos individuos también de Pampa de Achala.

En abril de 2016, con motivo de caracterizar las especies de roedores presentes en la Reserva Natural Vaquerías (Valle Hermoso, Córdoba), se capturaron ejemplares tanto en bosques como en pastizales de altura. En base a la morfología externa, tres de los ejemplares capturados en roquedales rodeados de pastizal de altura cercanas al camino al Cuadrado, fueron clasificados a campo como pertenecientes al género *Phyllotis* (Fig. 2.

A y B). De ellos, a dos se les tomaron muestras de tejidos para estudios moleculares posteriores y todos fueron liberados en el sitio de captura.



Fig. 2. A y B: Individuos catalogados morfológicamente como pertenecientes al género *Phyllotis* capturados en la Reserva Natural Vaquerías, Córdoba, Argentina. Nótese en **A** que al individuo le falta parte de la cola. Fotografiado por Diego Uñates.

Objetivos

- Evaluar, utilizando secuencias del gen *Cit-b*, si los individuos colectados en la Reserva Natural Vaquerías efectivamente pertenecen al género *Phyllotis*.
- Evaluar a través de reconstrucciones filogenéticas, si dichos individuos pertenecen a alguno de los clados identificados dentro del complejo *Phyllotis xanthopygus*.
- Evaluar, a través de métodos de delimitación de especies, si las poblaciones de *Phyllotis* de Córdoba deberían ser consideradas como una especie diferente.
- Estimar los tiempos de divergencia entre los clados del complejo *P. xanthopygus*.

Materiales y Métodos

1. Análisis filogenéticos

En el laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución se encontraban disponibles las secuencias del gen Cit-b (1098 pares de bases) de los individuos denominados Vaq-8 y Vaq-14 capturados en Reserva Natural Vaquerías ubicada en Valle Hermoso, Córdoba los cuales fueron clasificados en base a su morfología externa como pertenecientes al género *Phyllotis*. Los individuos se capturaron en dos lugares diferentes: Vaq-8 a unos 930 m.s.n.m. y Vaq-14 a unos 1250 m.s.n.m.

Se construyeron dos matrices. La primera se utilizó para un primer análisis filogenético con el fin de evaluar si los ejemplares efectivamente pertenecen a este género; contenía secuencias de Cit-b de individuos pertenecientes a cada una de las especies de *Phyllotis* disponibles en GenBank y de *Calomys laucha*, *C. musculinus*, *Graomys griseoflavus* y *G. chacoensis* como extragrupos.

La segunda matriz se construyó para realizar otro análisis filogenético con el fin de evaluar si Vaq-8 y Vaq-14 pertenecen al complejo *P. xanthopygus*. Se incorporaron las secuencias de Cit-b correspondientes al complejo que previamente utilizaron Riverón (2011), Ojeda et al. (2021) y una secuencia (AY275128) proveniente de la provincia de San Luis publicada por D'Elía (2003). *Calomys laucha* y *C. musculinus* fueron utilizados como extragrupos. Las localidades de colecta de todos los individuos cuyas secuencias se utilizaron en este estudio se muestran en la Tabla 1.

Los análisis de las dos matrices se llevaron a cabo por separado bajo los tres métodos tradicionales: MP, IB y ML. Para los análisis de IB y ML, se eligió previamente el modelo de sustitución de nucleótidos más apropiado para el set de datos con el programa jModeltest 2 (Darriba et al., 2012) según el Criterio de Información Bayesiana (BIC) y el Criterio de Información de Akaike (AIC). Para el análisis del género *Phyllotis*, con ambos criterios el modelo de sustitución fue HKY+I+G, mientras que para el análisis del complejo *P. xanthopygus*, el modelo fue TrN+I+G también bajo los dos criterios.

Para obtener las estimaciones de las probabilidades de los nodos a posteriori según el método por IB, se utilizó el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) teniendo en cuenta los parámetros obtenidos para el modelo de evolución bajo el criterio BIC en cada caso. El análisis se hizo con dos corridas en simultáneo y cuatro cadenas de Markov (tres calientes y una fría) en 10 millones de generaciones para el análisis del género y en 20 millones para el análisis del complejo. En ambos casos los árboles se muestrearon cada

1000 generaciones y el primer 25% de estos muestreos se descartaron como burn-in o calentamiento de las cadenas de Markov.

Los análisis de ML se realizaron con el programa PhyML (Guindon et al., 2010) en su versión online: <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>. Se utilizaron los parámetros del modelo correspondiente al criterio AIC en cada caso. El soporte de los nodos está dado por 1000 réplicas de bootstrap.

Los análisis de MP fueron llevados a cabo con el programa TNT (Goloboff et al., 2008). Se realizaron búsquedas por “Tree bisection reconnection” para encontrar el árbol más parsimonioso en cada análisis y el soporte de los nodos se estimó mediante 1000 réplicas de bootstrap.

Tabla 1. Lista de especímenes utilizados en el estudio. Se detalla el código de acceso a GenBank de las secuencias, localidad de colecta y referencia bibliográfica de su publicación.

Especie/Clado	Código GenBank	Localidad	Publicación
<i>P. bonariensis</i>	AY956731	Argentina, Buenos Aires: Parque Provincial Tornquist, Abra de La ventana	Ernesto Steppan et al., 2007
<i>P. bonariensis</i>	AY956732	Argentina, Buenos Aires: Parque Provincial Tornquist, Abra de La ventana	Ernesto Steppan et al., 2007
<i>P. caprinus</i>	KF442273	Argentina, Jujuy: Bárcena, aprox. 3 km al S, sobre Ruta Nacional N° 9	Jayat et al., 2016
<i>P. caprinus</i>	MT776508	Argentina, Jujuy: Bárcena, aprox. 3 km al S, sobre Ruta Nacional N° 9	Ojeda et al., 2021
<i>P. caprinus</i>	MT776509	Argentina, Jujuy: Bárcena, aprox. 3 km al S, sobre Ruta Nacional N° 9	Ojeda et al., 2021
<i>P. limatus</i>	AY341045	Chile, Arica y Parinacota, Tignamar	Palma et al., 2005
<i>P. limatus</i>	AY341047	Chile, Parinacota: Tambo de Zapahuiria	Palma et al., 2005
<i>P. limatus</i>	AY341046	Chile, Socoroma	Palma et al., 2005
<i>P. limatus</i>	MT183676	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco	Storz et al., 2020
<i>P. limatus</i>	AY956740	Perú, Arequipa	Steppan et al., 2007
<i>P. limatus</i>	AF484208	Perú, Arequipa	Kuch et al., 2002
<i>P. limatus</i>	MT183677	Perú, 13 km E Arequipa	Storz et al., 2020
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776473	Argentina, Jujuy: 4 km al sur de Abra Pampa por la ruta 9	Ojeda et al., 2021
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776469	Argentina, Jujuy: 25 km al oeste de Susques	Ojeda et al., 2021
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776468	Argentina, Jujuy: pre-puna	Ojeda et al., 2021

<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776474	Argentina, Jujuy: aprox. 5 km (por ruta) al E de Rachaite, Ojeda et al., 2021 sobre ruta provincial 74	
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776475	Argentina, Jujuy: aprox. 5 km (por ruta) al E de Rachaite, Ojeda et al., 2021 sobre ruta provincial 74	
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT183689	Argentina, Jujuy: Camino a Garganta del Diablo	Storz et al., 2020
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776472	Argentina, Salta: 1 km ENE de Rodeo Pampa, km 59 de Ruta Provincial N° 7	Ojeda et al., 2021
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776470	Argentina, Salta: 9 km al NO de Lizoite	Ojeda et al., 2021
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	MT776471	Argentina, Salta: 9 km al NO de Lizoite	Ojeda et al., 2021
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	U86832	Bolivia, Tarija: Iscayachi	Steppan, 1998
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY341049	Chile, El Loa: Arroyo Coya	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	U86831	Chile, Arica y Parinacota: ca. 72 km E Arica y 10 km S Chapiquina y 22 km S Putre	Steppan, 1998
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY341052	Chile, Comuna de Putre, Lago Chungara	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY341051	Chile, Tamarugal: Comuna de Colchane, Suricayo	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY746968	Chile, Comuna de Putre, Lago Chungara	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY746969	Chile, Comuna de Putre, Lago Chungara	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY746970	Chile, Comuna de Putre, Lago Chungara	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY341053	Chile, Comuna de Putre, Parinacota	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY341050	Chile, Tamarugal: Comuna de Colchane, Enquelga	Palma et al., 2005
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	KR089034	Perú, Arequipa	Alhajeri et al., 2015
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AF484212	Perú, 53 km E Arequipa	Kuch et al., 2002
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	AY956730	Perú, Lima: Casapalca	Steppan et al., 2007
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	U86830	Perú, Tacna: 5 km NE Tarata	Steppan, 1998
<i>P. posticalis/P. rupestris</i>	KY754115	Perú, Cuzco: Písaq	Steppan & Schenk, 2017
<i>P. vaccarum</i>	MT183688	Argentina, Salta: Alto Cachi	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT776492	Argentina, Catamarca: Agua del Gauchi, aprox. 1 km al E del Mogote Los Cocos	Ojeda et al., 2021

