

## Tesis de Posgrado

# Organización, replicación y evolución de un ADN satélite del género *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia)

Rossi, María Susana

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rossi, María Susana. (1990). Organización, replicación y evolución de un ADN satélite del género *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2375\\_Rossi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2375_Rossi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rossi, María Susana. "Organización, replicación y evolución de un ADN satélite del género *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2375\\_Rossi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2375_Rossi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

***Organización, replicación y evolución  
de un ADN satélite del género Ctenomys  
(Octodontidae, Rodentia)***

por

**María Susana Rossi**

Tesis para optar al título de Doctor en Biología

*Director:* Dr. Jorge Zorzópolos

*Co-director:* Dr. Osvaldo A. Reig

1990

Biosidus — Laboratorio de Genética Molecular  
GIBE (Grupo de Investigaciones en Biología Evolutiva)

2375.  
y. 2

***“La vida no es un sentido, es un deseo.”***

Carlitos Chaplin  
en *Luces de la Ciudad*

***A Natalia***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Jorge Zorzópulos muy especialmente por el entusiasmo y creatividad que puso, a pesar de todas las dificultades, en el tema y la dirección de esta tesis.

A Osvaldo Reig por plantearme e introducirme en la problemática de un modelo biológico tan interesante como **Ctenomys**.

A ambos por la confianza que depositaron en mí.

A mis compañeros de laboratorio Esteban Corley, Alejandro Ruiz, Mauricio Seigelchifer, Adriana Kajón, Marta Gay, Patricia Martini, Raúl Franco y Rubén Fernández por las estimulantes discusiones. También a Daniela Centrón y Silvia Piñeiro.

A todos mis compañeros del GIBE, que son muchos para nombrarlos a todos; pero va mi agradecimiento a Alicia Massarini, Marcelo Ortells, M. Alicia Barros, Hernán Dopazo, Rosita Liazcovich, Silvia Blaustein y Georgina Barrantes porque ellos hicieron el trabajo de campo.

A mi madre, por haber despertado en mí curiosidad por la naturaleza, y por su cariño y apoyo.

A Aníbal, a quien quiero mucho. A quienes me acompañaron en momentos difíciles; a mi prima Ana, a Andrés y Alicia y a Nélica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme otorgado las becas desde 1987, no tanto por los sueldos.

A Julio Cortés, por haber tipeado muy cuidadosamente gran parte del texto.

Finalmente va mi reconocimiento al linaje de los tuco tuco por los malabarismos evolutivos a los que debieron hacer frente a lo largo de su historia evolutiva para diversificarse tanto en tan poco tiempo.

***INDICE***

---

1.	<b>OBJETIVO DE ESTA TESIS</b>	1
2.	<b>ABREVIATURAS EMPLEADAS</b>	3
3.	<b>INTRODUCCION</b>	6
3.1.	El género <b>Ctenomys</b> .....	7
3.1.1.	Ubicación taxonómica .....	7
3.1.2.	Antigüedad de los ctenominos fósiles .....	8
3.1.3.	Diversidad de especies y distribución geográfica .....	8
3.1.4.	Adaptaciones funcionales y morfológicas a la vida subterránea .....	9
3.1.5.	Estructura poblacional .....	11
3.1.6.	Variabilidad cariotípica .....	13
3.2.	Secuencias repetidas .....	13
3.2.1.	Secuencias interdispersas cortas ( <b>SINEs</b> ) .....	16
3.2.1.1.	Origen y evolución de las secuencias <b>SINEs</b> .....	17
3.2.2.	Secuencias interdispersas largas ( <b>LINEs</b> ) .....	19
3.2.3.	Secuencias altamente repetidas o ADN satélite .....	20
3.2.3.1.	ADN satélite, heterocromatina y estructura cromosómica .....	21
3.2.3.2.	ADN satélite, rearreglos cromosómicos y especiación .....	22
3.2.3.3.	ADN satélite como marcador filogenético .....	25
3.2.3.4.	Amplificación y evolución del ADN satélite .....	26
4.	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	28
4.1.	Origen de las especies estudiadas .....	29
4.2.	Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	29
4.3.	Transformación de bacterias .....	30
4.3.1.	Transformación de <b>E. coli</b> DH5-alfa IQ <sup>TM</sup> con plásmidos .....	30
4.3.2.	Transformación de <b>E. coli</b> DH5-alfa F' IQ <sup>TM</sup> con la forma replicativa del fago M13 .....	31
4.4.	Purificación de ácidos nucleicos .....	31
4.4.1.	Purificación de ADN de tejido hepático .....	31
4.4.2.	Purificación de ADN plasmídico y de la forma replicativa del fago M13 .....	32
4.4.3.	Purificación del ADN de simple cadena del fago M13 .....	32
4.4.4.	Cuantificación de ADN .....	33
4.5.	Condiciones de ensayos con enzimas de restricción y modificación .....	34
4.5.1.	Digestión de ADN con enzimas de restricción .....	34
4.5.2.	Incubación de ADN con enzimas de modificación .....	34
4.5.2.1.	ADN ligasa del fago T4 .....	34
4.5.2.2.	Fragmento Klenow de ADN polimerasa I .....	35
4.6.	Electroforesis analítica y preparativa del ADN en agarosa .....	35

---

---

4.6.1.	Electroforesis analítica del ADN en agarosa.....	35
4.6.2.	Electroforesis preparativa del ADN y electroelución .....	35
4.7.	Transferencia y fijación de ADN a filtros.....	36
4.7.1.	<i>Southern-blot</i> .....	36
4.7.2.	<i>Dot-blot</i> .....	36
4.8.	Marcación de sondas.....	37
4.8.1.	Marcación por el método de "nick translation" .....	37
4.8.2.	Marcación por el método de "random primer" .....	38
4.9.	Hibridación del ADN.....	39
4.9.1.	Hibridación con sondas radiactivamente marcadas.....	39
4.9.2.	Hibridación con sondas marcadas con UTP biotinilado.....	39
4.10.	Secuenciación del ADN .....	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1.	Secuencias repetidas en el genoma de <b>Ctenomys</b> .....	45
5.2.	Clonado de la secuencia repetida Pvu II de <b>Ctenomys</b> .....	48
5.3.	La SRPC en ADNs homólogos y heterólogos.....	52
5.4.	La SRPC esta presente en varias especies de <b>Ctenomys</b> .....	55
5.5.	Patrones de restricción de la SRPC en varias especies de <b>Ctenomys</b> .....	57
5.6.	Diferencias cuantitativas y cualitativas de la SRPC en diez especies de <b>Ctenomys</b> .....	59
5.6.1.	Diferencias cuantitativas .....	59
5.6.2.	Diferencias cualitativas.....	62
5.6.3.	Distribución geográfica de las especies estudiadas.....	62
5.7.	Secuencias relacionadas con SRPC en <b>C. oplmus</b> .....	64
5.8.	Secuencias relacionadas con la SRPC en Octodontoidea .....	67
5.9.	Secuencia nucleotídica de la SRPC.....	69
5.9.1.	Ausencia de repeticiones internas en la SRPC .....	73
5.9.2.	Metilación y abundancia de dinucleótidos CG en la SRPC .....	73
5.9.3.	Subsecuencias significativas de la SRPC .....	75
<b>6.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>83</b>
6.1.	Características generales del satélite SRPC.....	84
6.2.	Amplificación de la SRPC.....	85
6.3.	Historia evolutiva de la SRPC.....	88
6.4.	La SRPC como marcador de la divergencia en <b>Ctenomys</b> .....	89
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>92</b>

---

**1. OBJETIVO DE ESTA TESIS**



## 1. OBJETIVO DE ESTA TESIS

Los roedores sudamericanos del género **Ctenomys** son denominados en el lenguaje popular "tucu tucos", "tunduques", "anguyá tutús", "anguyá ibiguís" o "tojo tojos" por los sonidos con que los individuos se comunican entre sí, y también "ocultos" por los hábitos subterráneos. La diversificación del género, que ha tenido lugar durante un breve período de 1,8 millón de años en el Pleistoceno Medio, fue explosiva y condujo a la aparición de por lo menos 56 especies vivientes y 12 especies fósiles (Reig et al. 1990).

Las especies de **Ctenomys** presentan una gran variabilidad cariotípica, una de las más altas en mamíferos, con números diploides que van desde 10 a 72 (Reig y Kiblicky 1969, Feitas y Lessa 1984, Anderson et al. 1987, Massarini et al. 1990, Ortells et al. 1990).

El hecho de que la diversificación haya sido explosiva y amplia, es decir, que haya conducido a un gran número de especies (todas ellas de hábitos subterráneos) en un período relativamente corto desde el punto de vista evolutivo, sugiere que el proceso de especiación no fue esencialmente el resultado de la acumulación gradual de pequeñas diferencias entre poblaciones geográfica o ecológicamente aisladas, sino un proceso muy dinámico capaz de originar rápidamente barreras al flujo génico. **Ctenomys** es por lo tanto un modelo interesante para estudiar los mecanismos de dicho proceso especiogénico.

Actualmente se acepta que gran parte de la historia evolutiva de los genomas eucariotas es el reflejo de un proceso dinámico en el que pueden estar involucradas las secuencias repetidas y que la especiación es uno de los resultados de dicho proceso (Rose y Doolittle 1983).

Teniendo en cuenta esta hipótesis, en este trabajo me propuse investigar la posible relación entre la dinámica de cambio de las secuencias altamente repetidas en el genoma de las especies de **Ctenomys** y el proceso de especiación dentro del género. Si bien es muy difícil demostrar inequívocamente la causa de un proceso evolutivo, estudios de este tipo pueden incorporar elementos importantes en la elaboración de hipótesis sobre bases más amplias y concretas.

## **2. ABREVIATURAS EMPLEADAS**

## **2. ABREVIATURAS EMPLEADAS**

AcONH <sub>4</sub>	Acetato de amonio
AcONa	Acetato de sodio
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
Bisacrilamida	N,N'-metilenbisacrilamida
BPB	Azul de bromofenol
BSA	Seroalbúmina bovina
Ci	Curie (1 Ci $\approx$ 2,2 $\times$ 10 <sup>12</sup> dpm)
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNasa I	Desoxirribonucleasa I (de páncreas bovino)
dpm	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio
EtBr	Bromuro de etidio
h	Hora
IPTG	Isopropiltiogalactósido
kpb=kbp	Miles de pares de bases
l.t.	Localidad tipo
min	Minuto
ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol

RNasa A	Ribonucleasa A (de páncreas bovino)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
V	Voltio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-inolil-beta-D-galactopiranosido

### ***3. INTRODUCCION***

### **3. INTRODUCCION**

#### **3.1. El género Ctenomys**

##### **3.1.1. Ubicación taxonómica**

En el siguiente cuadro se especifica la ubicación taxonómica del género **Ctenomys** (Reig 1986). También se incluyen géneros de subfamilias relacionadas, algunos de los cuales han sido analizados en esta tesis. El número que figura entre paréntesis corresponde al número de especies conocidas.

Clase : Mamalia

Subclase: Theria

Infraclase: Eutheria

Orden: Rodentia

Infraorden: Caviomorpha

Superfamilia: Octodontoidea

Familia: Octodontidae

Subfamilia: Octodontinae

Géneros: **Octodon** (3)

**Octomys** (2)

**Octodontomys** (1)

**Plithanotomys (= Aconaemys)** (2)

**Spalacopus** (1)

Subfamilia: Ctenomyinae

Género: **Ctenomys** (56)

Familia: Echimyidae

Subfamilia: Echimyinae

Género: **Proechimys** (30) y 11 géneros más

### **3.1.2. Antigüedad de los ctenominos fósiles**

De acuerdo con el registro fósil, la rama que condujo a los ctenominos actuales existió como un único género y especie durante aproximadamente 5 millones de años, durante el Mioceno Superior (Reig et al. 1990). De esta especie fósil, **Paleoctodon simplicidens**, se derivaron cinco géneros de ctenominos, también fósiles: **Xenodontomys**, **Eucoelophorus**, **Actenomys**, **Praectenomys** y **Megactenomys** (Pascual et al. 1966, Villarroel 1975). De todos ellos, **Xenodontomys** y **Praectenomys**, cada uno con una sola especie conocida, son considerados como los únicos representativos del linaje **Ctenomys**. Villarroel (1975) describió a **Praectenomys**, derivado de **Xenodontomys**, en las capas del Plioceno Superior de la Formación Chapadmalensi Umala de Bolivia y postuló que ésta es la línea más cercana que conduce a los ctenominos actuales.

Hacia el Pleistoceno Medio ya se encuentran en Argentina, Uruguay y Bolivia más de 10 especies fósiles de verdaderos **Ctenomys** (Mones y Castiglioni 1979, Frailey et al. 1980). La explosiva cladogénesis del género comenzó entonces hace sólo 1,8 millón de años y condujo a por lo menos 56 especies, luego de un período mucho más prolongado de relativa estasis de los ctenominos, con la aparición de sólo unos pocos géneros pauci o monoespecíficos (Reig et al. 1990).

### **3.1.3. Diversidad de especies y distribución geográfica**

Varios autores (Honacki et al. 1982, Woods 1984, Reig et al. 1990) han publicado listas provisionarias de las especies vivientes de **Ctenomys**. Honacki y Woods reconocieron 33 y 32 especies, respectivamente. Reig y colaboradores reconocen 56 especies y 13 subespecies. Es probable que el número de especies sea aún mayor porque todavía no se han relevado detalladamente zonas muy probablemente habitadas por **Ctenomys**.

El tema del número de especies de un grupo de organismos no puede ser considerado independientemente de la comprensión del proceso evolutivo dentro de ese grupo. La acumulación de datos, aunque éstos fueran muy completos y del más diverso carácter, no puede proporcionar por sí sola los criterios para la clasificación de especies biológicas. Si cada uno o todos estos datos fueran considerados al margen de la comprensión del proceso evolutivo, las clasificaciones en especies resultantes tendrían forzosamente cierto grado de arbitrariedad, que en algunos casos sería muy difícil de evaluar.

Respecto a la distribución geográfica de las especies de *Ctenomys*, ésta abarca una extensa área de América del Sur, desde los 17° hasta los 54° de latitud sur, desde el Pacífico hasta el Atlántico, incluyendo el sur del Brasil, el sur del Perú, la mayor parte del Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina (Reig et al. 1990). La zona de mayor densidad está entre los 25° y 35° de latitud sur y entre los 58° y 70° de longitud este. Las especies de *Ctenomys* ocupan hábitat muy diversos: en la Puna a más de 4000 metros de altura (*C. opimus*, *C. peruanus*), en altas estepas montañosas del Infiernillo, Provincia de Tucumán (*C. tuconax*), hasta en los valles bajos del oeste chileno (*C. maulinus*), las dunas costeras de la Provincia de Buenos Aires (*C. australls*) o la pampa húmeda (*C. porteousi*). También se los encuentra en zonas desérticas o semidesérticas (*C. fulvus*, *C. knightii*), en bosques subtropicales (*C. sylvanus*) y hasta en las estepas fueguinas (*C. magellanicus*).

Sólo se han dado a conocer dos casos de parapatría: uno en Neuquén, entre *C. emillanus* y *C. halgi* (Pearson 1984), el otro entre *C. tucumanus* y *C. latro* en Trancas, Provincia de Tucumán (Reig et al. 1990).

Contreras y Reig (1965) documentaron el único caso de simpatría entre *C. australls* y *C. talarum recessus*, pero en este caso cada especie tiene preferencia por distintos tipos de suelo.

#### 3.1.4. Adaptaciones funcionales y morfológicas a la vida subterránea

Todas las especies de *Ctenomys* son herbívoras y tienen hábitos subterráneos. Además son muy similares desde el punto de vista anatómico, tanto externo como interno. Difieren entre sí en el color del pelaje y en el tamaño y pesos promedio (Reig et al. 1990). El peso corporal promedio de los pequeños *C. pundtl* llega a los 100 gramos, mientras que el de *C. conoveri*, por ejemplo, es de 1100 gramos. El pelaje dorsal es oscuro, casi negro en *C. argentinus* hasta variados tonos de pardo que suele parecerse al medio en que habita. Por ejemplo en *C. porteousi* (fig. 1) es oscuro, en *C. torquatus* es pardo rojizo y en *C. magellanicus* es pardo grisáceo. *C. australls* y *C. flamarioni*, que viven en dunas costeras de la Provincia de Buenos Aires y de Río Grande do Sul, respectivamente, tienen el lomo amarillento blanquecino.

Los tuco-tucos están adaptados a la vida subterránea, tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico. Viven en galerías subterráneas que tienen de 13 a 90 metros de largo, a una





FIGURA 1. *Ejemplar de Ctenomys porteousi.*

profundidad de 20 a 30 cm del suelo. Estas galerías las cavan con sus fuertes incisivos y sus sólidas patas delanteras, dotadas de fuertes uñas.

A pesar de que pasan la mayor parte del tiempo bajo tierra en la oscuridad, no tienen la reducción de los ojos y cola característicos de otros roedores subterráneos como *Spalax* (Nevo 1979).

Todas las especies son exclusivamente herbívoras: roen tallos y raíces de muchas plantas, pero durante períodos breves fuera de las cuevas recogen principalmente hojas de gramíneas, que también reservan en sus cuevas.

Pueden llegar a constituir plagas en plantaciones de papa, maíz, sorgo, etc., y en plantaciones de pinos, aunque es menos frecuente (Contreras 1966).

Como otros roedores subterráneos, los tuco-tucos desarrollan adaptaciones a la baja concentración de oxígeno y a la alta concentración de dióxido de carbono y minimizan la pérdida de energía para utilizarla en la construcción de las galerías (Busch 1987, 1989).

Respecto al aprovechamiento de oxígeno, en dos especies, *C. talarum* y *C. australis*, se encontró que la hemoglobina está relativamente concentrada en grandes glóbulos rojos (Busch 1987). El volumen de la sangre total es relativamente bajo para un pequeño mamífero, lo que involucra un mínimo gasto energético en el transporte sanguíneo. Además, la difusión de oxígeno está facilitada por una alta concentración de mioglobina muscular respecto a otros roedores subterráneos no roedores (Elordi y Busch 1990). El sistema buffer de la sangre está mejor desarrollado en estos roedores subterráneos que en la rata, por ejemplo (Busch 1987).

#### **3.1.5. Estructura poblacional**

Como en otros roedores de vida subterránea, las poblaciones están en general distribuidas en áreas de pequeña extensión y aisladas o semiaisladas unas de otras, dependiendo de las características del hábitat. Por ejemplo, en El Infiernillo, Provincia de Tucumán, a 300 metros de altura hay tres colonias de *C. tuconax* separadas entre sí 0,7 a 5 km (Reig et al. 1990). En cambio, en la Provincia de Buenos Aires, donde ciertos hábitat adecuados para los tuco-tucos pueden ser continuos, colonias de *C. porteousi* pueden encontrarse a una distancia mucho menor, lo que junto con otros datos indicaría la posibilidad de cierto grado de flujo génico entre ellas (Dopazo



FIGURA 1. *Ejemplar de Ctenomys porteusi.*

profundidad de 20 a 30 cm del suelo. Estas galerías las cavan con sus fuertes incisivos y sus sólidas patas delanteras, dotadas de fuertes uñas.

A pesar de que pasan la mayor parte del tiempo bajo tierra en la oscuridad, no tienen la reducción de los ojos y cola característicos de otros roedores subterráneos como *Spalax* (Nevo 1979).

Todas las especies son exclusivamente herbívoras: roen tallos y raíces de muchas plantas, pero durante períodos breves fuera de las cuevas recogen principalmente hojas de gramíneas, que también reservan en sus cuevas.

Pueden llegar a constituir plagas en plantaciones de papa, maíz, sorgo, etc., y en plantaciones de pinos, aunque es menos frecuente (Contreras 1966).

Como otros roedores subterráneos, los tuco-tucos desarrollan adaptaciones a la baja concentración de oxígeno y a la alta concentración de dióxido de carbono y minimizan la pérdida de energía para utilizarla en la construcción de las galerías (Busch 1987, 1989).

Respecto al aprovechamiento de oxígeno, en dos especies, *C. talarum* y *C. australis*, se encontró que la hemoglobina está relativamente concentrada en grandes glóbulos rojos (Busch 1987). El volumen de la sangre total es relativamente bajo para un pequeño mamífero, lo que involucra un mínimo gasto energético en el transporte sanguíneo. Además, la difusión de oxígeno está facilitada por una alta concentración de mioglobina muscular respecto a otros roedores subterráneos no roedores (Elordi y Busch 1990). El sistema buffer de la sangre está mejor desarrollado en estos roedores subterráneos que en la rata, por ejemplo (Busch 1987).

#### **3.1.5. Estructura poblacional**

Como en otros roedores de vida subterránea, las poblaciones están en general distribuidas en áreas de pequeña extensión y aisladas o semiaisladas unas de otras, dependiendo de las características del hábitat. Por ejemplo, en El Infiernillo, Provincia de Tucumán, a 300 metros de altura hay tres colonias de *C. tuconax* separadas entre sí 0,7 a 5 km (Reig et al. 1990). En cambio, en la Provincia de Buenos Aires, donde ciertos hábitat adecuados para los tuco-tucos pueden ser continuos, colonias de *C. porteus* pueden encontrarse a una distancia mucho menor, lo que junto con otros datos indicaría la posibilidad de cierto grado de flujo génico entre ellas (Dopazo

1990). Una situación parecida podría ocurrir con *C. australis* en las dunas costeras de la Provincia de Buenos Aires, donde el medio adecuado es continuo y relativamente extenso (Apfelbaum et al. en prensa).

Otro factor que depende de las condiciones del hábitat es la densidad de las poblaciones. Por ejemplo, en Mar del Cobo, Provincia de Buenos Aires, donde las condiciones ambientales son favorables, Busch y colaboradores (1989) encontraron una densidad de 65 individuos por hectárea de *C. talarum*. Por otro lado, Pearson (1959) calculó en poblaciones peruanas de *C. opimus*, donde las condiciones son más desfavorables, densidades de 2,5 individuos por hectárea.

Respecto al comportamiento, la mayoría de las especies conocidas son de hábitos solitarios y territoriales, con un solo individuo por tuquera, con excepción de la época de cría (Reig et al. 1990). Sin embargo, *C. sociabilis* es de hábitos sociales (Pearson y Christie 1985), como lo son también las hembras de poblaciones de *C. peruanus* (Pearson 1989).

Aún se sabe muy poco sobre la actividad migratoria de individuos entre demos cercanos. Pearson (1968) estudió una población de *C. talarum*, encontrando que al cabo de un mes 20 juveniles o subadultos nuevos ocupaban los bordes de la población; en cambio encontró velocidades mucho menores de dispersión en poblaciones peruanas (Pearson 1959).

Concluyendo, los estudios poblaciones en *Ctenomys* están todavía en sus comienzos y los datos de que se dispone hasta el momento indican que la distribución en demos aislados o semi-aislados, característica de los roedores subterráneos, se mantiene, aunque con excepciones dentro del género. No parece haber una regla que se cumpla en todas las especies del género, ni en todas las poblaciones de la misma especie.

La distribución de las colonias, el grado de flujo génico entre ellas, la migración, etc., parecen depender también de las características climáticas y ecológicas en general del hábitat.

Una metodología que permitiría el estudio fino de la estructura poblacional y de la actividad migratoria es el de *fingerprint* (Jeffreys et al. 1985a, Jeffreys et al. 1985b). Este análisis se basa en el estudio de la variación de secuencias polimórficas medianamente repetidas o minisatélites que tienen herencia mendeliana y que permiten por lo tanto descartar o establecer relaciones de parentesco entre individuos de una población. Estos análisis han sido utilizados recientemente en análisis de estructura poblacional (Wetton et al. 1987) y de actividad migratoria de aves rapaces (Longmire et al. 1990).

### 3.1.6. Variabilidad cariotípica

Las especies de **Ctenomys** exhiben una gran variabilidad cariotípica, una de las más altas de mamíferos (Reig y Kiblisky 1969)). En la Tabla I se presenta una lista parcial de especies, donde figuran los números cromosómicos (2n). Como se puede observar, la mayoría de las especies tiene un número cromosómico característico, no compartido por otras. Sin embargo, existen excepciones: hay dos grupos de especies que comparten el mismo número cromosómico. Un grupo está constituido por **C. australls**, **C. porteousi**, **C. mendocinus** y **C. azarae**, cuyo número cromosómico es 48 (Reig y Kiblisky 1969, Massarini et al. 1990). El otro grupo de especies está constituido por **C. maulinus**, **C. robustus**, **C. fulvus** y **C. opimus**, de 2n=26 (Gallardo 1979).

De este panorama resulta claro que existirían dos patrones de evolución cariotípica en **Ctenomys**: uno donde el cariotipo se ha conservado (en los dos grupos de especies mencionadas) y otro, que involucra a la mayor parte de las especies, en que el cariotipo es específico de especie y parece haber seguido una evolución más dinámica. La ocurrencia simultánea de dos patrones de evolución cariotípica dentro del límite de un solo género ocurre también en las tusas (*pocket gophers*) de Estados Unidos, del género **Thomomys** (Patton y Jang 1977). En estos roedores subterráneos, que comparten con **Ctenomys** características morfológicas y ecológicas, existen dos grupos de especies: el grupo **talpoides**, que tiene cariotipos específicos de especie, y el grupo **bottae**, de mayor homogeneidad cariotípica. El grupo **bottae** de **Thomomys** comparte con el grupo de 2n=48 cariotipos que se caracterizan por brazos enteros heterocromáticos, con pérdidas o deleciones que originan polimorfismos en las bandas C (Patton y Sherwood 1982, Massarini et al. 1990).

### 3.2. Secuencias repetidas

Una gran proporción del genoma eucariota está compuesto por secuencias repetidas. Esta proporción puede oscilar desde un 10% en eucariotas inferiores hasta un 80% en plantas y anfibios. Se ha estimado, por ejemplo, que más del 95% del ADN total de las plantas de guisantes son secuencias repetidas (Thompson y Murray 1980).

Un problema planteado hace ya varios años relacionado con las secuencias repetidas es la enorme variación en el contenido de ADN de las células eucariotas (valor C) (Hardman 1986). Las

TABLA I. *Información cariotípica de algunas especies del género Ctenomys*

2n = número diploide  
(Tomada de Reig et al. 1990.)

<i>Especie</i>	<i>2n</i>
<i>C. steinbachi</i>	10
<i>C. occultus</i>	22
<i>C. maullinus</i>	26
<i>C. optimus</i>	26
<i>C. fulvus</i>	26
<i>C. robustus</i>	26
<i>C. fodax</i> (L. Blanco, Arg.)	28
<i>C. sp.</i> (Lonquimay, Chile)	28
<i>C. tucumanus</i>	28
<i>C. boliviensis</i>	34-46
<i>C. magellanicus</i>	34-36
<i>C. knightii</i> (Cardones, Arg.)	36
<i>C. sp.</i> (Pto. Madryn, Arg.)	38
<i>C. latro</i>	40-42
<i>C. sp.</i> (San Miguel, Arg.)	42
<i>C. argentinus</i>	44
<i>C. torquatus</i>	44-46
<i>C. porteousi</i>	47-48
<i>C. azarae</i>	47-48
<i>C. mendocinus</i>	47-48
<i>C. australls</i>	48
<i>C. flamarloni</i>	48
<i>C. talarum</i>	46-50
<i>C. minutus</i>	46-55
<i>C. roigii</i>	48
<i>C. conoveri</i>	48-50
<i>C. rionegrensis</i> (?) (E. Ríos, Arg.)	48-56
<i>C. rionegrensis</i>	50
<i>C. yolandae</i>	50
<i>C. haigi</i>	50
<i>C. sociabilis</i>	56
<i>C. perrensis</i>	50-56
<i>C. pearsoni</i>	56-70
<i>C. sp. km14</i> (Saladas, Arg.)	58
<i>C. tuconax</i>	58-61
<i>C. sp.</i> (San Roque)	62
<i>C. dorbignyi</i>	70

variaciones en el valor C no sólo ocurren entre taxones sino también entre miembros de un mismo taxón. En particular en este último caso, especies que expresan el mismo número de genes tienen diferencias importantes en los valores de C. La mayor parte de la variación de los valores de C no se debe a variaciones en el número de genes de copia única, sino en la cantidad de secuencias repetidas. Este hecho planteó inmediatamente el problema de cuál es la naturaleza y la función de estas secuencias. Por un lado surgió una corriente de opinión que insistió en la necesidad de encontrar la "función" del ADN repetido, ya que no era concebible que un ADN tan abundante no la tuviera. Por otro lado, otros consideraron al ADN repetido como "ADN egoísta" o "ADN basura", haciendo referencia a que este tipo de ADN carece de función y sólo se mantiene como consecuencia de su capacidad de replicarse eficientemente (Doolittle y Sapienza 1980, Orgel y Crick 1980). Es posible que no exista, por lo menos para parte de las secuencias repetidas, una función directa relacionada con su estructura, pero también es muy difícil pensar que la presencia de dichas secuencias y su dinámica de cambio no influyan en absoluto en el devenir del genoma que las posee. Su "función", desde el punto de vista evolutivo, podría ser el establecimiento de nuevas relaciones entre el conjunto de genes estructurales y regulatorios que resulten en variaciones que sirvan como sustrato del proceso evolutivo. Esta "función" *per se* puede ser la causa de la perpetuación de las secuencias repetidas en el genoma eucariota.

Las secuencias repetidas se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su distribución y número de copias en el genoma. Las secuencias cuyo número de copias es mayor de  $10^6$  por genoma haploide se denominan secuencias satélites. Todas estas secuencias comparten una característica: están repetidas en cadenas compuestas por un alto número de eslabones constituidos por una misma secuencia básica (Burtlag 1980). Más allá de esta propiedad, los ADN satélites son bastante diversos.

Otro tipo de secuencias tienen un grado de repetición menor: desde decenas hasta centenas de miles de copias por genoma haploide, y están dispersas con una o pocas copias aisladas a lo largo del genoma. Estas secuencias se denominan medianamente repetidas y se ha postulado que se expanden en el genoma mediante retrotransposición, es decir, se transcriben en una molécula de ARN intermediaria que se copia en moléculas de ADN con la subsecuente integración de esas copias en nuevos sitios del genoma (ver más adelante).

Las secuencias medianamente repetidas se han dividido en dos clases: SINEs (*short interspersed elements*), de 70 a 300 pb de largo, y LINEs (*long interspersed elements*), de hasta 6 a 7 kpb de largo, de acuerdo con la terminología de Singer (1982).



### **3.2.1. Secuencias interdispersas cortas (SINEs)**

Las SINEs han sido encontradas en los genomas humanos y de la mayoría de los mamíferos (Schmid y Jelinek 1982, Sharp 1983, Ryan y Dugaiczky 1989, Labuda y Striker 1989) e inclusive también se han descrito secuencias homólogas en invertebrados (Benfante et al. 1989).

La familia Alu es la más conocida de este grupo de secuencias y presenta varias características en común con los retrotransposones. Está repetida unas 300.000 veces en el genoma haploide humano (Jelinek y Schmid 1982), aunque algunos autores dan cifras de 900.000 (Hwu et al. 1986), separadas por aproximadamente 4 kpb (Britten et al. 1988).