<i>P. vaccarum</i>	MT776487	Argentina, Catamarca: Cortaderas, a 95 km O de Fiambalá, Ojeda et al., 2021 sobre R. 60	
<i>P. vaccarum</i>	MT776488	Argentina, Catamarca: Cortaderas, a 95 km O de Fiambalá, Ojeda et al., 2021 sobre R. 61	
<i>P. vaccarum</i>	MT776486	Argentina, Catamarca: Cortaderas, a 95 km O de Fiambalá, Ojeda et al., 2021 sobre R. 62	
<i>P. vaccarum</i>	MT776489	Argentina, Catamarca: Cortaderas, a 95 km O de Fiambalá, Ojeda et al., 2021 sobre R. 63	
<i>P. vaccarum</i>	MT776491	Argentina, Catamarca: Mogote Las Trampas, aprox. 15 km Ojeda et al., 2021 al NO de Chumbicha	
<i>P. vaccarum</i>	MT183686	Argentina, Catamarca: Laguna Blanca	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183687	Argentina, Catamarca: Laguna Blanca	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT776506	Argentina, Mendoza: 31 km al oeste de Uspallata	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776507	Argentina, Mendoza: 31,7 km al oeste de Uspallata	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776503	Argentina, Mendoza: 31,7 km al oeste de Uspallata	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	AY956734	Argentina, Mendoza: 49.2 km N central Mendoza	Steppan et al., 2007
<i>P. vaccarum</i>	MT776501	Argentina, Mendoza: A 68 km de Horcones	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776500	Argentina, Mendoza: A 68 km de Horcones	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776493	Argentina, Mendoza: Pampa Palauco, Cajon de Letellier	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776495	Argentina, Mendoza: Pampa Palauco, Cajon de Letellier	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776496	Argentina, Mendoza: Pampa Palauco, Cajon de Letellier	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776494	Argentina, Mendoza: Pampa Palauco, Yacimiento YPF	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776505	Argentina, Mendoza: Puente del Inca	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776498	Argentina, Mendoza: Quebrada del Toro	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776497	Argentina, Mendoza: Quebrada del Toro	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776502	Argentina, Mendoza: Quebrada del Toro	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776504	Argentina, Mendoza: Quebrada del Toro	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT776499	Argentina, Mendoza: Quebrada del Toro	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT183685	Argentina, Mendoza: Bardas Blancas	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT776490	Argentina, Salta: Cuesta del Obispo, aprox. 5 km al NE de Piedra del Molino, sobre Ruta Provincial N° 33	Ojeda et al., 2021
<i>P. vaccarum</i>	MT183684	Argentina, Neuquén: Buta Ranquil	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183678	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 4,406 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183679	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 4,406 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183680	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 4,406 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183681	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 5,069 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183682	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 5,069 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	MT183683	Argentina, Salta: Volcán Llullaillaco 6,739 m	Storz et al., 2020
<i>P. vaccarum</i>	AY956739	Chile, Antofagasta: Tocopilla, desembocadura Río Loa	Steppan et al., 2007
<i>P. vaccarum</i>	AF484211	Chile, Toconao, Quebrada de Jerez	Kuch et al., 2002

<i>P. vaccarum</i>	AF484210	Chile, Provincia El Loa: Talabre, Toconao arriba	Kuch et al., 2002
<i>P. vaccarum</i>	AY956735	Chile, Región Metropolitana: El Yeso	Steppan et al., 2007
<i>P. vaccarum</i>	AY956736	Chile, Región Metropolitana: El Yeso	Steppan et al., 2007
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167917	Argentina, Chubut: Camarones	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167909	Argentina, Chubut: Establecimiento Bajada del Guanaco	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167916	Argentina, Chubut: Estancia Los Manantiales	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167908	Argentina, Chubut: Estancia Quichaura	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167907	Argentina, Chubut: Estancia Talagapa	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167914	Argentina, Chubut: Gorro Frigio	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167913	Argentina, Chubut: Las Plumas	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167905	Argentina, Río Negro: Cerro Corona	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167906	Argentina, Río Negro: Subida del Naciente	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167915	Argentina, Santa Cruz: Estancia Cerro del Paso	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167911	Argentina, Santa Cruz: Estancia Cerro Ventana	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167912	Argentina, Santa Cruz: Estancia Cerro Ventana	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	HM167910	Argentina, Santa Cruz: Estancia La Ensenada	Lessa et al., 2010
<i>P. xanthopygus</i> s.s.	AY956737	Chile, Aisén: Chile Chico	Steppan et al., 2007
<i>P. pehuenche</i> *	MT776484	Argentina, Mendoza: 10 km al S de Las Leñas, margen del Río Salado	Ojeda et al., 2021
<i>P. pehuenche</i> *	MT776482	Argentina, Mendoza: 10 km al S de Las Leñas, margen del Río Salado	Ojeda et al., 2021
<i>P. pehuenche</i> *	MT776481	Argentina, Mendoza: 10 km al S de Las Leñas, margen del Río Salado	Ojeda et al., 2021
<i>P. pehuenche</i> *	MT776483	Argentina, Mendoza: 10 km al S de Las Leñas, margen del Río Salado	Ojeda et al., 2021
<i>P. pehuenche</i> *	MT776485	Argentina, Mendoza: 3 km NO de Las Leñas	Ojeda et al., 2021 ¹
<i>P. pehuenche</i> *	MT776478	Argentina, Mendoza: Adeg El Seguro	Ojeda et al., 2021
<i>P. pehuenche</i> *	MT776480	Argentina, Mendoza: Laguna de la Niña Encantada	Ojeda et al., 2021
<i>P. anitae</i>	AY627299	Argentina, Tucumán: 10 km por carretera al sur de Hualinchay por el sendero a Lara	Jayat et al., 2007
<i>P. anitae</i>	AY627298	Argentina, Tucumán: 10 km por carretera al sur de Hualinchay por el sendero a Lara	Jayat et al., 2007
<i>P. osilae</i>	U86826	Perú, Puna: Chicuito, Llave	Steppan, 1998
<i>P. osilae</i>	AY956699	Perú, Cuzco: Quenco	Steppan et al., 2007
<i>P. occidentis</i>	AY956702	Perú, Lima: Huarochiri, Bosque de Zarate	Steppan et al., 2007
<i>P. occidentis</i>	AY956706	Perú, Lima: Canta, Sachaqui	Steppan et al., 2007
<i>P. occidentis</i>	AY956705	Perú, Huancabamba: Tuluca	Rengifo & Pacheco, 2015
<i>P. andium</i>	KT203816	Perú, Huancabamba: Tuluca	Rengifo & Pacheco, 2015

* Secuencias publicadas y consideradas como *Phyllotis* sp. 2 por Ojeda et al. (2021) cuyo nombre específico fue otorgado por Jayat et al. (2021).