La estructura monomérica es una secuencia de 300 pb en humanos, flanqueada por dos secuencias repetidas directas de 7 a 20 pb, que no están conservadas en los diferentes miembros de la familia (Schmid y Jelinek 1982). Estas cortas repeticiones directas que las flanquean son una de las características que este tipo de secuencias comparte con los transposones. Por analogía con las repeticiones directas de los transposones bacterianos (Calaos y Miller 1980) o de los elementos transponibles en eucariotas (Cameron et al. 1979), las repeticiones directas de las SINEs podrían ser el resultado de la duplicación del ADN en los sitios de inserción (Jagadeeswaran et al. 1981, Sharp 1983, Rogers 1985).

El monómero de la secuencia Alu tiene dos sitios promotores para la ARN polimerasa III y se han encontrado *in vivo* transcritos correspondientes a la totalidad de la secuencia monomérica (Duncan et al. 1979); es decir, no existen en el monómero sitios internos de terminación de la transcripción.

En humanos la secuencia de 300 pb es dimérica y pareciera haberse originado por duplicación de una secuencia original de 150 pb. En el ratón y en el hámster la estructura básica de las secuencias Alu tiene 130 pb (Rubin et al. 1980).

Las secuencias Alu poseen aproximadamente un 80% de identidad entre sus miembros (Jagadeeswaran et al. 1981), aunque algunas regiones están especialmente bien conservadas. Entre ellas, el poli A del extremo 3', que señala la terminación del monómero, y una secuencia rica en T ubicada a distancia variable del poli A (Jagadeeswaran et al. 1981). La transcripción ocurriría hasta esta zona rica en T y el apareamiento entre estas dos zonas por "fold back" cebaría la síntesis del ADN copia por transcripción reversa. Los ADNs copias se insertarían en distintas zonas en el genoma, dispersando de esa forma la secuencia (Van Arsdell et al. 1981). Los pasos que

involucran la inserción de las nuevas copias aún no están claros, aunque los sitios de inserción serían ricos en A+T (Daniels y Deiningner 1985).

Además de la familia Alu existen otros tipos de secuencias SINE, con características similares a la primera: la familia B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de roedores, la familia ID (Identifier) de ratón, las familias Monomer y tipo II descritas en un primate prosimio, **Galago crassicaudatus**, y la familia C del conejo (Cheng et al. 1984). Todas ellas tienen promotores de ARN polimerasa III y algunas de ellas guardan homología entre sí.

#### **3.2.1.1. Origen y evolución de las secuencias SINEs**

Quizás el hallazgo más importante respecto al origen de las secuencias SINEs haya sido el de Ullu y Tschudi (1984), quienes encontraron que 100 nucleótidos del extremo 5' y 50 nucleótidos del extremo 3' de los 300 nucleótidos del ARN 7S tienen una homología del 80% con el consenso de las secuencias Alu. El ARN 7S forma parte de la partícula ribonucleoproteica que interviene en la migración de las proteínas a través de la membrana del retículo endoplasmático. Dado que el ARN 7S está mucho más conservado en todas las especies desde **Drosophila** hasta el hombre que los miembros de la familia Alu, se acepta que estos últimos son derivados del primero y no a la inversa (Deiningner y Daniels 1986).

También otras secuencias SINEs tienen homologías con ARNs, en particular con ARNs de transferencia (ARNt), y parecen haber derivado de éstos. La familia Monomer derivaría del ARNt de metionina y la familia ID del ARNt de alanina, mientras que parte de la secuencia de la familia B derivó del ARNt de metionina y otra del ARN 7S (Singer 1982, Deiningner y Daniels 1986 y trabajos allí mencionados).

Los genes de los que derivaron todas estas secuencias parecen haber sido originalmente genes funcionales y activos sometidos a presión de selección. Alteraciones en la estructura de alguna copia del gen parental derivaron en el silenciamiento del gen desde el punto de vista transcripcional, convirtiéndolo en un pseudogen. Esta secuencia pudo, mediante la acumulación de ciertos cambios, convertirse eventualmente en una secuencia transcripcionalmente activa y capaz de transponerse (secuencia progenitora). Esto fue propuesto por Deiningner y Daniels (1986) y coincide con el punto de vista de que las secuencias SINEs pueden ser consideradas como pseudogenes procesados (Sharp 1983).

Respecto a la edad de las SINEs, se considera a la familia Alu como la más antigua, por su amplia distribución. En cambio, las familias B e ID presentes en roedores no se encuentran en primates. Inversamente, las familias tipo II y Monomer de primates no están presentes en roedores. Es decir, estas familias se originaron posteriormente a la divergencia entre primates y roedores, en tiempos evolutivos recientes.

La amplificación de este tipo de secuencias es un proceso dinámico y continuo en el tiempo, como lo ejemplifica el descubrimiento de un nuevo miembro de la familia Alu en el gorila que está ausente en humanos, chimpancés y macacos (Ryan y Dugaiczky 1989) y el hallazgo de SINEs insertadas en secuencias de reciente formación tales como pseudogenes y ADNs satélites específicos de especie (Deininger y Daniels 1986).

Se ha postulado (Dover 1982) que la divergencia entre miembros de una misma familia debería ser menor que la esperada, porque éstos evolucionan de manera concertada, de forma tal que se tiende a la homogeneización de la familia. El intercambio desigual y la conversión génica, que operarían aun cuando los miembros de la familia estuviesen localizados en distintos cromosomas (Ohta y Dover 1984), son los mecanismos por los cuales las secuencias de los miembros de la familia tenderían a homogeneizarse.

Sin embargo, Bains (1986) estudió la velocidad de evolución de las secuencias Alu y de algunas secuencias adyacentes sin encontrar diferencias significativas, por lo cual, si bien no se descarta que estas secuencias estén sufriendo en alguna medida conversión génica o intercambio desigual, éstos no parecen ser los principales mecanismos de evolución. Es posible que el grado de divergencia entre los miembros de la familia, que es la mitad de la esperable para una evolución neutra (Deininger y Daniels 1986), pueda explicarse por la existencia de más de un elemento parental transposicionalmente activo.

El rol de este tipo de secuencias en la evolución y funcionalidad del genoma de mamíferos ha sido discutido desde su descubrimiento. Muchas veces las SINEs se insertan en zonas aparentemente inactivas del genoma y no acarrean ningún efecto fenotípico evidente. Sin embargo, en algunos casos miembros de la familia Alu forman parte de las secuencias codificantes de genes activos (Sharma et al. 1987). Por otro lado, miembros de la familia B de roedores y C del conejo proveen señales de poliadenilación funcionales a varios genes (Kres et al. 1984, Krane y Hardison 1990). Estos datos indicarían que por lo menos algunos miembros de las secuencias SINEs podrían ser mantenidos por el proceso de selección.

### 3.2.2. Secuencias interdispersas largas (LINEs)

Las secuencias LINEs, caracterizadas originalmente en los genomas de humanos, primates y roedores, se han aislado en los últimos años de organismos como **Drosophila**, tripanosomas, **Neurospora** y **Zea mays**.

Una de las diferencias con las secuencias SINEs (además de su largo) reside en que su secuencia contiene marcos de lectura abiertos. Una de las familias mejor caracterizadas es la L<sub>1</sub>, también llamada Kpn I en primates o Bam HI, Bam 5 o MIF-1 en ratón. El análisis de sus transcritos reveló que son productos de la ARN polimerasa III (Skowronski y Singer 1985). A pesar de que originalmente se especuló que la variación en el largo de los transcritos en la región 5' se debía típicamente a la detención de la transcriptasa reversa por "fold back" (Roger 1985), en realidad aún no hay datos concluyentes que confirmen que la dispersión de este tipo de secuencias ocurra por retrotransposición.

Las secuencias L<sub>1</sub> parecen haberse originado en un gen codificante, y de hecho hay zonas de la secuencia altamente conservadas en distintas especies, lo que sugiere que estas secuencias podrían evolucionar bajo presión de selección (Deininger y Daniels 1985).

El genoma de **Drosophila** contiene una gran variedad de familias LINEs, relacionadas con los retrotransposones. La secuencia completa de estos elementos contiene dos marcos de lectura abiertos: uno tiene homología con la transcriptasa reversa y el otro tiene los dominios ricos en cisteína típicos de la poliproteína retroviral *gag*. En este caso la hipótesis de la retrotransposición como mecanismo de amplificación y dispersión parece ser la más probable (Di Nocera y Sakaki 1990).

Uno de los sistemas mejor estudiados de retrotransposición en **Drosophila** es el sistema P-M. Por mecanismos aún no totalmente dilucidados, retrotransposones conocidos como factores P, que son inactivos en machos de cepas P, transponen con muy alta frecuencia en el genoma de hembras de cepas M cuando ambas cepas se cruzan. Los híbridos de esta cruce presentan una serie de anormalidades, como esterilidad, recombinación en los machos atípica en **Drosophila** y alta frecuencia de rearrreglos cromosómicos (Kidwell et al. 1977), imposibilitando la retrocruza de estas cepas con las originales. Este fenómeno se conoce como disgénesis híbrida.

Un sistema análogo al P-M es el I-R, descrito también en **Drosophila**, con efectos semejantes a la disgénesis (Yannopoulos et al. 1987). Como lo señalaron Rose y Doolittle (1983), la disgénesis

híbrida es el ejemplo paradigmático de la acción especiogénica potencial de estos transposones en la especiación filética (dentro de especies) y en poblaciones mendelianas.

La capacidad de estos elementos móviles para producir reordenamientos cromosómicos ocurre también en levaduras (elementos Ty) y en el maíz, donde McClintock (1951) aportó la primera evidencia de la asociación entre este tipo de elementos y duplicaciones, deficiencias, inversiones y translocaciones en los cromosomas.

Por la capacidad de producir mutaciones por inserción y en algunos casos de modificar la expresión génica por efectos de posición (Bishop 1987), se le ha asignado a estas familias de elementos transponibles un papel muy importante en la dinámica de la evolución del genoma y en su continua reorganización.

### **3.2.3. Secuencias altamente repetidas o ADN satélite**

Las secuencias altamente repetidas o ADN satélite no se caracterizan por poseer una secuencia nucleotídica particular ni por la organización interna de la secuencia básica, como en el caso de las secuencias SINEs o LINEs. En general no poseen marcos de lectura abiertos ni actividad transcripcional.

Estas secuencias tienen una estructura básica o monómero de largo variable que está repetido uno o varios millones de veces en el genoma y dispuesto en cadenas compuestas por una gran cantidad de monómeros, aunque en algunos casos se han encontrado copias aisladas en regiones cromosómicas particulares (Hanklen y Schmidt 1987).

Se han utilizado tres métodos experimentales para el aislamiento de las secuencias altamente repetidas del ADN total:

a) Separación de la fracción doble cadena resultante de la hibridación ADN-ADN a valores de Cot intermedios. Esta metodología es particularmente útil en el caso de secuencias con monómeros cortos.

b) Análisis de los clones resultantes de bibliotecas genómicas totales o parciales. Una alta proporción de estos clones tendrán secuencias altamente repetidas y pueden diferenciarse de los otros por hibridación con ADN total.

c) Digestión del ADN total con enzimas de restricción y separación de los fragmentos resultantes en geles de agarosa. La secuencia satélite se visualizará como una o varias bandas claramente distinguibles. La(s) banda(s) se extraen del gel y se clonan en plásmidos bacterianos. Esta es la metodología utilizada en esta tesis.

#### **3.2.3.1. ADN satélite, heterocromatina y estructura cromosómica**

El término heterocromatina hace referencia a cromosomas o regiones cromosómicas que permanecen condensadas en la interfase y profase y que no se descomprimen en la telofase como el resto de los cromosomas. En mamíferos se distinguen dos tipos de heterocromatina: la constitutiva, que está presente en ambos cromosomas homólogos, y la facultativa, que resulta de la inactivación de uno de los dos cromosomas X en la hembra. Citológicamente estas zonas se distinguen por colorearse intensamente cuando se tiñen los cromosomas con Giemsa y se las denomina zonas C positivas o bandas C cuando son intercalares (Arrighi et al. 1974).

La localización de muchos ADNs satélites en zonas heterocromáticas mediante técnicas de hibridación *in situ* ha llevado a varios autores a sugerir una asociación entre ambos (Pardue y Gall 1970, John y Miklos 1979, John 1986). La localización de estos ADNs satélites es en la mayoría de los casos centromérica o pericentromérica, pero también intercalar o telomérica (Manueledis 1982).

La frecuente asociación entre heterocromatina constitutiva y las regiones centroméricas ha inducido a concluir que la heterocromatina podría ser importante para el control de la adecuada actividad cinética del centrómero durante la meiosis (Walker 1971). La eliminación de regiones heterocromáticas de las células somáticas y la retención en las líneas germinales en algunas especies animales apoya también la posible funcionalidad de la heterocromatina en la meiosis. Sin embargo, aunque existen contraejemplos, experimentos utilizando cromosomas X de *Drosophila* delecionados en la heterocromatina no demostraron un comportamiento menos exitoso en la disyunción meiótica que otros intactos (Yamamoto y Miklos 1978).

Manueledis (1982) postuló que la heterocromatina interviene en la determinación tridimensional del núcleo interfásico y que es la organización de las secuencias satélites la que posibilita la asociación física entre los cromosomas.

El patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva (patrón de bandas C) es característico de cada cromosoma. Sin embargo, es frecuente encontrar polimorfismos heterocromáticos, donde la cantidad o la localización de la heterocromatina varía de un individuo a otro de la misma población. Estos polimorfismos en las bandas C en muchos casos no tienen efectos fenotípicos importantes. En particular los cromosomas 1, 9, 16 e Y humanos son propensos al polimorfismo en el tamaño de sus bandas C, siendo sus portadores normales y fértiles (John 1986). Sin embargo, aunque controvertidos, existen indicios de que algunas secuencias satélites heterocromáticas están asociadas a cambios y reordenamientos en la estructura de los cromosomas.

### **3.2.3.2. ADN satélite, rearrreglos cromosómicos y especiación**

En muchos casos existe una marcada variabilidad de la heterocromatina y las secuencias satélites entre especies o grupos de especies. Varios autores han postulado que los grupos que contienen gran cantidad de heterocromatina son propensos a sufrir cambios cariotípicos. Esta hipótesis se originó en observaciones como las de Yunis y Yasmineh (1971), que señalaron que algunas subfamilias de roedores como Muridae, Cricetidae y Microtinae (= Arvicolidae), que tienen grandes cantidades de heterocromatina pericentromérica, muestran una gran diversidad de cariotipos y de especies. En contraposición, el grupo de los felinos, por ejemplo, tiene relativamente poca cantidad de heterocromatina y pocas especies con cariotipos similares.

Estudios sobre la heterocromatina en drosófilas de Hawai mostraron que los puntos de ruptura de las inversiones y translocaciones en los cromosomas politénicos están asociados a secuencias repetidas (ver John 1986), aunque en este caso no hay evidencias claras de que estos rearrreglos traigan como consecuencia especiación.

Secuencias satélites han sido asociadas a rearrreglos cromosómicos también en el caso de los cérvidos. El cariotipo original de  $2n=46$  se ha reducido mediante fusiones en tándem y robertsonianas a un cariotipo de  $2n=7$  y éste proceso está asociado a la pérdida del componente IA del ADN satélite presente en este grupo (Bogenberger et al. 1987).

Peacock y colaboradores (1982) estudiaron especies de canguros que mostraban grandes diferencias en el principal ADN satélite. En una de ellas el satélite era pericentromérico en todos los autosomas y centromérico en el cromosoma X. En otra especie el ADN satélite no estaba presente en los autosomas y se encontraba amplificado en el X. En la última especie, en cambio,

estaba presente en el centrómero del X y sólo en cuatro autosomas teloméricos. Estas diferencias tan drásticas en la cantidad y localización del ADN satélite de especies cercanas indujeron a los autores a señalar que la amplificación y el reordenamiento de estas secuencias "pueden explicar el rápido establecimiento de discontinuidades genéticas, el que probablemente no pueda ser generado por sustituciones nucleotídicas dentro de los genes" (Peacock et al. 1982).

Un modelo interesante para estudiar la relación entre secuencias repetidas y la evolución del genoma lo constituyen las especies de cereales. Todas comparten el mismo número de cromosomas y tres familias de secuencias repetidas. Sin embargo, de acuerdo con experimentos de *Southern-blot*, la cantidad y los patrones de distribución de estas familias de secuencias varían enormemente entre una especie y otra (Flavell 1982). La proporción del ADN total que está compuesto por secuencias repetidas específicas de cada especie es de 16%, 22%, 28% y 58% para el trigo, centeno, cebada y avena, respectivamente (Rimpau et al. 1980). Además, experimentos de cruce entre las especies revelaron que existe una buena correlación entre las especies con mayores diferencias cuantitativas y cualitativas en sus secuencias repetidas y la frecuencia de *crossing-over* (medida como frecuencia de quiasmas) en los híbridos resultantes de la cruce entre especies (Flavell 1982).

Recientemente se han descrito las secuencias (TTAGGG)<sub>n</sub> que están muy conservadas en los cromosomas de una gran variedad de organismos como *Tetrahymena* o vertebrados desde los peces hasta el hombre (Meyne et al. 1990). Estas secuencias forman parte del ADN satélite de algunas especies de mamíferos (Fry y Salser, 1977, Fanning 1987, Árnason et al. 1988). La localización de estas secuencias es telomérica, pero también intersticial en algunas especies, y se ha postulado que están involucradas en rupturas, fragilidad y recombinación de los cromosomas, originando fusiones y fisiones (Hastie y Allshire 1989). La variación de los patrones de distribución cromosómica de estas secuencias sugiere que pueden estar relacionadas con los mecanismos de evolución cariotípica (Meyne et al. 1990).

La amplificación diferencial y la distribución de las secuencias repetidas probablemente determinen distintas estructuras del genoma en cada una de las especies y, por lo tanto, la reducción del adecuado apareamiento cromosómico entre ellas. Dado que los híbridos con fallas en la recombinación meiótica, es decir, durante la gametogénesis, son en general estériles, esto podría constituir un mecanismo de aislamiento reproductivo postcigótico entre especies (Flavell 1982). Diferencias en las secuencias repetidas podrían también originar una disminución de la viabilidad de los híbridos por causas distintas a la falla en el apareamiento meiótico. Aparentemente el endosperma de híbridos de trigo y centeno no desarrolla normalmente, porque la heterocromatina



de los cromosomas del centeno es de replicación tardía y no replica lo suficientemente rápido como para permitir su desarrollo normal (Flavell 1982).

Varios autores (Fry y Salser 1977, Flavell 1982, Rose y Doolittle 1983) concuerdan en señalar el potencial efecto especiogénico de las amplificaciones, reordenamientos y recambios en general de las secuencias satélites. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el reducido número de organismos portadores de reordenamientos tales que la cruza con los restantes miembros de la población resultará en progenie estéril estarían en situación desventajosa y tenderían a desaparecer. Una situación que revertiría esto último es que, además del reordenamiento (o quizás a causa de él), estos individuos fuesen portadores de alelos que les confirieran algún tipo de ventaja, por ejemplo en la explotación de algún nuevo nicho ecológico. La relación entre secuencias repetidas y especiación no sería en absoluto lineal y dependería, además, de factores no exclusivamente genéticos, sino también ecológicos y poblacionales.

Sin embargo, así como hay ejemplos que indican que podría existir una relación entre ADN satélite y rearrreglos cromosómicos, también existen contraejemplos. Por ejemplo, en las tusas (*pocket gophers*) del género *Thomomys*, como se mencionó antes, en el grupo *bottae* la heterocromatina constituye el 60% del genoma total y, sin embargo, no hay rearrreglos cromosómicos importantes. Por otro lado los rearrreglos cromosómicos y la variabilidad cariotípica son muy altos en *T. talpoides*, donde la heterocromatina constituye una pequeña porción del genoma. (Patton y Sherwood 1982).

Algunas especies del género *Rattus* difieren entre sí en 11 rearrreglos cromosómicos y sin embargo las secuencias repetidas constituyen solamente el 5% del genoma (Miklos et al. 1980).

Como plantean Rose y Doolittle (1983), la hipótesis de la relación entre secuencias repetidas, rearrreglos cromosómicos y especiación es "intuitivamente atractiva, pero aún debe ser probada". Además siempre que se enfoque el problema de la especiación, hay que poder discriminar claramente si un fenómeno es causa o consecuencia del proceso de especiación, lo que no resulta trivial en muchos casos. Algunos modelos interesantes que permiten aproximarse al problema son aquellos en los que el investigador puede dirigir las cruza intrapoblacionales, como por ejemplo en plantas en general o en las moscas del género *Drosophila*.

De cualquier manera, hay que considerar que bajo la denominación de ADN satélite se agrupa una gran variedad de secuencias que difieren en cuanto a secuencia nucleotídica, organización, distribución en el genoma, etc., y que, por lo tanto, sus efectos pueden no ser similares.

Más allá de la hipotética relación causal entre secuencias repetidas y especiación, lo que sí resulta evidente es que este tipo de secuencias acompañan el proceso evolutivo dentro de los distintos linajes y que, por lo tanto, pueden ser marcadores de estos procesos.

#### 3.2.3.3. ADN satélite como marcador filogenético

Contrariamente a lo que se creyó en un principio, muchos ADNs satélites no son específicos de especie. Una determinada familia de ADN satélite puede estar presente en taxones lejanamente relacionados, como miembros de una misma familia u orden o aun en órdenes distintos (Fanning 1987). En los últimos años han comenzado a utilizarse las secuencias altamente repetidas en estudios filogenéticos (Gillespie et al. 1982, Widegren et al. 1985, Árnason y Widegren 1986, Bogenberger et al. 1987, Árnason et al. 1988, Dod et al. 1989).

Mediante mecanismos relacionados a su modo de amplificación (ver 3.2.3.4), las secuencias altamente repetidas pueden variar algunas características sin perder su identidad a lo largo del tiempo y, por lo tanto, dar indicios de las relaciones filéticas entre los grupos que las comparten.

Uno de los estudios más completos realizados con este tipo de secuencias se desarrolló en mamíferos marinos. El orden Cetacea muestra una gran uniformidad cariotípica y los estudios de tipo anatómico y paleontológico no han permitido establecer si las dos familias del orden, odontocétidos y misticétidos, tienen o no un ancestro común. Cuando se analizó mediante *Southern-blot* la distribución de un ADN satélite de 1730 pb en todas las familias del orden, se observó no sólo que éste estaba presente en todas, sino además con los mismos patrones de distribución, lo cual es incompatible con un origen difilético (Árnason et al. 1984, Widegren et al. 1985).

En otro grupo de mamíferos marinos, el de las focas y los leones marinos (pinnípedos), el estudio detallado de los distintos componentes del ADN satélite, mediante técnicas de hibridación *in situ*, ha permitido seguir la evolución cariotípica del grupo y en particular de los cromosomas sexuales (Bogenberger et al. 1987).

Finalmente, estudios de un ADN satélite del género **Mus** permitieron a Dod y colaboradores (1989) identificar la especie de divergencia más temprana de un subgrupo de especies del género.

#### **3.2.3.4. Amplificación y evolución del ADN satélite**

Los eslabones que componen las cadenas de los ADNs satélites están constituidos por secuencias de tamaños variables, en general mayores de 100 pb. Sin embargo, en otros casos las repeticiones son mucho más cortas, de unos pocos nucleótidos. Estas secuencias cortas son comunes en muchos genomas eucariotas; por ejemplo, las repeticiones de poli dC-dA están distribuidas en una gran cantidad de especies (Rogers 1983, Morris et al. 1986). Estas secuencias sencillas parecen haberse originado por desapareamiento entre bases dentro de una misma molécula de ADN, seguido de replicación. Este proceso es conocido como "replicación con deslizamiento" (*replication slippage*) (para una revisión véase Levinson y Gutman 1987) y, a diferencia de los otros mecanismos postulados en la amplificación de ADN satélite, no involucra recombinación. La replicación con deslizamiento ocurre cuando una cadena de ADN en síntesis que contiene, por ejemplo, un par de bases duplicadas y adyacentes se desliza hacia 5', produciendo consecuentemente un desapareamiento entre bases. La replicación continúa insertando una nueva unidad. Cuando el deslizamiento se produce en dirección contraria, se producen deleciones. La replicación con deslizamiento ha sido invocada en varios casos, y en particular muchos polimorfismos en los fragmentos de restricción en humanos parecen haberse originado por este mecanismo (ver Walsh 1987).

En la medida en que una secuencia alcance cierto grado de amplificación en cadena, el deslizamiento puede ocurrir entre unidades ubicadas en distintas moléculas de ADN (por ejemplo en cromosomas homólogos). Si este desapareamiento es seguido de recombinación, puede originar una variación en el número de copias del satélite. Este mecanismo de intercambio desigual se ha postulado como el principal en la evolución de las secuencias satélites en general (Smith 1976). Sin embargo, las secuencias satélites ocurren muy frecuentemente en las cercanías de los centrómeros y en los telómeros, zonas donde la frecuencia de recombinación es muy baja (Charlesworth et al. 1986). Por este motivo, a pesar de que el intercambio desigual ha sido considerado modelo universal, es poco probable que sea el principal mecanismo de amplificación de estas secuencias.

Algunos autores han denominado genéricamente amplificación génica y replicación saltatoria a los procesos que duplican o multiplican secuencias repetidas o familias génicas. Shimke (1984) propuso que la causa de esta amplificación está en la relativa asincronía de la iniciación de la replicación en los genomas eucariotas y por lo tanto en una desproporcionada replicación de ciertas zonas del ADN.

Otro modelo propuesto (Walsh 1987) implica la recombinación intracatenaria entre unidades

contiguas del satélite, resultando en la formación de una estructura circular. Esta estructura podría, mediante un mecanismo de replicación por círculo rodante, amplificar las unidades del satélite (ver fig. 23). Estas se integrarían por recombinación en sitios homólogos o, eventualmente, con menor probabilidad en sitios no homólogos.

Este modelo puede explicar un hecho muy frecuente en muchos satélites, que es su dispersión en cromosomas no homólogos. Además, dado que por el mecanismo propuesto una pequeña parte del satélite puede ser amplificada considerablemente, el modelo es compatible con las diferencias entre especies observadas en los perfiles de restricción enzimáticos del satélite, sin pérdida en la homología global (Rossi et al. 1990).

#### ***4. MATERIALES Y METODOS***

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Origen de las especies estudiadas**

Se estudiaron individuos pertenecientes a 12 especies de **Ctenomys**, un individuo de **Octodontomys gliroides**, dos individuos de **Octodon degus**, un individuo de **Proechymis gualrae**. Se incluyeron también especímenes de **Mus musculus**, **Calomys muscullnus**, **Lutreolina crassicaudata** y **Thylamys venustus** como comparación. Con excepción de **Mus musculus** y **Calomys muscullnus** y **Octodon degus**, que se obtuvieron de colonias de laboratorio, el resto de las especies se capturaron en el campo usando trampas vivas. En los casos de especímenes colectados en el país, las pieles y los cráneos se depositaron en la Colección de Mamíferos del Museo Municipal de Historia Natural de Mar del Plata. Las localidades geográficas de los especímenes colectados en Argentina son las siguientes: **Ctenomys azarae** (Luan Toro, La Pampa); **C. argentinus** (Colonia Ramírez, Chaco, l.t.), **C. australls** (Necochea, Buenos Aires, l.t.); **C. iatro** (Tapia, Tucumán, l.t.); **C. mendocinus** (Tupungato, Mendoza); **C. occultus** (Monteagudo, Tucumán); **C. optimus** (Tres Cruces, Jujuy); **C. talarum** (Necochea, Buenos Aires); **C. tuconax** (El Infiernillo, Tucumán); **C. cf. perrensi** 2n=54 (Saladas, Corrientes); **C. cf. perrensi** 2n=58 (7 km este-noreste de Saladas, Corrientes); **C. sp.** 2n=42 (Curuzú Laurel, Corrientes); **C. porteousi** (Bonifacio, Buenos Aires, l.t.); **Octodontomys gliroides** (Tilcara, Jujuy); **Lutreolina crassicaudata** (Necochea, Buenos Aires); **Thylamys venustus** (León, Jujuy).

El espécimen de **Proechymis gualrae** provino de Venezuela; los dos individuos de **Octodon degus** de la Facultad de Medicina, Sede Norte, Universidad de Santiago de Chile; **Mus musculus** y **Calomys muscullnus** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

### **4.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo**

Tanto en el trabajo con plásmidos como con fagos se utilizó la cepa bacteriana de **E. coli** DH5-alfa IQ™. Los medios usados en la preparación de bacterias competentes y en la transformación fueron:

**psi-beta:** 0,5 % de extracto de levadura, 2 % de triptona, 0,5 % de  $MgSO_4$ , ajustado a pH 7,6 con KOH.

**Tfb I:** Acetato de potasio 30 mM, KCl 100 mM,  $CaCl_2$  10 mM,  $MnCl_2$  50 mM y glicerol 15 %, ajustado a pH 5,8 con ácido acético.

**Tfb II:** Buffer Pipes o MOPS 10 mM,  $CaCl_2$  75 mM, KCl 10 mM y glicerol 15 %, ajustado a pH 6,5 con KOH.

**SOC:** 2 % de bactotripton, 0,5 % de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM,  $MgCl_2$  10 mM,  $MgSO_4$  10 mM y glucosa 20 mM.

**LB:** 1 % de bactotripton, 0,5 % de extracto de levadura, 0,8 % de NaCl y 1,5 % de agar Difco, ajustado pH 7,5 con NaOH.

### **4.3. Transformación de bacterias**

#### **4.3.1. Transformación de *E. coli* DH5-alfa IQ™ con plásmidos**

Para preparar células competentes capaces de ser transformadas se siguió el procedimiento descrito por Hanaham (1983), con modificaciones. Se partió de un cultivo de 100 ml de *E. coli* DH5-alfa IQ™. El cultivo se realizó en medio psi-beta a 37 °C, con agitación hasta una densidad óptica de 0,48 a 600 nm. El cultivo se enfrió en hielo y todos los pasos siguientes se realizaron a 4 °C o en hielo. Las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 40 ml de Tfb I. Luego de 5 min en hielo se repitió la centrifugación. Finalmente se resuspendieron en 4 ml de Tfb II. Luego de una incubación de 15 min en hielo se fraccionaron y se congelaron rápidamente a -70 °C. La eficiencia de transformación de estas células es del orden de  $10^8$  colonias/ $\mu$ g de ADN transformante.

Para transformar con plásmidos las células competentes se utilizó el método de Hanaham (1983), con modificaciones (Denoya et al. 1985). Como controles de la transformación se incluyeron un tubo sin ADN y otro con 0,1 a 1 ng de ADN de vector provisto comercialmente. Se coincubaron a 0 °C durante 30 min 50  $\mu$ l de la suspensión de células competentes con ADN plasmídico, en un volumen no mayor de 20  $\mu$ l. Luego la mezcla se incubó a 42 °C durante 90 seg y se enfrió rápidamente en un baño de agua-hielo durante 5 min. Al cabo de este tiempo se agregaron 200  $\mu$ l de medio

SOC previamente estabilizado a 37 °C y se incubó a 37 °C durante 1 hora, con agitación. Una alícuota de 50  $\mu$ l se sembró en cajas de Petri que contenían LB-agar. Cuando el vector utilizado fue del tipo pUC que codifica para resistencia a ampicilina, se incluyeron en el agar 100  $\mu$ g/ml de este antibiótico, además de 40  $\mu$ g/ml de IPTG y 120  $\mu$ g/ml de X-gal.