<i>P. andium</i>	KT203815	Perú, Huancabamba: Tuluca	Rengifo & Pacheco, 2015
<i>P. darwini</i>	AY956722	Chile, Coquimbo: Petorca, Los Molles	Steppan et al., 2007
<i>P. darwini</i>	AY956726	Chile, Coquimbo: Petorca, Los Molles	Steppan et al., 2007
<i>P. magister</i>	U86824	Perú, Tacna: Tarata, 3 km NE	Steppan, 1998
<i>P. magister</i>	AY956721	Perú: Arequipa, 35 km E Arequipa	Steppan et al., 2007
<i>P. amicus</i>	AY956708	Perú, Lima: R.N. Chancay, Lachay, Quebrada Teatrino	Steppan et al., 2007
<i>P. definitus</i>	KX793700	Perú, Ancash: Ulta, Mina Pierina, Huaraz	Rengifo & Pacheco, 2018
<i>P. definitus</i>	KX793699	Perú, Ancash: Ulta, Mina Pierina, Huaraz	Rengifo & Pacheco, 2018
<i>P. gerbillus</i>	AY956712	Perú, Piura: Sechura	Steppan et al., 2007
<i>P. gerbillus</i>	AY956713	Perú, Piura: Sechura	Steppan et al., 2007
<i>P. haggardi</i>	KY754114	Ecuador, Tungurahua	Steppan & Schenk, 2017
<i>P. osgoodi</i>	U86825	Chile, Tarapaca: Parinacota	Steppan, 1998
<i>P. alisosiensis</i>	GQ119626	Argentina, Tucumán: Parque Nacional Campo de Los Ferros Alisos	et al., 2010
<i>P. alisosiensis</i>	GQ119625	Argentina, Tucumán: Parque Nacional Campo de Los Ferros Alisos	et al., 2010
<i>P. pearsoni</i>	AY956714	Perú	Steppan et al., 2007
<i>P. pearsoni</i>	AY956715	Perú	Steppan et al., 2007
<i>P. stenops</i>	KX793701	Perú, Dpto. Amazonas, Luya, Cocabamba, Túen	Rengifo & Pacheco, 2018
<i>P. stenops</i>	KX793702	Perú, Dpto. Amazonas, Luya, Cocabamba, Túen	Rengifo & Pacheco, 2018
<i>Phyllotis</i> sp. 1	AF484209	Argentina, Córdoba: Pampa de Achala	Kuch et al., 2002
<i>Phyllotis</i> sp. 1	AY275128	Argentina, San Luis: 7 km S de San Francisco del Monte de Oro, 1022 m.	D'Elia, 2003
<i>Phyllotis</i> sp. 1	AY956733	Argentina, Córdoba: Pampa de Achala	Steppan et al., 2007
<i>Phyllotis</i> sp. 1	MT776477	Argentina, Córdoba: Pampa de Achala, aprox. 6 km (por Ojeda et al., 2021 ruta 34) al E de la antena repetidora La Posta, 2,300 m.	
<i>Phyllotis</i> sp. 1	MT776476	Argentina, Córdoba: Pampa de Achala, aprox. 6 km (por Ojeda et al., 2021 ruta 34) al E de la antena repetidora La Posta, 2,300 m.	
Vaq-8	-	Argentina, Córdoba: Reserva Natural Vaquerías, Valle Hermoso	Este estudio
Vaq-14	-	Argentina, Córdoba: Reserva Natural Vaquerías, Valle Hermoso	Este estudio
Extragrupos			
<i>C. laucha</i>	KF917357	Argentina, Buenos Aires: Pergamino	González-Ittig et al., 2014
<i>C. musculus</i>	DQ452316	Argentina, Buenos Aires: Pergamino	González-Ittig et al., 2007
<i>G. griseoflavus</i>	KC699970	Argentina	Martínez & Gardenal 2016
<i>G. chacoensis</i>	KC699937	Argentina	Martínez & Gardenal 2016

2. Delimitación de especies

Para evaluar si *Phyllotis* sp.1 debería considerarse como una nueva especie, se llevaron a cabo análisis de delimitación de especies para el complejo *P. xanthopygus* teniendo en cuenta tres métodos diferentes.

El primer método utilizado fue el del concepto genético de especie propuesto por Bradley & Baker (2001). Para ello, se calculó la distancia genética Kimura-2 parámetros (K2P) con el programa Mega X (Kumar et al., 2018) para comparaciones dentro y entre clados de *P. xanthopygus*.

En segundo lugar, se implementó el método de delimitación de especies unilocus “Bayesian implementation of the Poisson tree processes (bPTP)” (Zhang et al., 2013). Es una versión actualizada del PTP y se realizó en el servidor online: <https://species.hits.org/ptp/>. Como árbol de entrada se usó el obtenido con MrBayes 3.2.7.

Por último, se utilizó el método “generalized mixed Yule-coalescent (GMYC)” (Pons et al., 2006). Para este análisis, se construyó previamente un árbol ultramétrico con Beast 1.8.2 (Drummond et al., 2015), utilizando el modelo de sustitución detectado por el programa jModeltest, y las opciones “Speciation: Yule Process”, “Clock Lognormal relaxed clock”. Según lo recomendado por Michonneau (2016), las secuencias de los extragrupos fueron removidas del análisis GMYC utilizando la función `drop.tip()` del paquete APE (Paradis et al., 2004). Los análisis de GMYC se ejecutaron con el paquete SPLITS (Ezard et al., 2009) en R. Con la función `resumen()` de los resultados se pudo ver cuántas especies se encuentran, el número de linajes a lo largo del tiempo, y el árbol con subclados en rojo y las ramas de las especies identificadas en negro.

3. Tiempos de divergencia

Para estimar los tiempos de divergencia entre los clados del complejo *P. xanthopygus*, también se utilizó el programa Beast 1.8.2. Se implementó el proceso de especiación Yule con un modelo de reloj molecular relajado “lognormal no correlacionado” para permitir la variación de la tasa de sustitución entre ramas. Como modelo evolutivo *a priori* se usó el modelo seleccionado por el programa jModeltest 2. Desafortunadamente, no hay fósiles disponibles para el complejo *P. xanthopygus*, por lo que el calibrado sólo se realizó utilizando una tasa de sustitución de 2,3% por millón de años, estimada por Smith & Patton (1993) para el gen *Cit-b* de roedores Sudamericanos.

Resultados

1. Análisis filogenéticos

En el primer análisis filogenético llevado a cabo correspondiente al género *Phyllotis*, en base a los tres métodos filogenéticos utilizados (MP, IB y ML) se obtuvieron árboles con topologías similares con algunas diferencias en los soportes de los nodos. En la Figura 3 se presenta el árbol con la topología obtenida mediante IB con los valores de probabilidades posteriores y bootstrap correspondientes a cada nodo. En el árbol se encuentran representadas las 20 especies del género *Phyllotis* reconocidas hasta el momento.