#### **4.3.2. Transformación de E. coli DH5-alfa F' IQ<sup>TM</sup> con la forma replicativa del fago M13**

El procedimiento seguido para la transformación con la forma replicativa del fago M13 fue similar al utilizado con plásmidos tipo pUC hasta el shock térmico (ver 4.3.1). Luego del shock térmico a 42 °C y el posterior enfriamiento, se agregaron 100  $\mu$ l de células de E. coli DH5-alfa F' IQ<sup>TM</sup> provenientes de un cultivo fresco en estado estacionario, crecido en medio SOC que contenía 10  $\mu$ g/ml de kanamicina. Esta suspensión se mezcló con 4 ml de top agar previamente fundido a 45 °C y que contenía 20  $\mu$ l de IPTG de 20 mg/ml, 60  $\mu$ l de X-gal de 20 mg/ml disueltos en dimetilformamida. La mezcla se volcó en una placa de LB agar y se creció durante una noche.

#### **4.4. Purificación de ácidos nucleicos**

##### **4.4.1. Purificación de ADN de tejido hepático**

El ADN cromosómico se obtuvo del hígado conservado en etanol 80 %. Antes de la digestión del tejido se lavó el etanol con PBS (8 g de NaCl, 0,20 g de KCl; 0,12 g de PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub>; 0,91 g de PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>H por litro, ajustado a pH 7,6); 25 mM EDTA pH 8. Pequeños trozos de tejido se digirieron con 1 a 2  $\mu$ g de proteinasa K en 500  $\mu$ l de buffer proteinasa K (100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS; pH 7,8), a 55 °C durante 6 a 9 horas, dependiendo de la muestra. Luego se realizaron precipitaciones con AcONH<sub>4</sub>-etanol (Course y Amorese 1987) para eliminar proteínas. A la suspensión resultante de la lisis con proteinasa K se le agregó AcONH<sub>4</sub> 7,5 M pH 7,3 hasta una concentración final de 2,5 M. Se incubó a 60 °C durante 30 min para facilitar la disociación proteínas-ADN; luego se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol y se repitió la centrifugación en las condiciones anteriores. El precipitado se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8). El procedimiento completo se repitió dos o tres veces más.



El ADN resultante de este tratamiento tiene la calidad suficiente para ser digerido por enzimas de restricción y utilizado en procedimientos de *Southern-blot*. Para comprobar la integridad del ADN de alto peso molecular se lo analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,6% (ver 4.6.1), utilizando como control ADN cromosómico de timo de ternera (BRL).

### **4.4.2. Purificación de ADN plasmídico y de la forma replicativa del fago M13**

Tanto los plásmidos como la forma replicativa del fago M13 (ADN circular de doble cadena) se purificaron por el método de Birnboim y Doly (1979), con algunas modificaciones (Denoya et al. 1985). En todos los casos la centrifugación se llevó a cabo en una microcentrífuga Beckman o similar (15.000 rpm aproximadamente) para tubos eppendorff a TA. Colonias aisladas de cajas de Petri se crecieron durante toda la noche en 2 ml de LB. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de lisis (25 % sacarosa en 50 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM EDTA pH 8). La suspensión se incubó a 0 °C durante 30 min y luego se agregaron 150  $\mu$ l de solución alcalina (NaOH 0,2 N; 1 % SDS) y se incubó a 0 °C otros 5 min. A continuación se agregaron 150  $\mu$ l de AcONH<sub>4</sub> 3 M pH 4,5, se mezcló y se incubó a 0 °C 15 a 30 min. La suspensión se centrifugó durante 15 min para precipitar el ADN cromosómico. Esta última precipitación se repitió una vez más.

El ADN plasmídico del sobrenadante se precipitó con 1 ml de etanol y se centrifugó durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, a los que se agregaron 100  $\mu$ l de AcONH<sub>4</sub> 7,5 M pH 7,5. Esta suspensión se incubó 15 min a 60 °C y se centrifugó 15 min. Se descartó el precipitado y al sobrenadante se le agregó 1 ml de etanol y se centrifugó 15 min. El tratamiento con AcONH<sub>4</sub> se repitió una vez y el precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de TE y se incubó con 1  $\mu$ l de RNasa A (10 mg/ml) durante 60 min a TA. Al sobrenadante se le agregaron 100  $\mu$ l de AcONH<sub>4</sub> 7,5 M pH 7,5 y 1 ml de etanol y se centrifugó durante 15 min. El precipitado final se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE.

### **4.4.3. Purificación del ADN de simple cadena del fago M13**

Se utilizó el método descrito por Messing (Messing 1983). Las bacterias de una placa clara de retardo de crecimiento se inocularon en 2 ml de medio LB. Se agregaron 100  $\mu$ l de bacterias

*E. coli* DH5-alfa F' IQ™ provenientes de un cultivo crecido durante toda la noche. Se creció durante 6 h a 37 °C con agitación. Al cabo de ese tiempo, el cultivo se pasó a un tubo eppendorff y las células se precipitaron por centrifugación en una microcentrífuga durante 5 min. Para asegurarse de que no quedaran células en el sobrenadante, éste se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Evitando resuspender el precipitado, 1,2 ml de sobrenadante (suspensión de fago) se pasó a otro eppendorff y se le agregaron 200 µl de una solución de PEG 20 % - NaCl 2,5 M. Se mezcló y se incubó a TA durante 30 min. Los fagos se precipitaron en microcentrífuga durante 15 min a TA.

El sobrenadante se descartó y se puso especial cuidado en eliminarlo totalmente de las paredes del tubo. El precipitado se resuspendió en 100 µl de TE y se extrajeron proteínas por agregado de 100 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y agitación con vórtex. La fase acuosa se separó por centrifugación durante 5 min y se reextrajo 3 o 4 veces con éter. El ADN de simple cadena del fago se precipitó con 50 µl de AcONH<sub>4</sub> 7,5 M pH 7,5 y 300 µl de etanol, por centrifugación durante 15 min, y se resuspendió en 20 µl de TES (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA).

Esta preparación contiene de 2 a 4 µg de ADN de simple cadena y es la que se utilizó en secuenciación por el método de Sanger et al. (1977) (ver 4.10).

#### **4.4.4. Cuantificación de ADN**

El ADN se cuantificó utilizando un minifluómetro TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments). El colorante usado fue bis-benzimidazol, conocido comercialmente como Hoechst 33258, que en presencia de ADN tiene un espectro de excitación con un máximo en 365 nm y un espectro de emisión con un máximo en 458 nm, que coinciden respectivamente con los picos de emisión y detección del minifluómetro. De acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, este colorante puede ser utilizado para cuantificar ADN en extractos crudos, donde el ARN no ha sido eliminado.

#### **4.5. Condiciones de ensayo con enzimas de restricción y modificación**

##### **4.5.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción utilizadas fueron las de Bethesda Research Laboratories (BRL, USA) y, ocasionalmente, algunas de Boehringer, Alemania. Las enzimas fueron ensayadas en las condiciones recomendadas por sus fabricantes. En el caso de ADN cromosómico, se utilizaron entre 5 y 6 unidades de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN. En el caso de ADN plasmídico, se usaron 1 o 2 unidades por  $\mu\text{g}$ . En todos los casos se utilizaron las unidades enzimáticas y los tiempos necesarios para que las digestiones fueran exhaustivas.

Para los ensayos de *Southern-blot* (4.8.1) se digirieron entre 6 y 10  $\mu\text{g}$  de ADN cromosómico, que se sembraron en una calle de los geles de agarosa.

Todas las enzimas de restricción se usaron en las condiciones recomendadas por los fabricantes.

##### **4.5.2. Incubación de ADN con enzimas de modificación**

###### **4.5.2.1. ADN ligasa de fago T4**

La preparación usada fue la comercializada por BRL y cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre terminales yuxtapuestos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo en ADN de doble cadena.

Se la utilizó en ensayos de clonado y subclonado. En el caso en que los extremos a ligar hubiesen sido el resultado de digestiones de enzimas de restricción que dejan extremos cohesivos, se incubaron entre 100 y 500 ng de vector de clonado con 500 a 1000 ng del fragmento de ADN a clonar, en un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM DTT; 1 mM espermidina; 1 mM dATP con 0,5 unidad de ligasa, en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  durante 16 h a 16 °C o a 37 °C durante 2 horas. En el caso en que los extremos a ligar fuesen el resultado de digestiones con enzimas que dejan los extremos romos, se usaron entre 5 y 20 ng de ADN del vector y de 25 a 100 ng de ADN a clonar y las mismas condiciones de incubación.

#### **4.5.2.2. Fragmento Klenow de ADN polimerasa I**

El fragmento Klenow de la ADN polimerasa I se utilizó en la marcación de sondas mediante el método de "random primer" y en las reacciones de secuenciación. Las condiciones de ambas reacciones se describen en las secciones 4.8.2 y 4.10, respectivamente.

#### **4.6. Electroforesis analítica y preparativa del ADN en agarosa**

##### **4.6.1. Electroforesis analítica del ADN en agarosa**

Los plásmidos, el ADN cromosómico de alto peso molecular o los productos de digestión de éstos con enzimas de restricción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TBE 1× (0,084 M Tris-borato; 0,002 EDTA pH 8). La concentración de la agarosa usada en cada caso dependió del peso molecular de los ADNs (Maniatis et al. 1983). Las muestras se mezclaron con 1/3 de su volumen con buffer de siembra (TBE 3×; glicerol 50 % y azul de bromofenol 0,25 %). La electroforesis se desarrolló en un campo eléctrico no mayor de 5 V/cm. Los geles se tiñeron con BrEt 0,5 µg/ml en agua, a TA durante 20 minutos, y se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante.

La visualización de las bandas de ADN se realizó por exposición de los geles a un transiluminador de luz ultravioleta. La cantidad mínima de ADN que puede ver el ojo en estas condiciones es de 20 ng en una banda de 0,5 cm de ancho. El gel se fotografió usando una cámara positiva con filtro rojo.

##### **4.6.2. Electroforesis preparativa del ADN y electroelución**

En algunos casos interesaba obtener en particular alguno de los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones con enzimas de restricción. En estos casos, luego de realizadas la electroforesis en agarosa y la tinción del gel como se describe en la sección anterior, se cortó la porción del gel que tenía la banda de interés y se la colocó en una bolsa de diálisis, que se cerró en uno de los extremos. Se agregaron entre 0,5 y 1 ml de buffer TBE 1× estéril y, luego de cerrar el otro extremo, se sumergió la bolsa de diálisis en buffer TBE 1× y se aplicó un campo eléctrico de 5

V/cm durante 10 a 30 min, según el peso molecular del fragmento de ADN a electroeluir. Una vez que se comprobó por visualización en el transiluminador que la totalidad de ADN había electroeluido de la agarosa, ésta se sacó de la bolsa de diálisis. Se retiró el buffer de elución que contenía los fragmentos de ADN y se lavaron las paredes de la bolsa de diálisis con un pequeño volumen (100  $\mu$ l) de TE.

La suspensión de ADN se concentró por precipitación agregando 1/2 volumen de  $\text{AcONH}_4$  7,5 M pH 7,5 y 2 volúmenes de etanol. Para optimizar la precipitación del ADN de soluciones diluidas como ésta, se incubó a TA durante 30 min antes de centrifugar 15 min a 15.000 rpm (Course et al. 1987). El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de agua y se guardó a  $-20$  °C hasta su uso.

#### **4.7. Transferencia y fijación de ADN a filtros**

##### **4.7.1. Southern-blot**

Luego de la electroforesis en agarosa, el ADN se desnaturalizó por inmersión del gel en solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N); luego se lo sumergió en solución neutralizante (Tris-HCl 1 M; NaCl 1,5 M; pH 8). Ambas incubaciones se realizaron durante 30 min a TA. El ADN del gel se transfirió por el método de Southern (1975) a membranas de nitrocelulosa o de nylon (Pall Biotodyne A o BioRad) por capilaridad usando  $20\times$  SSC ( $1\times$  SSC es NaCl 0,15 M; citrato trisódico 0,015 M; pH 7) durante 18 horas.

Luego de la transferencia, la membrana se horneó a  $80$  °C durante 1,5 h en el caso de membranas de nitrocelulosa o nylon BioRad, y se expuso durante 2 minutos a luz ultravioleta del transiluminador en el caso de Biotodyne A. En estas condiciones, el ADN desnaturalizado está fijado en el filtro y listo para ser utilizado en experimentos de hibridación.

##### **4.7.2. Dot-blot**

El ADN se purificó y cuantificó como se indica en el apartado 4.5. A la suspensión de ADN se le agregó 1/2 volumen de SSC  $20\times$  y 1/10 de volumen de NaOH 4 N para desnaturalizar los

ácidos nucleicos. Las muestras se incubaron a TA durante 15 min y se sembraron manualmente o utilizando un dispositivo de siembra múltiple *Hybridot* (BRL) en filtros de nitrocelulosa o membranas de nylon. Se fijaron durante 1 hora a 80 °C, o 2 min a luz ultravioleta en el caso en que el nylon utilizado fuera Biodyne A.

#### **4.8. Marcación de sondas**

Se utilizaron sondas de ADN de doble cadena y se usaron dos tipos de métodos de marcación: "nick translation" y "random primer".

##### **4.8.1. Marcación por el método de "nick translation"**

Se siguió básicamente el método descrito por Rigby (Rigby et al. 1977). La reacción se desarrolló en 25  $\mu$ l totales, que contenían:

- 500 ng de ADN de doble cadena
- 2,5  $\mu$ l de buffer 10 $\times$
- 0,02 mM de dATP
- 0,02 mM de dGTP
- 0,02 mM de dTTP
- 50  $\mu$ Ci de (alfa-<sup>32</sup>P)-dCTP de AE = 3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l
- 0,4 U/ $\mu$ l de ADN polimerasa I
- 40 pg/ $\mu$ l de DNasa I

El buffer 10 $\times$  contiene:

- 500 mM Tris-HCl pH 7,5
- 50 mM acetato de Mg
- 10 mM 2-beta-mercaptoetanol

La mezcla se incubó a 16 °C durante 1 hora. Al final de la incubación se separó la radiactividad no incorporada por precipitación de la sonda con AcONH<sub>4</sub>-etanol, como se describió en las secciones

anteriores. El precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ l de buffer TE. En estas condiciones se obtuvo una sonda con una actividad específica aproximada de  $10^8$  cpm/ $\mu$ g de ADN.

En algunos experimentos se reemplazó el dCTP (alfa- $^{32}$ P) radiactivo por dUTP biotilado. La concentración de los restantes desoxinucleótidos, dATP, dCTP, dGTP, fue de 0,02 mM. El buffer y las concentraciones de enzimas fueron los mismos que en el caso anterior. La incubación se realizó también a 16 °C, pero durante dos horas.

#### **4.8.2. Marcación por el método de "random primer"**

Para obtener sondas radiactivamente marcadas también se utilizó el método de "random primer" (Feinberg y Vogelstein 1983 y 1984). 100 ng de la sonda de ADN de doble cadena en un volumen de 6  $\mu$ l se desnaturalizaron a 100 °C durante 5 minutos y se enfriaron rápidamente para mantener las cadenas separadas. A esta mezcla enfriada se agregaron 5  $\mu$ l de buffer OBL 5 $\times$ , 8,7  $\mu$ l de agua, 4  $\mu$ l de alfa- $^{32}$ P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 1,3  $\mu$ l de Klenow (BRL) de 2 U/ $\mu$ l. La preparación se incubó durante un mínimo de 3 h y un máximo de 18 h a TA.

El buffer OLB 5 $\times$  contiene soluciones A, B y C en proporción 100:250:150.