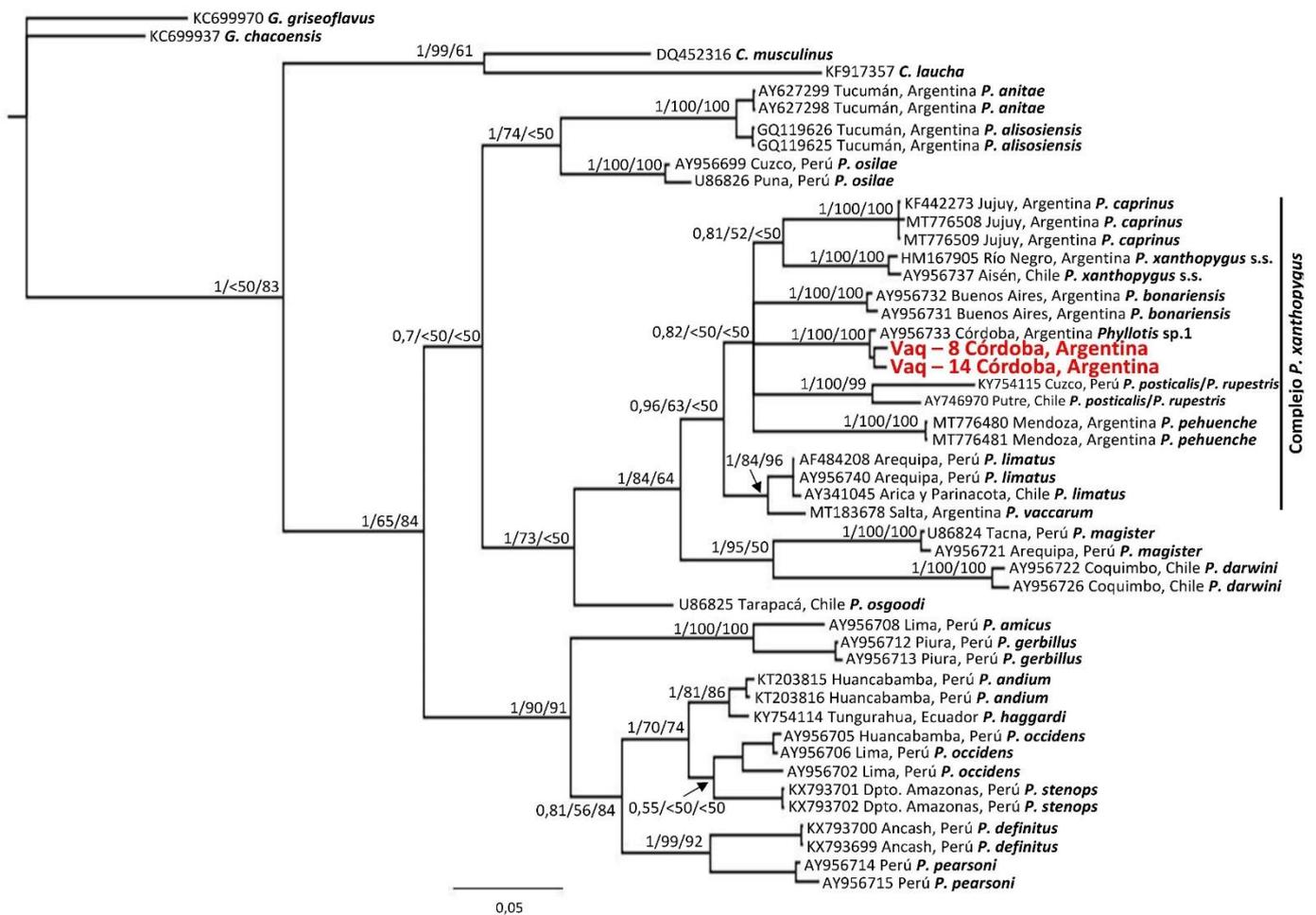


Fig. 3. Reconstrucción filogenética obtenida por el método de IB a partir del gen Cit-b para el género *Phyllotis*. Se anuncia para cada secuencia el código de acceso a GenBank, localidad y nombre del taxón en negrita. El orden de los valores de soporte de los nodos es IB/ML/MP. En rojo las secuencias de interés: Vaq-8 y Vaq-14 pertenecientes a los individuos capturados en Reserva Vaquerías, Córdoba.

Como se puede observar, dentro del género, se obtuvieron tres grupos principales de especies coincidentes con los obtenidos por Steppan (1993, 1995) y Steppan et al. (2007): el primero compuesto por *P. anitae* y *P. alisosiensis* provenientes de la provincia de Tucumán, Argentina junto con *P. osilae* con localidad en Perú. El segundo grupo corresponde al compuesto por *P. darwini*, *P. magister*, *P. osgoodi* y el complejo de especies *P. xanthopygus*. Este grupo abarca localidades de colecta muy variadas: Perú, norte, centro y sur de Chile y Argentina. El tercer grupo está compuesto por las especies *P. amicus*, *P. gerbillus*, *P. andium*, *P. haggardi*, *P. stenops*, *P. occidentis*, *P. definitus* y *P. pearsoni*, todas con localidad de colecta en Perú, excepto *P. haggardi* (Ecuador).

Con respecto a las secuencias de la Reserva Vaquerías: Vaq-8 y Vaq-14, se observa que se agrupan dentro del género *Phyllotis* y más específicamente dentro del complejo *P. xanthopygus* junto con la secuencia cuya localidad también se encuentra en la provincia de Córdoba; este agrupamiento presenta valores de soporte máximos.

En un segundo análisis filogenético, se profundizó incorporando más secuencias correspondientes al complejo *P. xanthopygus*. En la Figura 4 se observa el árbol obtenido bajo el método por IB con los soportes de bootstrap y probabilidades posteriores correspondientes a los tres métodos empleados (IB, MP y ML). En todos se obtuvieron topologías similares. Las principales diferencias se dieron en las relaciones entre *Phyllotis* sp. 1, *P. pehuenche* y *P. bonariensis*. En el método ML, *P. pehuenche* se agrupa junto con *Phyllotis* sp. 1 y *P. bonariensis*, pero con niveles de soporte muy bajos por lo que debería considerarse como una relación filogenética no resuelta.

En todos los casos, las secuencias correspondientes al complejo se agruparon según los ocho clados monofiléticos previamente descritos por Ojeda et al., (2021) y Jayat et al., (2021): *P. posticalis/P. rupestris*, *P. xanthopygus* s. s., *Phyllotis* sp. 1, *P. vaccarum*, *P. limatus*, *P. caprinus*, *P. pehuenche* y *P. bonariensis* con valores de soporte altos. Se observan dos grupos principales dentro del complejo: uno corresponde al clado *P. posticalis/P. rupestris* abarcando individuos de diversas localidades (norte de Argentina, Chile, Perú y Bolivia) y el segundo que incluye a todos los clados restantes. Las secuencias Vaq-8 y Vaq-14 se agruparon junto con las secuencias con localidad de colecta en las provincias de Córdoba y San Luis correspondientes al clado *Phyllotis* sp. 1 también con valores de soporte altos. Particularmente este clado, estaría entonces conformado por secuencias de individuos de la Reserva Natural Vaquerías (Valle

Hermoso) y Pampa de Achala en la provincia de Córdoba y la zona sur de San Francisco del Monte de Oro en la provincia de San Luis.

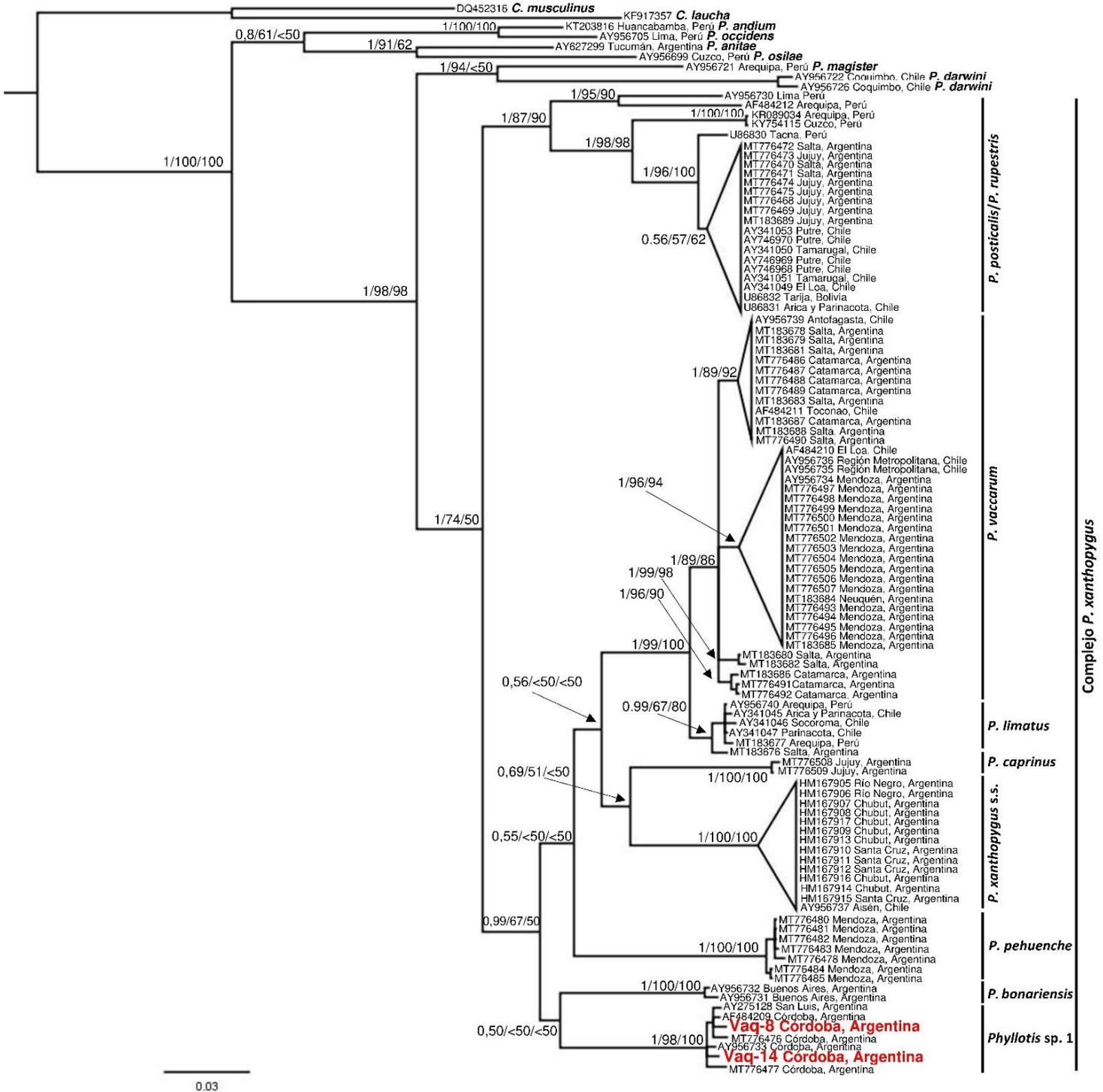


Fig. 4. Reconstrucción filogenética obtenida por el método de IB a partir del gen *Cit-b* para el complejo *P. xanthopygus*. Se anuncia para cada secuencia el código de acceso a GenBank, localidad de colecta y nombre del taxón en negrita. El orden de los valores de soporte de los nodos es IB/ML/MP. En rojo las secuencias de interés: Vaq-8 y Vaq-14 pertenecientes a los individuos capturados en la Reserva Vaquerías, Valle Hermoso, Córdoba.