**Solución A:** 1 ml de solución O (1,25 M Tris-HCl pH 8; 0,125 M MgCl<sub>2</sub>)  
18  $\mu$ l de beta-2-mercaptoetanol 3 M  
5  $\mu$ l de dATP 0,1 M (\*)  
5  $\mu$ l de dCTP 0,1 M (\*)  
5  $\mu$ l de dGTP 0,1 M (\*)  
5  $\mu$ l de dTTP 0,1 M (\*)

(\*) Disueltos en 3 mM Tris-HCl pH 7; 0,2 mM EDTA.

**Solución B:** 2 M Hepes titulado a pH 6,6 con NaOH 4 N

**Solución C:** Hexadesoxinucleótidos (Pharmacia/PL N° 2166) disueltos en 3 mM Tris-HCl pH 7; 0,02 mM EDTA a una concentración de 90 unidades/ml

En estas condiciones se obtiene una actividad específica del orden de  $10^9$  cpm/ $\mu$ g ADN. La radiactividad no incorporada se eliminó por precipitación de la sonda con AcONH<sub>4</sub>-etanol, como en el caso de "nick translation" (4.8.1).

#### **4.9. Hibridación del ADN**

##### **4.9.1. Hibridación con sondas radiactivamente marcadas**

Los filtros con el ADN fijado se preincubaron a 60 °C con agitación suave en una solución que contenía de 2× SSC a 6× SSC, 0,5 % SDS, 0,3 % leche descremada en polvo y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón previamente sonificado y desnaturalizado. Al cabo de 2 horas de prehibridación se desnaturalizó la sonda marcada a 100 °C durante 5 min, enfriando rápidamente en agua-hielo para mantener las cadenas complementarias separadas. La solución de prehibridación se reemplazó por otra fresca, pero de menor volumen, y se agregó la sonda. Se hibridó durante 18 h a 60 °C o 65 °C, de acuerdo a la exigencia de identidad entre las secuencias de la sonda y las secuencias blanco requerida en cada ensayo. Al cabo de la hibridación, los filtros se lavaron en 6× SSC a 60 °C (baja exigencia de identidad; ≥ 60%) o 0,1× SSC (alta exigencia de identidad; ≥ 95%) a 65 °C, y 1 % SDS, según el caso. Luego del lavado, los filtros se expusieron a placas radiográficas 3M, Agfa o Curix a TA o a -20 °C con pantalla amplificadora (HI Plus Dupont).

Las hibridaciones se realizaron sin eliminar el vector de la sonda, por lo que se comprobó que no hubiese hibridación inespecífica entre el vector y los ADNs cromosómicos en experimentos de *Southern-blot* utilizando como sonda pUC, en condiciones de baja exigencia de identidad.

En los casos en que se quiso hibridar un mismo filtro con dos sondas distintas, fue necesario eliminar la primera sonda antes de la segunda hibridación. Para esto se desnaturalizaron los híbridos sonda-secuencia blanco por incubación de los filtros a 100 °C durante 10 min en SDS 3% dos veces consecutivas.

##### **4.9.2. Hibridación con sondas marcadas con UTP biotinilado**

Los filtros se prehibridaron, hibridaron y lavaron en las mismas condiciones que se indican en 4.9.1. Luego del último lavado, los filtros se enjuagaron durante unos minutos en buffer 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) y luego se incubaron durante 1 hora a 65 °C, con agitación en buffer 2 (3% seroalbúmina bovina fracción 5, disuelta en buffer 1). Luego los filtros se pueden secar y hornear 10 min a 80 °C y guardar durante varios días.

A continuación los filtros se incubaron en una solución que contenía el conjugado fosfatasa



alcalina-estreptavidina 1  $\mu\text{g/ml}$  disuelto en buffer 1. Esta y todas las incubaciones que siguen se realizaron a TA. Por cada 100  $\text{cm}^2$  de superficie de filtro se utilizaron 7 ml de esta suspensión. Se incubó durante 10 min con agitación moderada. A continuación los filtros se lavaron dos veces en buffer 1 durante 10 minutos para eliminar la fracción del conjugado no unido a biotina, y luego 10 minutos en buffer 3 (0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

Luego se los incubó en solución de coloración: 30  $\mu\text{l}$  de *tetrazolium nitroblue* 75 mg/ml (disueltos en 70 % dimetilformamida), 25  $\mu\text{l}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) 50 mg/ml (disueltos en dimetilformamida 70 %), en 7,5 ml de buffer 3. Se usaron 7,5 ml de la solución de coloración por cada 100  $\text{cm}^2$  de superficie de filtro. La incubación se realizó a TA y con agitación moderada y protegida de la luz y se prolongó por lapsos que varían entre 30 min y 3 horas para obtener el máximo desarrollo de color. Los filtros se lavaron con solución detenedora (300 mM EDTA pH 8) y se secaron a 80 °C durante 2 min. Se guardaron protegidos de la luz.

#### 4.10. Secuenciación del ADN

Para la secuenciación del ADN se utilizó el método de Sanger et al. (1977). Se emplearon dos tipos de kit de secuenciación, ambos de BRL. El primer kit, "*dideoxisequencing system*", permite secuenciar las primeras secuencias del inserto contiguos al vector. En cambio, el segundo kit, "*kilobase sequency system*", permite iniciar la secuenciación del inserto a distancias variables del sitio de clonado. En ambos casos se siguieron las instrucciones de los fabricantes, con algunas modificaciones menores. Se utilizaron fagos M13mp18 y M13mp19, que contenían el fragmento de ADN a secuenciar en ambas orientaciones. Se usaron 5  $\mu\text{Ci}$  de (alfa- $^{35}\text{S}$ )-dATP (600 Ci/ml) por reacción de secuenciación.

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de 8 o 10 % acrilamida-bisacrilamida, 7 M urea en geles planos de 0,4 mm de espesor, en buffer TBE (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico y 4 ml de EDTA 500 mM pH 8 por litro). Antes de sembrar se desnaturalizaron las dos cadenas por incubación a 100 °C durante 5 min y enfriamiento rápido en baño de agua-hielo.

La electroforesis se desarrolló a potencia constante de 60 watts durante 6 a 8 h. Al final de la corrida los geles se fijaron en ácido acético 15 %, metanol 5 % durante 30 min, se secaron y se expusieron a placas radiográficas X-Omat a TA durante 2 o 3 días.

El protocolo seguido con el kit "dideoxisequencing system" es el siguiente. La primera reacción permite la hibridación entre el "primer" y la secuencia homóloga en el fago. A 0,5-1  $\mu\text{g}$  de ADN de simple cadena de fago recombinante se le agregan 2  $\mu\text{l}$  del primer de 17 bases (4 ng) y 1  $\mu\text{l}$  de buffer de ADN polimerasa 10 $\times$  en un volumen total de 12,4  $\mu\text{l}$ . El buffer de ADN polimerasa 10 $\times$  contiene:

Tris-HCl	70 mM pH 7,5
MgCl <sub>2</sub>	70 mM
NaCl	500 mM

Esta mezcla se incubó a 100 °C durante 5 min y luego se incubó a TA durante 30 a 45 min, etapa en la que se produce la hibridación de los primers con el templado.

A esta mezcla se le agregan:

- 3  $\mu\text{l}$  de (alfa-<sup>35</sup>S)-dATP (600 Ci/mmol; 9 mCi/ml)
- 1  $\mu\text{l}$  de 0,1 M DTT
- 1  $\mu\text{l}$  de ADN polimerasa I, fragmento Klenow (1,5 U/ $\mu\text{l}$ )

Alícuotas de 3  $\mu\text{l}$  de esta mezcla se agregaron a tubos denominados A, C, G y T, que contenían los nucleótidos y dideoxinucleótidos, y se incubaron a 30 °C durante 20 min.

Los tubos A, C, G y T contenían:

- A: 1  $\mu\text{l}$  de A° + 1  $\mu\text{l}$  de ddATP 0,1 mM
- C: 1  $\mu\text{l}$  de C° + 1  $\mu\text{l}$  de ddCTP 0,3 mM
- G: 1  $\mu\text{l}$  de G° + 1  $\mu\text{l}$  de ddGTP 0,5 mM
- T: 1  $\mu\text{l}$  de T° + 1  $\mu\text{l}$  de ddTTP 1 mM

donde:

	A°	C°	G°	T°
dCTP 0,5 mM	20 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
dGTP 0,5 mM	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
dTTP 0,5 mM	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
10 $\times$ polim.				
Reacc. buffer	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

Luego de la incubación se agregó a cada tubo 1  $\mu$ l de dATP 0,5 mM para completar las cadenas que se pudiesen haber detenido por falta de dicho nucleótido y se incubó a la misma TA durante otros 15 min.

La reacción finalizó por agregado de 5  $\mu$ l de buffer de detención (formamida deionizada 95 %; *xylene cyanol* 0,1 %; BPB 1 %; Na EDTA 10 mM).

El segundo protocolo, denominado "*kilobase sequencing system*", difiere del anterior en que hay una primera incubación de extensión de la cadena en síntesis de 50 a 100 bases. En una segunda etapa se incluyen los ddNTP. El protocolo seguido es el siguiente:

En un volumen final de 10  $\mu$ l se incuban conjuntamente:

- 0,5 a 1  $\mu$ g de ADN de simple cadena
- 1,5  $\mu$ l del *primer* de 17 bases
- 2,0  $\mu$ l de buffer de ADN polimerasa 10x

La desnaturalización y posterior hibridación entre el *primer* y el templado se realizaron como en el caso anterior.

A la mezcla se le agregaron:

- 2  $\mu$ l de mezcla de extensión diluida 1:25, con Tris-HCl pH 8, 5 ml EDTA 0,1 mM
- 1  $\mu$ l de DTT 100 mM
- 1  $\mu$ l de (alfa-<sup>35</sup>S)-dATP (10 mCi/ml)
- 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
- 1  $\mu$ l de ADN polimerasa I, fragmento Klenow (2 U/ $\mu$ l)

Se incubó a 37 °C durante 5 min. 3,5  $\mu$ l de esta mezcla se agregaron a cada uno de los cuatro tubos que contenían los ddNTPs, que se incubaron a 45 °C durante 5 min.

La reacción se detuvo por agregado de 4  $\mu$ l de buffer de detención y las muestras se desnaturalizaron igual que en el caso anterior.

La composición de la mezcla de extensión es 5  $\mu$ M de dCTP, dGTP y dTTP. La concentración de los ddNTPs es:

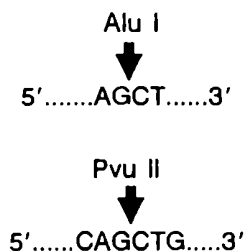
ddATP es 300  $\mu$ M ddATP, 25  $\mu$ M dATP y 250  $\mu$ M dCTP, dGTP y dTTP  
ddCTP es 100  $\mu$ M ddCTP, 25  $\mu$ M dCTP y 250  $\mu$ M dATP, dGTP y dTTP  
ddGTP es 150  $\mu$ M ddGTP, 25  $\mu$ M dGTP y 250  $\mu$ M dATP, dCTP y dTTP  
ddTTP es 500  $\mu$ M ddTTP, 25  $\mu$ M dTTP y 250  $\mu$ M dATP, dCTP y dGTP

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Secuencias repetidas en el genoma de Ctenomys

Dado que una de las especies de *Ctenomys* que posee abundante cantidad de heterocromatina constitutiva es *C. porteousi* (fig. 2) y que los constituyentes principales de la heterocromatina son secuencias repetidas (Burtlag 1980), se inició la búsqueda de dichas secuencias en esta especie. Se extrajo el ADN cromosómico a partir de tejido hepático y se digirió con 20 enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes se separaron en geles de agarosa 1.2 %. Algunas de las digestiones se muestran en la figura 3. Con enzimas como Hae III y Hinf I aparecen varias bandas de pesos moleculares altos o medios (fig. 3 carriles a y b). En los carriles correspondientes a Alu I y Pvu II (carriles f y g) se observa una banda que corresponde a 340 pb aproximadamente. En el caso de Pvu II también se observan otras de 680 y 1000 pb, es decir, múltiplos de la de 340 pb. La banda de 340 pb que se observa en el carril correspondiente a Alu I se trata muy probablemente de la misma especie molecular que la de Pvu II, dado que la secuencia de reconocimiento de Alu I comparte con la de Pvu II cuatro de sus seis nucleótidos:



Las digestiones enzimáticas en todos los casos fueron exhaustivas; los multímeros de 680 y 1000 pb que se observan en el carril correspondiente a Pvu II (fig. 3 carril g) difícilmente se deban a la presencia de productos de digestión parcial. Por otro lado, la reproducción de los resultados utilizando distintas preparaciones de ADN y de la enzima lo confirman.

El monómero y los multímeros están flanqueados por dos sitios Pvu II, el dímero tiene un único sitio Pvu II interno mutado y el trímero tiene dos sitios Pvu II internos mutados. Esta progresión en multímeros de una secuencia básica es típica de muchos ADNs satélites (Southern 1975a y b, Fanning 1987, Datta et al. 1988, Dod et al. 1989).

Para establecer si el patrón de bandas resultantes de la digestión del ADN de *C. porteousi*



FIGURA 2. *Cariotipo de C. porteusl.* A: Tinción con Giemsa. B: Bandas C de la misma metafase. (Tomada de Massarini et al. 1990.)

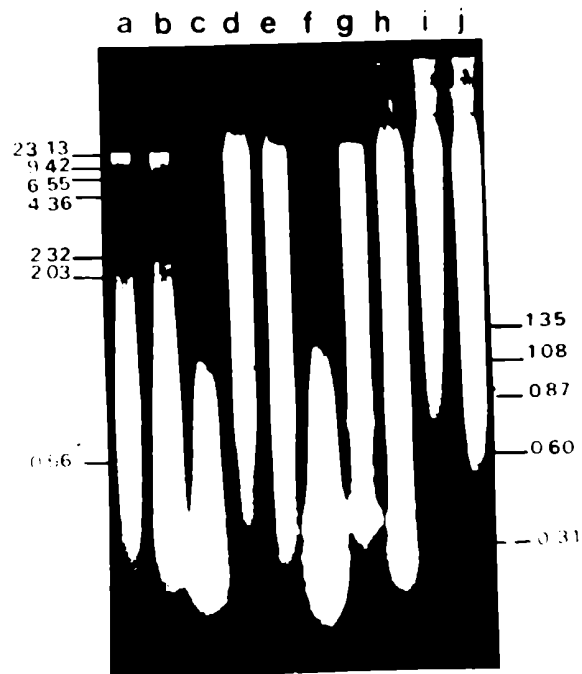


FIGURA 3. *Secuencias repetidas en C. porteusl*. Electroforesis en agarosa 1,2 % de ADN de *C. porteusl* digerido con las siguientes enzimas de restricción: a) Hae III; b) Hinf I; c) Dde I; d) Bam H I; e) Msp I; f) Alu I; g) Pvu II; h) EcoR I; i) Sma I; j) Bgl II. Lambda digerido con Hind III y pBR322 digerido con Taq I se usaron como marcadores de pesos moleculares.



con Pvu II se repite con otras especies de *Ctenomys*, se dirigieron exhaustivamente con esta enzima otras seis especies de *Ctenomys*. Los resultados se muestran en la figura 4. El patrón de bandas producido con Pvu II, típico de *C. porteousi* (fig. 4, carril f) está presente también en *C. azarae*, *C. australis* y *C. mendocinus* (fig. 4, carriles d, e y g); en cambio, no está presente en *C. cf. perrensi* ( $2n=54$ ), *C. opimus* y *C. occultus* (fig. 4, carriles a, b y c). La ausencia de bandas en la digestión con Pvu II en estas últimas especies podría deberse a que la secuencia está ausente o en muy bajas proporciones.