2. Delimitación de especies

Se muestra en la Tabla 2 las distancias genéticas K2P entre y dentro de grupo para los diferentes clados del complejo *P. xanthopygus* con sus respectivos errores estándar. Las mayores distancias se observan entre el clado *P. posticalis/P. rupestris* y el resto de los clados (desde 10,32% con *P. limatus* a 11,65% con *P. pehuenche*), aunque también este clado es el que mayor distancia dentro de grupo tiene (3,11%). El siguiente clado con mayores distancias genéticas entre grupos corresponde a *Phyllotis* sp 1 de las provincias de Córdoba y San Luis, pudiéndose observar valores que van desde 9,52% con *P. bonariensis* hasta 11,69% con *P. pehuenche*. La distancia dentro de grupo para *Phyllotis* sp. 1 es 1,03%. El menor valor de distancia genética entre grupos del complejo se observa entre *P. vaccarum* y *P. limatus* con un valor de 3,17%.

Tabla 2. Distancias genéticas K2P entre los ocho clados del complejo *P. xanthopygus*. En negrita las distancias genéticas dentro de los clados.

Especies/Clados	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>P. posticalis/P. rupestris</i>	3,11 ± 0,29							
2. <i>P. vaccarum</i>	10,78 ± 1,04	1,77 ± 0,29						
3. <i>P. limatus</i>	10,32 ± 1,05	3,17 ± 0,50	0,62 ± 0,16					
4. <i>P. caprinus</i>	10,43 ± 1,16	8,49 ± 0,96	8,21 ± 1,03	0,25 ± 0,17				
5. <i>P. xanthopygus</i> s.s.	11,38 ± 1,19	9,32 ± 1,06	9,68 ± 1,15	8,86 ± 1,07	0,75 ± 0,15			
6. <i>P. pehuenche</i>	11,65 ± 1,27	9,77 ± 1,12	9,46 ± 1,16	11,25 ± 1,28	10,35 ± 1,22	0,26 ± 0,11		
7. <i>P. bonariensis</i>	10,55 ± 1,01	9,44 ± 1,00	9,36 ± 1,07	9,27 ± 1,14	8,69 ± 1,05	10,4 ± 1,22	0,64 ± 0,24	
8. <i>Phyllotis</i> sp. 1	10,87 ± 1,03	9,91 ± 1,03	10,00 ± 1,06	10,13 ± 1,15	10,25 ± 1,18	11,69 ± 1,30	9,52 ± 0,95	1,03 ± 0,19

En la Figura 5 se muestran los resultados correspondientes a los métodos de delimitación de especies bPTP y GMYC sobre el árbol ultramétrico que se construyó a partir del gen *Cit-b* del complejo *P. xanthopygus* con el programa Beast 1.8.2 luego de 50 millones de generaciones. Dicho árbol se utilizó como árbol de entrada para GMYC, mientras que para el bPTP se utilizó el obtenido en MrBayes 3.2.7. Con fines comparativos se muestran conjuntamente en la figura. Para obtener resultados más precisos de delimitación entre clados del complejo, en ambos métodos se excluyeron los extragrupos (*C. laucha* y *C. musculus*) y las otras especies de *Phyllotis* no pertenecientes al complejo (*P. andium*, *P. occidentis*, *P. anitae*, *P. osilae*, *P. magister* y *P. darwini*).

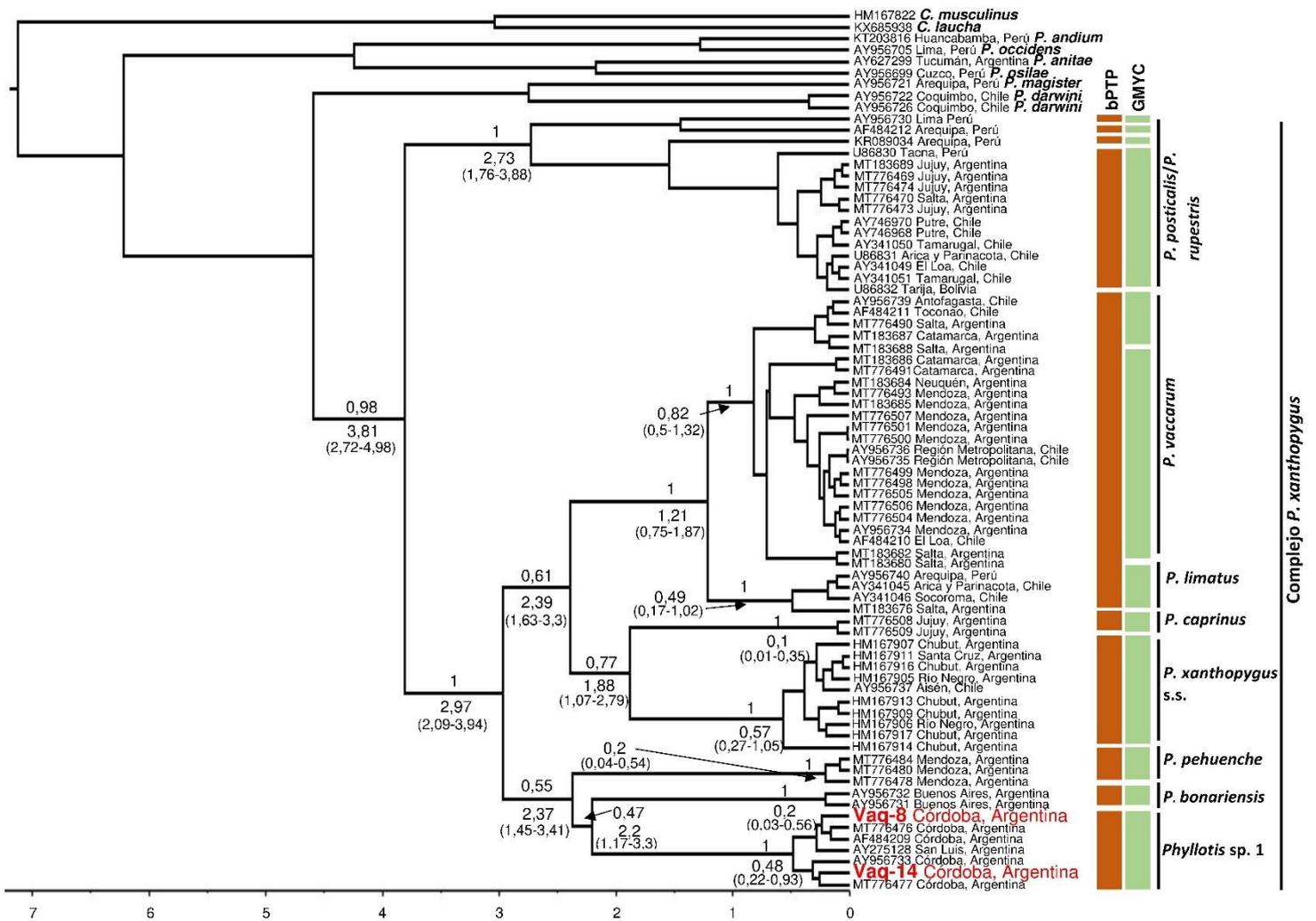


Fig. 5. Árbol de máxima credibilidad de clado obtenido con Beast 1.8.2 a partir del gen Cit-b luego de 50 millones de generaciones. La escala de tiempo se presenta en millones de años y se calibró utilizando la tasa de sustitución 0,023 estimada para roedores sudamericanos por Smith & Patton (1993). Se indican los tiempos de divergencia solo de los nodos de interés correspondientes al complejo. Las edades con su intervalo de probabilidad del 95% se indican debajo de los nodos y los valores de soporte se muestran encima de los mismos. Cada secuencia se representa por su código de acceso a GenBank, localidad de colecta y nombre del clado al que corresponden. En color rojo se representan las secuencias de interés Vaq-8 y Vaq-14. Las barras verticales de colores naranja y verde representan los grupos obtenidos por los métodos de delimitación de especies bPTP y GMYC, respectivamente.

Bajo el método bPTP se obtuvieron un total de 10 especies diferentes, mientras que en el método GMYC se obtuvieron 12. Esta diferencia se debe a que la delimitación fue diferente en el clado *P. vaccarum*. En bPTP, se agrupa todo el clado en conjunto con *P. limatus* como una sola especie, mientras que en GMYC, el clado *P. vaccarum* se divide en dos especies y considera a *P. limatus* como una especie diferente. Para el resto de clados del complejo la delimitación fue igual bajo los dos métodos, en donde se puede observar que el clado denominado *P. posticalis/P. rupestris* se divide en 4 especies

diferentes y las otras especies delimitadas corresponden a los clados: *P. caprinus*, *P. xanthopygus* s.s., *P. pehuenche*, *P. bonariensis* y *Phyllotis* sp. 1.

3. Tiempos de divergencia

Los tiempos de divergencia se estimaron con un intervalo de confianza del 95% o “highest probability density” (95% HPD) (Fig. 5). Con el fin de mejorar la estimación de los tiempos, se decidió eliminar de la matriz de entrada las secuencias de igual haplotipo.

Se puede observar en la Figura 5 que hay dos grupos principales dentro del complejo *P. xanthopygus*, uno correspondiente al clado *P. posticalis/P. rupestris* y el otro que agrupa al resto de los clados. El ancestro común más reciente (ACMR) de todo el complejo es de aproximadamente 3,8 millones de años (95% HPD= 2,72 – 4,98). Luego se habría producido la separación de los ancestros de los dos grandes clados. El ACMR de todas las secuencias de *P. posticalis/P. rupestris* analizadas data de aproximadamente 2,73 millones de años (95% HPD= 1,76 – 3, 88).

Hace aproximadamente 2,97 millones de años (95% HPD= 2,09 – 3,94) habría comenzado la divergencia del otro gran clado, con la aparición de dos subclados, uno compuesto por *P. vaccarum*, *P. limatus*, *P. caprinus* y *P. xanthopygus* s.s. y el otro por *P. pehuenche*, *P. bonariensis* y *Phyllotis* sp. 1

La divergencia entre los clados *P. vaccarum* y *P. limatus* habría ocurrido hace 1,21 millones de años (95% HPD= 0,75 – 1,87). El ACMR de *P. vaccarum* data de aproximadamente 820 mil años (95% HPD= 0,5 – 1,32) y el de *P. limatus* de 490 mil años (95% HPD= 0,17 – 1,02). Por otro lado, la separación entre *P. caprinus* y *P. xanthopygus* s.s. habría ocurrido hace 1,88 millones de años (95% HPD= 1,07 – 2,79). El ACMR de todos los *P. caprinus* tendría 100 mil años (95% HPD= 0,01 – 0,35) y el de *P. xanthopygus* s.s. 570 mil años (95% HPD= 0,27 – 1,05).

Por último, los ACMR de *P. pehuenche* y *P. bonariensis* datan aproximadamente de 200 mil años con un 95% HPD= 0,04 – 0,54 para *P. pehuenche* y un 95% HPD= 0,03 – 0,6 para *P. bonariensis* y el del clado *Phyllotis* sp. 1 tendría unos 480 mil años (95% HPD= 0,22 – 0,93).

Discusión

En base a los resultados obtenidos (Fig. 3) se determinó, mediante un análisis filogenético del gen *Cit-b*, que los individuos Vaq-8 y Vaq-14 capturados en la Reserva Natural Vaquerías pertenecen al género *Phyllotis*. Estos individuos habían sido catalogados en base a su morfología externa, por lo tanto, la sistemática molecular confirmó esa clasificación, cumpliendo así con el primer objetivo de este estudio.

Luego se llevó a cabo un segundo análisis filogenético, también del gen *Cit-b*, con la finalidad de evaluar si los individuos pertenecían a alguno de los clados definidos por Ojeda et al. (2021) dentro del complejo de especies crípticas *P. xanthopygus*. En este caso se observó que las secuencias Vaq-8 y Vaq-14 sí pertenecen al complejo *P. xanthopygus* y más específicamente al clado *Phyllotis* sp. 1 (Fig. 4).

Posteriormente, se llevaron a cabo análisis de delimitación de especies bajo tres métodos para evaluar si las poblaciones de la provincia de Córdoba (clado *Phyllotis* sp. 1), podrían considerarse como una especie diferente. En primer lugar, se calcularon las distancias genéticas K2P y se pudo observar que los valores entre grupos fueron altos para *Phyllotis* sp. 1 respecto de todos los otros clados, lo que sugiere que puede considerarse como especie válida (Tabla 2). La menor distancia genética se observó con *P. bonariensis*, con un valor de 9,52% y la mayor con *P. pehuenche* con un valor de 11,69%. Estos resultados concuerdan con los estudios de Riverón (2011) y Ojeda et al. (2021) donde se obtuvieron distancias genéticas por pares (p-distancias) de entre 9% con *P. bonariensis* y 11% con *P. pehuenche*. La distancia genética dentro de grupo fue de 1,03% lo que se corresponde con variación intraespecífica según Bradley & Baker (2001). En todos estos análisis, incluido el presente, *Phyllotis* sp. 1 siempre se encontró más relacionado a *P. bonariensis* que al resto de los clados. Esta relación también fue reportada a nivel morfológico en un estudio de rasgos cuantitativos craneales, en el que Teta et al. (2018) observaron que las poblaciones que habitan las Sierras Pampeanas Centrales (SPC) en Córdoba y San Luis, tenían algunos caracteres diferenciados del resto de poblaciones de *P. xanthopygus* pero que los compartían con las poblaciones correspondientes a *P. bonariensis*, la cual, es una especie endémica del Sistema de las Sierras de la Ventana, un pequeño cinturón montañoso de aproximadamente 190 km de longitud ubicado en el suroeste de la provincia de Buenos Aires (Steppan & Ramírez, 2015). Estas poblaciones tienen en común que se encuentran aisladas en hábitats rocosos de sistemas montañosos que están rodeados de ambientes de baja elevación: el Sistema

de las Sierras de la Ventana se encuentra rodeado de la llanura pampeana y el sistema de las SPC rodeadas hacia el sureste por el Espinal y hacia el noroeste y oeste por el Chaco Seco (Cabrera, 1976). Esto podría indicarnos que están expuestas a los mismos procesos demográficos que generalmente se dan en este tipo de poblaciones aisladas (como cuellos de botella o efecto fundador) que producen tasas más altas de evolución morfológica a través de la deriva genética, dando como resultado características morfológicas congruentes entre los dos clados y distintivas respecto al resto. Sin embargo, teniendo en cuenta la relación a nivel filogenético entre ambos clados, podría también deberse a que comparten un ancestro común cuyas poblaciones divergieron recientemente.

En los análisis de delimitación restantes, bPTP y GMYC (Fig. 5), se observó que el clado *Phyllotis* sp. 1 es un linaje independiente, dando también indicios de que sí debería considerarse como una especie válida. Estos resultados también coinciden con los obtenidos mediante bPTP por Ojeda et al. (2021). La idea de que las poblaciones de Córdoba constituyen un linaje independiente, ya había sido sugerido en la Tesina de Grado de Angelina García (2005) realizada en el laboratorio de la Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución. En este trabajo se demostró, a través de técnicas moleculares que reflejan la variabilidad a nivel genoma nuclear (ISSR y RAPDs), que había una gran diferenciación genética entre individuos clasificados como *P. xanthopygus* de diferentes provincias. Específicamente demostraron que los individuos de la Reserva Hídrica Pampa de Achala pertenecían a una población aislada respecto a las áreas protegidas Don Carmelo en la provincia de San Juan y Villavicencio en Mendoza. En base a los conocimientos actuales sobre el complejo *P. xanthopygus* (Jayat et al., 2021; Ojeda et al., 2021), se podría pensar que se estaban comparando ejemplares de *Phyllotis* sp. 1 con *P. vaccarum*, ya que las áreas protegidas Don Carmelo y Villavicencio se encuentran dentro de la distribución esta última especie, que va desde el centro-sur de Mendoza hasta Salta (Jayat et al., 2021).