### 5.2. Clonado de la secuencia repetida Pvu II de *Ctenomys*

La banda de 340 pb correspondiente a la digestión con Pvu II del ADN de *Ctenomys porteousi* se electroeluyó del gel y se ligó al vector pUC 18 abierto en el sitio Sma I. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* DH5-alfa. Se extrajeron los plásmidos de 14 colonias blancas y se analizaron en electroforesis en geles de agarosa (ver fig. 5A). Los plásmidos de los carriles 1, 4, 6, 7, 9, 11 y 12 son recombinantes y su peso molecular es compatible con un inserto de 340 pb. La digestión de estos plásmidos recombinantes con EcoR I y Hind III, enzimas que tienen sitios de reconocimiento en el *polylinker* de pUC 18, confirmó que la secuencia clonada es de aproximadamente 340 pb (fig. 5B). En adelante se trabajó con el plásmido de clon 6, al que se denominó pSRPC (plásmido que contiene la secuencia repetida Pvu II de *Ctenomys*).

Para confirmar el clonado de la secuencia buscada se utilizó el pSRPC como sonda en experimentos de *Southern-blot* donde se analizó el ADN de *C. porteousi* digerido con varias enzimas de restricción (fig. 6). El patrón de restricción de SRPC con las cuatro enzimas empleadas es diferente. Mientras que el patrón con Pvu II muestra la señal más intensa en la banda de 340 pb, decreciendo la intensidad en las bandas múltiplos, los patrones de Hae III, Hinc II y EcoR I son diferentes. En estos casos el monómero no está presente o lo está en muy pequeñas proporciones y las especies más abundantes son trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros. Además con estas tres enzimas se observaron fragmentos de alto peso molecular, que no están presentes en el carril correspondiente a Pvu II.

La diferencia en los patrones de restricción de estas enzimas se debe a la distinta proporción de monómeros que contienen secuencias de reconocimiento para cada una de ellas. La enzima Pvu II posee secuencias de reconocimiento en la mayoría de monómeros que componen la totalidad

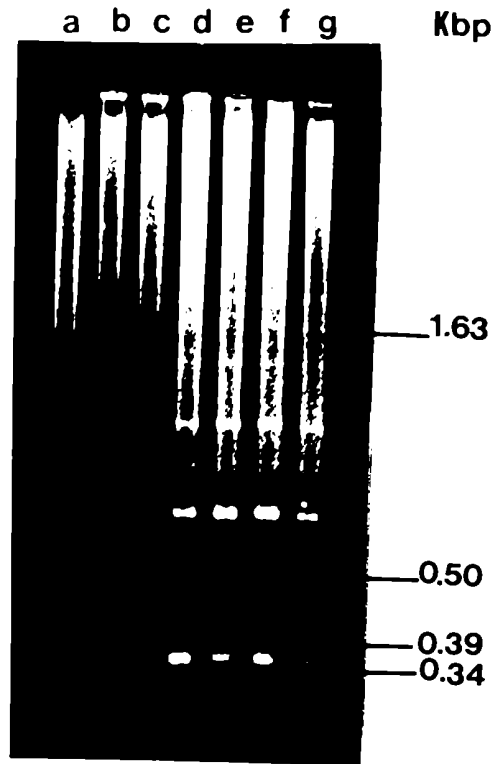


FIGURA 4. *Secuencias repetidas Pvu II en otras especies de Ctenomys*. Electroforesis en agarosa 1,2 % de ADNs de varias especies de *Ctenomys* digeridos con Pvu II. Las especies son las siguientes: a) *C. cf. perrensi* ( $2n=54$ ); b) *C. oplmus*; c) *C. occultus*; d) *C. azarae*; e) *C. australis*; f) *C. porteousi*, y g) *C. mendocinus*. pBR322 digerido con Hinf I se usó como marcador de peso molecular.

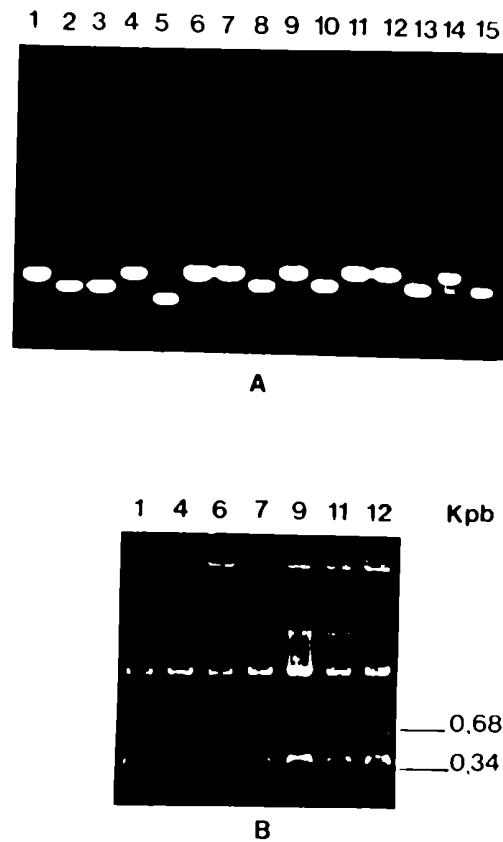


FIGURA 5. **Clonado de la SRPC.** A: Electroforesis en agarosa 1 % de los plásmidos de 14 colonias blancas. El plásmido del carril 15 proviene de una colonia azul, es decir, su tamaño molecular corresponde a pUC sin inserto. El plásmido del carril 5 es deletante. El carril 14 corresponde a una contaminación con una colonia azul. B: Electroforesis en agarosa 1,2 % de los plásmidos de los carriles 1, 4, 6, 7, 9, 11 y 12 digeridos conjuntamente con EcoR I y Hind III. Las bandas de 340 y 680 pb resultantes de la digestión del ADN de *C. porteousi* con Pvu II se utilizaron como marcadores de pesos moleculares. La banda correspondiente al inserto tiene un tamaño algo mayor de 340 pb porque incluye 50 pb del *polilinker* de pUC.

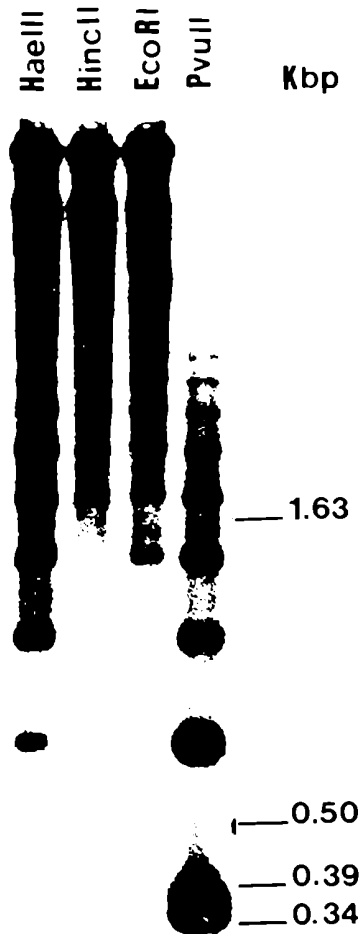


FIGURA 6. *Patrones de restricción Hae III, Hinc II, EcoR I y Pvu II de la SRPC en C. porteousi.* Southern-blot conteniendo ADN de *C. porteousi* digerido con Hae III, Hinc II, EcoR I y Pvu II. pSRPC se marcó con UTP-biotinilado y se hibridó en condiciones de alta exigencia de identidad. pBR322 digerido con Hinf I se usó como marcador de peso molecular.

del satélite y al patrón de restricción resultante se lo denomina de tipo A. Las enzimas Hae III, Hinc II y EcoR I tienen secuencias de reconocimiento en una limitada proporción de monómeros y los perfiles de restricción resultantes se denominan de tipo B. Esta denominación de patrones de tipo A y B fue originalmente introducida por Hörz y Zachau (1977).

En la figura 7 se muestran los patrones de *Southern-blot* resultantes de la digestión del ADN de *C. porteousi* con otras enzimas de restricción. Las enzimas Hae III, Hinf I y Msp I muestran un patrón de tipo B. En el carril correspondiente a Dde I no se detecta señal. Esto indica que esta enzima debe tener sitios múltiples de corte dentro del monómero de la SRPC, por lo que los fragmentos resultantes de la digestión serían de muy bajo peso molecular y la mayoría migraría más allá del frente de corrida. La abundancia de sitios Dde I se confirmó posteriormente al secuenciar el monómero de la SRPC (ver fig. 17).

Es interesante comparar los patrones Alu I y Pvu II de la figura 7. La señal en el carril correspondiente a Alu I está concentrada casi exclusivamente en el monómero. En cambio, en Pvu II la señal está no sólo en el monómero, sino también en multímeros de mayor tamaño. Esto se debe a que es más probable la desaparición de un sitio Pvu II por mutación puntual que la desaparición de un sitio Alu I, ya que la secuencia de reconocimiento de la primera enzima tiene seis nucleótidos, mientras que la de la segunda tiene cuatro.

### 5.3. La SRPC en ADNs homólogos y heterólogos

Algunas secuencias repetidas de eucariotas están distribuidas entre especies alejadas filogenéticamente (Fanning 1987); otras, en cambio, son específicas de especie o de grupos de especies muy relacionadas. Para saber a cuál de estos dos tipos pertenece la SRPC, se ensayaron ADNs heterólogos y homólogos en experimentos de hibridación en condiciones de baja y alta exigencia de identidad, respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 8. La figura 8A muestra que SRPC no está presente en roedores marsupiales como *Thylamys venustus*, *Lutreolina crassicaudata* o *Lestodelphys halli*, ni en los genomas humanos o de pollo.

En cambio, cuando se hibridó pSRPC en condiciones de alta exigencia de identidad con el ADN de especies de *Ctenomys* (fig. 8B), se encontró señal en todos los casos, excepto en *C. oplmus*, caso que será analizado en detalle más adelante (ver 5.7).

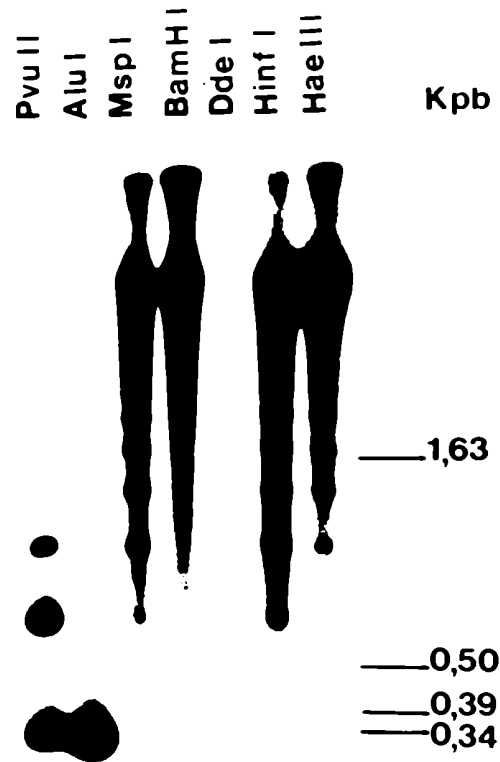


FIGURA 7. *Otros patrones de restricción de la SRPC en C. porteousi*. *Southern-blot* conteniendo ADN de *C. porteousi* digerido con Pvu II, Alu I, Msp I, BamH I, Dde I, Hinf I y Hae III e hibridado con pSRPC en condiciones de alta exigencia de identidad. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular. El ADN del carril correspondiente a BamH I está degradado.

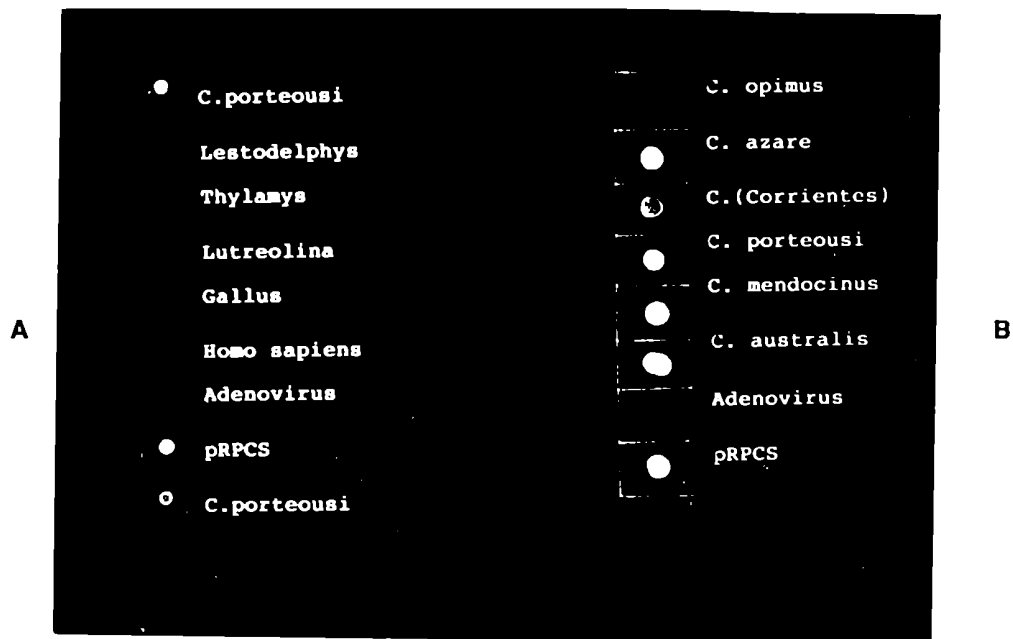


FIGURA 8. **SRPC en ADNs heterólogos y homólogos.** Hibridación en *dots* de la SRPC con ADNs heterólogos (A) y homólogos (B). Las hibridaciones en A y en B se realizaron, respectivamente, en condiciones de baja y alta exigencia de identidad. La sonda pSRPC se marcó con UTP biotinilado. En todos los casos se sembraron 150 ng de ADN, excepto en el control positivo (pSRPC = pRPCS), en el que se sembraron 150 pg en A y 300 pg en B. Adenovirus se incluyó como control negativo. C. (Corrientes) = C. cf. *perrensi* (2n=54).

Es interesante notar que se detectó señal en **C. cf. perrensi** ( $2n=54$ ), aunque de menor intensidad que en las otras especies. La digestión del ADN de esta especie con Pvu II no había evidenciado patrón de bandas por tinción con bromuro de etidio (fig. 4, carril a).

#### **5.4. La SRPC está presente en varias especies de Ctenomys**

El pSRPC se utilizó como sonda en experimentos de *Southern-blot* conteniendo ADN digerido con Pvu II de varias especies de **Ctenomys** (fig. 9). La hibridación se llevó a cabo en condiciones en las que secuencias con una identidad del 95 % o más es esperable que generen señal. Se detectó señal en todos los carriles que contienen ADN de **Ctenomys**, excepto en el que contiene ADN de **C. opimus**, lo que confirma los resultados del experimento de la figura 8B. La SRPC no da reacción cruzada con el ADN de **Mus musculus** ni con el de **Calomys muscullnus**. Tampoco se detectó señal en estas especies cuando se repitió la hibridación en condiciones más relajadas, en las que hibridan secuencias con una identidad mayor al 60 %. Excepto en el caso de **C. opimus** (ver 5.7), en estas condiciones no hubo variación en los patrones de restricción de las especies de **Ctenomys**, respecto a la hibridación en condiciones de alta exigencia de identidad.

Aunque la cantidad total de SRPC varía con la especie, el patrón de restricción Pvu II es en todos los casos de tipo A. Dejando de lado el caso de **C. opimus**, este experimento muestra que la amplificación de la SRPC ocurrió antes que las especies divergieran. El monómero de la SRPC permaneció conservado durante el proceso de amplificación, dado que las condiciones de hibridación utilizadas en este ensayo son de alta exigencia de identidad.