Una vez definido que podría tratarse de una especie diferente, se propuso estimar los tiempos de divergencia entre los ocho clados del complejo *P. xanthopygus* ya que hasta el momento no se había realizado. Es importante destacar que los fósiles más antiguos del complejo fueron hallados en Bolivia y datan de los períodos Ensenadense y Bonaerense (Plioceno superior - Pleistoceno medio); fueron clasificados como *Phyllotis* cf. *Phyllotis xanthopygus* y aún está pendiente su revisión. El más reciente clasificado como *P. xanthopygus* fue hallado en Argentina y data del período Platense (Holoceno) (Pardiñas et al., 2002). Es decir, si bien se han encontrado algunos fósiles del género o

del complejo, resulta controversial su uso como reloj molecular para estimar tiempos de divergencia ya que el ejemplar de Bolivia presenta incertezas taxonómicas como para usar esa información en un nodo o taxón y, por otro lado, el ejemplar de Argentina es demasiado reciente como para dar una buena estimación temporal para nodos mucho más antiguos. Debido a esto, el calibrado se llevó a cabo utilizando la tasa de sustitución para el gen *Cit-b* de 2,3% por millón de años estimada por Smith & Patton (1993) para roedores sudamericanos. Según los resultados aquí obtenidos (Fig. 5), el ancestro común más reciente de todos los clados del complejo *P. xanthopygus* data de aproximadamente 3,81 millones de años (Plioceno medio) con un intervalo de confianza del 95% que va desde 2,72 a 4,98 millones de años, tiempo en el que, a su vez, diverge el primer clado: *P. posticalis*/*P. rupestris* del resto; teniendo así una datación ligeramente anterior al presunto fósil más antiguo. La separación más reciente ocurrió entre los clados *P. vaccarum* y *P. limatus* hace aproximadamente 1,21 millones de años (95% HPD= 0,75 – 1,87), lo que puede explicar por qué el método de delimitación bPTP los agrupa como un solo linaje. La separación entre *P. bonariensis* y *Phyllotis* sp. 1 habría ocurrido hace unos 2.2 millones de años (95% HPD= 1,17 – 3,3) y hace al menos 480 mil años que la última especie estaría presente en la SPC.

En relación a la distribución geográfica de *Phyllotis* sp.1, es importante tener en cuenta que, quienes definieron el clado (Ojeda et al.,2021) utilizaron solo secuencias provenientes de Pampa de Achala por encima de los 2000 m.s.n.m. Esta zona está ubicada en el sistema montañoso de las Sierras Grandes dentro de las SPC de Córdoba y San Luis (Rapela et al., 2001). Debido al alto grado de aislamiento por altura, se han reportado allí procesos de divergencia por especiación alopátrica, por lo que se la conoce por ser un área de suma importancia biogeográfica. Se ha demostrado que este proceso ocurre en diversos grupos de organismos como plantas (Cabido et al., 1998), hongos (Robledo & Renison, 2010), aves (Nores, 1995), anfibios (Lescano et al., 2015) y roedores (Polop, 1989) como, por ejemplo, *Akodon polopi* (Jayat et al., 2010), por lo que Ojeda et al. (2021) plantearon como hipótesis algo similar habría ocurrido con *Phyllotis* sp. 1.

Sin embargo, en esta Tesina se incorporaron al clado de *Phyllotis* sp.1 (con respecto a los estudios previos) una secuencia cuya localidad de colecta se encuentra en la zona sur de San Francisco del Monte de Oro en la provincia de San Luis a 1022 m.s.n.m. (D'Elía, 2003) y las dos secuencias de interés Vaq-8 y Vaq-14 provenientes de individuos capturados a 930 y 1250 m.s.n.m. respectivamente, dentro de la Reserva Natural Vaquerías, en roquedales rodeados de pastizal de altura cercanas al camino al Cuadrado.

Esta Reserva, ubicada a unos pocos kilómetros de la localidad de Valle Hermoso en el departamento de Punilla, forma parte de las Sierras Chicas de Córdoba, con una altitud normal que va desde los 850 a 1280 m.s.n.m., aunque su punto más alto, el Cerro Uritorco alcanza los 1979 m.s.n.m. (Toledo et al., 2010). El agrupamiento de estas tres secuencias dentro de *Phyllotis* sp. 1 sugiere que la distribución de este clado no estaría únicamente restringida las zonas de mayor altura de las Sierras Grandes de Córdoba, sino que pueden encontrarse poblaciones en roquedales a menores alturas dentro de las SPC. En base a esto, se plantea la necesidad de incorporar en análisis filogenéticos futuros, secuencias provenientes de muestreos en distintas localidades de la provincia de Córdoba y San Luis a diferentes altitudes. También es necesario realizar estudios de estructura genética de estas poblaciones con el fin de evaluar, por ejemplo, si la población de Pampa de Achala se mantiene aislada respecto del resto de poblaciones a menores altitudes o si existe conexión entre ellas.

En síntesis, en esta Tesina pudimos determinar que los ejemplares de Vaquerías efectivamente correspondían al género *Phyllotis*, en particular al clado *Phyllotis* sp. 1 dentro del complejo *P. xanthopygus*. También se pudo demostrar que la distribución geográfica de *Phyllotis* sp. 1 es mayor a la reportada previamente, puesto que abarcaría diferentes zonas de altitud intermedia a alta en las provincias de San Luis y Córdoba. Finalmente, en base a los resultados de los análisis estadísticos, consideramos que *Phyllotis* sp. 1 corresponde a una especie válida, que viviría en el centro de nuestro país desde hace al menos 480 mil años y que necesita una descripción formal con más estudios cuantitativos por parte de los taxónomos tradicionales, para poder asignarle un nombre científico apropiado.

Bibliografía

- Aldhebiani AY, 2018. Species concept and speciation. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 437-440.
- Alhajeri BH, Hunt OJ, Steppan SJ, 2015. Molecular systematics of gerbils and deomyines (Rodentia: Gerbillinae, Deomyinae) and a test of desert adaptation in the tympanic bulla. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(4), 312-330.
- Bozinovic F, Rosenmann M, 1988. Comparative energetics of South American cricetid rodents. *Comp. Biochem. Physiol.* 91(1), 195-202.
- Bradley RD, Baker RJ, 2001. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *J. Mammal*, 82, 960-973.
- Cabido M, Funes G, Pucheta E, Vendramini F, Díaz S, 1998. A chorological analysis of the mountains from Central Argentina. Is all what we call Sierra Chaco really Chaco? Contribution to the study of the flora and vegetation of the Chaco. XII. *Candollea* 53: 321-331.
- Cabrera AL, 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. *Enciclopedia ACME* 1-85.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- D'Elía G, 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics*, 19(4), 307-323.
- Dobzhansky T, 1950. Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist*, 74, 312-321.
- Drummond AJ, Rambaut A, Suchard MA, 2015. BEAST Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees, Version v1.8.2.
- Ezard T, Fujisawa T, Barraclough TG, 2009. SPLITS: Species' Limits by Threshold Statistics. R package version 1.0-14/r31.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.

- Ferro LI, Martínez JJ, Barquez RM, 2010. A new species of *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) from Tucumán province, Argentina. *Mammalian Biology*, 75(6), 523-537.
- Fujisawa T, Barraclough TG, 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724.
- Futuyma DJ, 2005. The tree of life: Classification and Phylogeny. En: *Evolution*. Sinauer associates inc. State University of New York at Stony Brook, pp. 19-39.
- García A, 2005. Similitud genética, estimada mediante marcadores moleculares, de *Phyllotis xanthopygus* de diferentes localidades de Argentina. Tesina de Grado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Goloboff P, Pol D, 2005. Parsimony and Bayesian phylogenetics. *Parsimony, phylogeny, and genomics*, 148-159.
- Goloboff P, Farris S, Nixon K, 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774-786.
- González-Ittig RE, Kandel N, Levis S, Calderón G, Salazar-Bravo J, Gardenal CN, 2014. 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.
- González-Ittig RE, Patton JL, Gardenal CN, 2007. Analysis of cytochrome-b nucleotide diversity confirms a recent range expansion in *Calomys musculinus* (Rodentia, Muridae). *J. Mammal.* 88: 777–783.
- Guindon S, Dufayard J, 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. *Syst. Biol.* 59, 307-321.
- Hershkovitz P, 1962. Evolution of Neotropical cricetine rodents (Muridae) with special reference to the phyllotine group. *Fieldiana Zoology*, 46, 1-524.
- Hillis DM, Bull JJ, 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42(2), 182-192.

- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP, 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550), 2310-2314.
- Jayat JP, D'Elia G, Pardiñas UFJ, Namen JG, 2007. A new species of *Phyllotis* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) from the upper montane forest of the Yungas of northwestern Argentina. *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson*. California: University of California Publications in Zoology, 775-798.
- Jayat JP, Ortiz PE, González FR, D'Elía G, 2016. Taxonomy of the *Phyllotis osilae* species group in Argentina; the status of the “Rata de los nogales” (*Phyllotis nogalaris* Thomas, 1921; Rodentia: Cricetidae). *Zootaxa*, 4083(3), 397-417.
- Jayat JP, Ortiz PE, Salazar-Bravo J, Pardiñas, UFJ, D'Elía G, 2010. The *Akodon boliviensis* species group (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Argentina: Species limits and distribution, with the description of a new entity. *Zootaxa*, 2409, 1–61.
- Jayat, JP, Teta P, Ojeda AA, Steppan SJ, Osland JM, Ortiz PE, Novillo A, Lanzone C, Ojeda RA, 2021. The *Phyllotis xanthopygus* complex (Rodentia, Cricetidae) in central Andes, systematics and description of a new species. *Zoologica Scripta*, 1-18.
- 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): pp. 1–14.
- Kramer KM, Monjeau AJ, Birney EC, Sikes RS, 1999. *Phyllotis xanthopygus*. *Mammalian Species*, 617, 1-7.
- Kuch M, Rohland N, Betancourt JL, Latorre C, Steppan S, Poinar HN, 2002. Molecular analysis of a 11 700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile. *Molecular ecology*, 11(5), 913-924.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
- Lessa, EP, D'elía G, Pardiñas UF, 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Molecular Ecology*, 19(15), 3031-3037.

- Lescano JN, Nori J, Verga E, Robino F, Bonino A, Miloch D, Ríos N, Leynaud GC, 2015. Anfibios de las Sierras Pampeanas Centrales de Argentina: diversidad y distribución altitudinal. Cuadernos de herpetología, 29.
- Li S, Pearl DK, Doss H, 2000. Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo. Journal of the American statistical Association, 95(450), 493-508.
- Martínez JJ, Gardenal CN, 2016. Phylogenetic relationships among species of the Neotropical genus *Graomys* (Rodentia: Cricetidae): contrasting patterns of skull morphometric variation and genetic divergence. Biological Journal of the Linnean Society, 118(3), 648-667.
- Mayden RL, 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (Eds.). Species: the units of biodiversity. Chapman and Hall, New York, 381–424.
- Mayr E, 1969. Principles of systematic zoology. Principles of systematic zoology.
- Michonneau F, 2016. Using GMYC for species delineation. Zenodo.
- Nores M, 1995. Insular biogeography of birds on mountain-tops in north western Argentina. Journal of Biogeography, 22: 61-70.
- Ojeda AA, Teta P, Jayat JP, Lanzone C, Cornejo P, Novillo A, Ojeda RA, 2021. Phylogenetic relationships among cryptic species of the *Phyllotis xanthopygus* complex (Rodentia, Cricetidae). Zool Scr. 50, 269-281.
- Pacheco V, Rengifo EM, Vivas D, 2014. A new species of Leaf-eared Mouse, genus *Phyllotis* Waterhouse, 1837 (Rodentia: Cricetidae) from northern Peru. Therya, 5(2), 481-507.
- Palma ER, Marquet PA, Boric-Bargetto D, 2005. Inter-and intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *Journal of Biogeography*, 32(11), 1931-1941.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K, 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. Bioinformatics 20, 289-290.
- Pardiñas UFJ, D'Elía G, Ortiz PE, 2002. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: estado actual de su conocimiento y prospectiva. Mastozoología Neotropical, 9(2): 209-252.

- Pearson OP, 1958. A taxonomic revision of the rodent genus *Phyllotis*. Publications in Zool. 56, 391-496.
- Pizzimenti JJ, De Salle R, 2008. Dietary and morphometric variation in some Peruvian rodent communities: the effect of feeding strategy on evolution. Biol. J. Linn. Soc. 13, 263-285.
- Polop JJ, 1989. Distribution and ecological observations of wild rodents in Pampa de Achala, Córdoba, Argentina. Studies on Neotropical Fauna and Environment 24: 53-59.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP, 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Syst. Biol. 55, 595-609.
- Rapela CW, Casquet C, Baldo EG, Dahlquist J, Pankhurst RJ, Galindo C, 2001. Las Orogénesis del Paleozoico Inferior en el margen proto-andino de América del Sur, Sierras Pampeanas, Argentina. Journal of Iberian Geology 27: 23-41.
- Rengifo EM, Pacheco V, 2015. Taxonomic revision of the Andean leaf-eared mouse, *Phyllotis andium* Thomas 1912 (Rodentia: Cricetidae), with the description of a new species. Zootaxa, 4018(3), 349-380.
- Rengifo, EM, Pacheco V, 2018. Phylogenetic position of the Ancash leaf-eared mouse *Phyllotis definitus* Osgood 1915 (Rodentia: Cricetidae). Mammalia, 82(2), 153-166.
- Riverón S, 2011. Estructura poblacional e historia demográfica del “pericote patagónico”, *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia: Sigmodontinae) en Patagonia argentina. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, opción Zoología. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Ministerio de Educación y Cultura y Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Robledo G, Renison D, 2010. Wood-decaying polypores in the mountains of Central Argentina in relation to *Polylepis* forest structure and altitude. Fungal Ecology, 3: 178-184.
- 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. Syst. Biol. 61, 539-542.

- Smith MF, Patton JL, 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biol. J. Linn. Soc.* 50, 149-177.
- Storz JF, Quiroga-Carmona M, Opazo JC, Bowen T, Farson M, Steppan SJ, D'Elía G, 2020. Discovery of the world's highest-dwelling mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(31), 18169-18171.
- Steppan SJ, 1993. Phylogenetic relationships among the Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae) using morphological characters. *Journal of Mammalian Evolution*, 1(3), 187-213.
- Steppan SJ, 1998. Phylogenetic relationships and species limits within *Phyllotis* (Rodentia: Sigmodontinae): concordance between mtDNA sequence and morphology. *Journal of Mammalogy*, 79(2), 573-593.
- Steppan SJ, Ramírez O, 2015. Genus *Phyllotis* Waterhouse, 1837. En: Patton JL, Pardiñas UFJ, D'Elía G (Eds.). *Mammals of South America, Volume 2. Rodents*. Chicago and London: University of Chicago Press, 535-555.
- Steppan SJ, Schenk JJ, 2017. Muroid rodent phylogenetics: 900-species tree reveals increasing diversification rates. *PloS one*, 12(8).
- Steppan SJ, Ramirez O, Banbury J, Huchon D, Pacheco V, Walker LI, Spotorno AE, 2007. A molecular reappraisal of the systematics of the leaf-eared mice *Phyllotis* and their relatives. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 134, 799-820.
- Tang CQ, Humphreys AM, Fontaneto D, Barraclough TG, 2014. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods in ecology and evolution*, 5(10), 1086-1094.
- Teta P, Jayat JP, Lanzone C, Novillo A, Ojeda A, Ojeda RA, 2018. Geographic variation in quantitative skull traits and systematics of southern populations of the leaf-eared mice of the *Phyllotis xanthopygus* complex (Cricetidae, Phyllotini) in southern South America. *Zootaxa*, 4446, 68–80.
- Toledo JM, Nóbile R, Bertoldi ML, 2010. Flora de la Reserva Natural Vaquerías (Dpto. Punilla, Córdoba). En: Plan Maestro de Manejo Reserva Natural Vaquerías. Universidad Nacional de Córdoba.

- Walker LI, Spotorno AE, Arrau J, 1984. Cytogenetic and reproductive studies of two nominal subspecies of *Phyllotis darwini* and their experimental hybrids. *J. Mamm.* 56, 220-230.
- Waterhouse GR, 1837. Characters of new species of the genus *Mus*, from the collection of Mr. Darwin. *Proceedings of the Zoological Society of London 1837*: 15-32.
- Wiley EO, Lieberman BS, 2011. *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons. 1: 1-21, 4: 85-106, 7: 203-227.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A, 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29, 2869-2876.