Estos hechos sugieren que el proceso de amplificación del monómero y el de divergencia de las especies con un patrón Pvu II de tipo A son relativamente recientes en términos evolutivos.

Por otro lado, las cantidades de SRPC varían de acuerdo con la especie, lo que sugiere que la amplificación ocurrió a distintas velocidades en los distintos linajes. Una explicación alternativa a esta última es que en algunos linajes el satélite sufrió deleciones importantes. Esto parece mucho menos probable, dado que aun en especies con distinta cantidad total de SRPC, la cantidad de monómero es comparable (comparar en fig. 9 carriles f y l o g y j), por lo cual habría que postular que se deleccionaron preferencialmente monómeros sin sitios Pvu II, lo que parece ser altamente improbable.



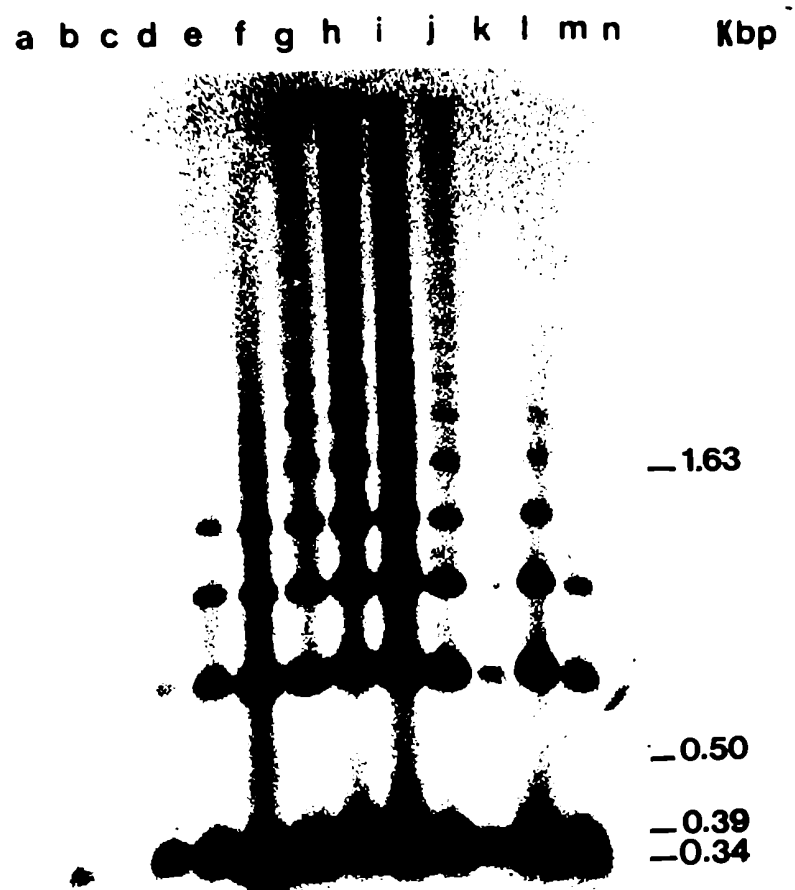


FIGURA 9. La SRPC está presente en varias especies de *Ctenomys*. Southern-blot conteniendo ADNs de varias especies de *Ctenomys*, *Mus musculus* y *Calomys musculinus* digeridos con Pvu II. pSRPC se hibridó en condiciones en que secuencias con una identidad mayor del 95 % generen señal. Las especies son las siguientes: a) *Mus musculus*, b) *C. occultus*, c) *C. opimus*, d) *C. tuconax*, e) *C. talarum*, f) *C. latro*, g) *C. azarae*, h) *C. australls*, i) *C. porteouisi*, j) *C. mendocinus*, k) *C. cf. perrensi* (2n=54), l) *C. argentinus*, m) *C. cf. perrensi* (2n=58) y n) *Calomys musculinus*. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular.

### 5.5. Patrones de restricción de la SRPC en varias especies de *Ctenomys*

El análisis de *Southern-blot* de ADN de varias especies de *Ctenomys* digeridos con Pvu II mostró que todas las especies, a excepción de *C. opimus*, poseen un patrón del tipo A (fig. 9). Para conocer los patrones de restricción de otras enzimas se digirieron ADNs de varias especies de *Ctenomys* con Msp I, Hae III y EcoR I y se hibridaron en condiciones de alta exigencia de identidad usando como sonda pSRPC (fig. 10). Idénticos patrones se obtuvieron cuando la hibridación se repitió en condiciones de baja exigencia de identidad, excepto en el caso de *C. opimus* (ver 5.7). Como en el caso del experimento de la figura 9, hay diferencias interespecíficas en la cantidad total de SRPC. Los patrones muestran además diferencias interespecíficas en la proporción de monómeros con sitios de restricción para cada una de las enzimas. Un caso extremo es *C. occultus*, cuya SRPC posee escasos monómeros con secuencias de reconocimiento para las enzimas empleadas, acumulándose mayoritariamente la señal en fragmentos de alto peso molecular (fig. 10, carriles a). En otros casos se observan patrones de tipo B, que en algunos casos muestran diferencias interespecíficas en la proporción de monómeros con sitios de reconocimiento para una determinada enzima. Por ejemplo, en la digestión con Msp I, en *C. tuconax* (fig. 10, carril d) la señal es intensa en la posición correspondiente a monómero; en cambio, en *C. australls* y *C. porteousi* (fig. 10, carriles f y h, respectivamente) la señal en la posición correspondiente a monómeros es muy débil y la señal más intensa aparece en dímeros.

Estas diferencias interespecíficas no parecen ser el resultado de diferencias importantes en la secuencia misma, dado que la hibridación se realizó en condiciones en las que secuencias con una identidad menor al 95 % no pueden generar señal. Estas diferencias se explican considerando que monómeros con unos pocos cambios en la secuencia se encuentran en proporción variable en las distintas especies.

Diferencias cualitativas en los patrones de restricción de una secuencia satélite, así como diferencias cuantitativas de dicha secuencia en especies relacionadas, fueron descritas en otros casos (Árnason 1982, Árnason et al. 1984, Widegren et al 1985, Bogenberger et al. 1987, Árnason et al. 1988, Dod et al. 1989).

Las diferencias observadas refuerzan la idea de que en los distintos linajes el proceso de amplificación ocurre a través de un mecanismo capaz de generar diferencias cualitativas (por ejemplo en los patrones de restricción), sin que ello implique alteración importante en la secuencia monomérica. Es decir, las diferencias en los patrones de restricción en las distintas especies sugieren

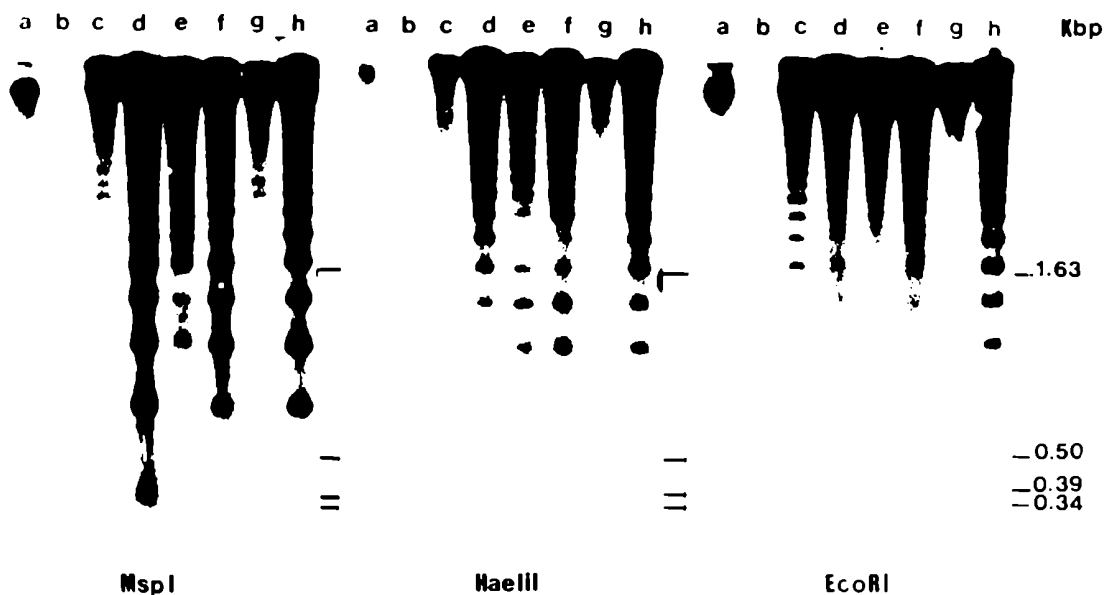


FIGURA 10. *Patrones de restricción Msp I, Hae III y EcoR I de la SRPC en varias especies de Ctenomys.* Southern-blot conteniendo ADNs de varias especies de *Ctenomys* digeridos con Msp I, Hae III y EcoR I. pSRPC se hibridó en condiciones de alta exigencia de identidad. Las especies son las siguientes: a) *C. occultus*, b) *C. opimus*, c) *C. talarum*, d) *C. tuconax*, e) *C. latro*, f) *C. australls*, g) *C. cf. perrensi* ( $2n=58$ ) y h) *C. porteousi*. pBR322 digerido con Hinf I se usó como marcador de peso molecular.

que existe un mecanismo por el cual monómeros con escasos cambios en su secuencia (por ejemplo en un sitio de restricción) se amplifican azarosamente en un determinado linaje y no en otro.

### **5.6. Diferencias cuantitativas y cualitativas de la SRPC en diez especies de *Ctenomys***

El grado de amplificación de una secuencia satélite, así como la periodicidad de la organización de la totalidad de las secuencias que lo componen, puede dar pistas importantes sobre la evolución de la secuencia misma, así como sobre las relaciones de parentesco entre especies cercanas.

Como se mostró en la sección 5.5, la SRPC presenta diferencias interespecíficas tanto en las cantidades relativas como en los patrones de restricción.

Con el objeto de estudiar en detalle estas diferencias se realizaron experimentos de *dot-blot* para cuantificar la SRPC y de *Southern-blot* para analizar las diferencias cualitativas en un grupo de diez especies de *Ctenomys* y se compararon los resultados de ambos análisis.

#### **5.6.1. Diferencias cuantitativas**

Se sembraron 1000, 100 y 10 ng de ADN de diez especies de *Ctenomys* en puntos (*dot-blot*) sobre membranas de nylon y se hibridaron en condiciones de alta exigencia de identidad con pSRPC (fig. 11). Las especies se agruparon de acuerdo con su contenido de SRPC en alto, bajo y nulo (ver Tabla II), con un criterio relativamente arbitrario, pero operativo, como se verá más adelante. En las condiciones en las que se realizó la hibridación, la única especie que no da señal positiva es *C. opimus*. El grupo con bajo contenido en SRPC está compuesto por las especies *C. cf. perrensi*, *C. tuconax* y *C. occultus*. El grupo con alto contenido en SRPC está compuesto por las especies *C. porteousi*, *C. australis*, *C. azarae*, *C. mendocinus*, *C. talarum* y *C. latro*.

Para analizar si las especies agrupadas en la tabla II se relacionan no sólo por la cantidad de SRPC, sino también por las periodicidades en los patrones de restricción, se realizaron ensayos de *Southern-blot* con estas mismas especies, utilizando varias enzimas de restricción.

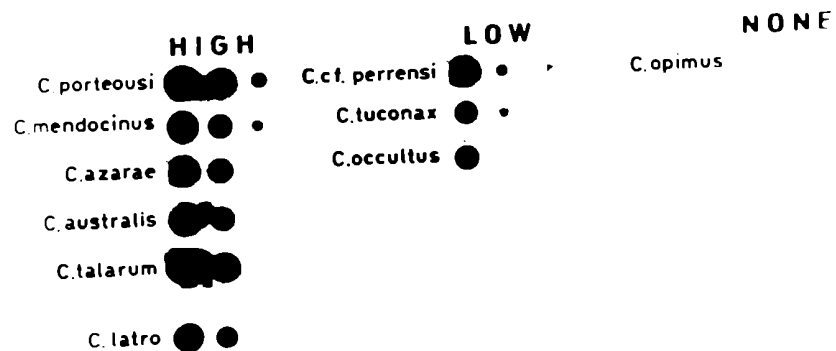


FIGURA 11. *Diferencias cuantitativas de la SRPC en diez especies de Ctenomys.* Hibridación en dots de ADNs de especies de *Ctenomys* con pSRPC en condiciones de alta exigencia de identidad. En las posiciones correspondientes a las distintas especies de *Ctenomys*, se sembraron 1000, 100 y 10 ng de ADN. Las especies se agruparon de acuerdo con su contenido alto, bajo o nulo de SRPC.

TABLA II. *Grupos de especies de Ctenomys de acuerdo con su contenido en SRPC.* La cantidad de SRPC se estimó a partir de la hibridación en *dot-blot* en condiciones de alta exigencia de identidad (ver fig. 11)

ALTO	BAJO	NULO
<i>C. porteousi</i>	<i>C. cf. perrensi</i>	<i>C. optimus</i>
<i>C. mendocinus</i>	<i>C. tuconax</i>	
<i>C. azarae</i>	<i>C. occultus</i>	
<i>C. australis</i>		
<i>C. talarum</i>		
<i>C. latro</i> *		

\* El contenido de SRPC de *C. latro* es en realidad intermedio entre el de las especies de los grupos alto y bajo.

### 5.6.2. Diferencias cualitativas

Para analizar las diferencias en las periodicidades de restricción de SRPC en las diez especies ensayadas en el experimento anterior, se digirieron los ADNs con EcoR I, Pst I, Hinf I y Ava II y se los hibridó en un ensayo de *Southern-blot* con pSRPC, en condiciones de alta exigencia de identidad (fig. 12).

Los patrones de restricción de *C. porteousi*, *C. azarae*, *C. australls*, *C. mendoclnus* y *C. talarum* resultaron ser idénticos para las cuatro enzimas. Todos los patrones son del tipo B, comenzando la señal en dímeros a multímeros de mayor tamaño.

Los patrones de restricción de *C. latro* son también muy semejantes a estos últimos, aunque en esta especie la señal visible comienza en trímeros o tetrámeros.

Este grupo de especies es el mismo que resultó incluido en la categoría de alto contenido en SRPC, de acuerdo con el experimento de *dot-blot* de la figura 11.

En contraposición, el grupo de especies con bajo contenido en SRPC, que incluye a las especies *C. cf. perrensi*, *C. tuconax* y *C. occultus*, presenta patrones de restricción distintos entre sí. Por ejemplo, en el caso de la restricción con EcoR I, *C. tuconax* (fig. 12, carril h) presenta un patrón del tipo B, aunque con señal desde trímeros a multímeros de mayor tamaño. La proporción de monómeros con secuencias de reconocimiento para EcoR I es menor en el caso de *C. cf. perrensi* (fig. 12, carril g) y prácticamente nula en el caso de *C. occultus* (fig. 12, carril i). En esta última especie la SRPC no es prácticamente digerida por EcoR I, Pst I ni Ava II, pero en cambio la digestión con Hinf I da un patrón del tipo B (fig. 12, carril i). Por ende, tanto los ensayos cuantitativos como los cuantitativos señalan la existencia de una relación cercana entre *C. porteousi*, *C. azarae*, *C. australls*, *C. mendoclnus* y *C. talarum*. Existe también relación, pero en menor grado, entre dicho grupo de especies y *C. latro*.

### 5.6.3. Distribución geográfica de las especies estudiadas

Existen en *Ctenomys* dos tipos básicos de morfología de espermio, simétrico y asimétrico. Las especies pueden agruparse en dos grupos, según posean uno u otro tipo de espermio (Feito y Gallardo 1982). El espermio asimétrico es similar en morfología al de otros roedores caviomorfos,

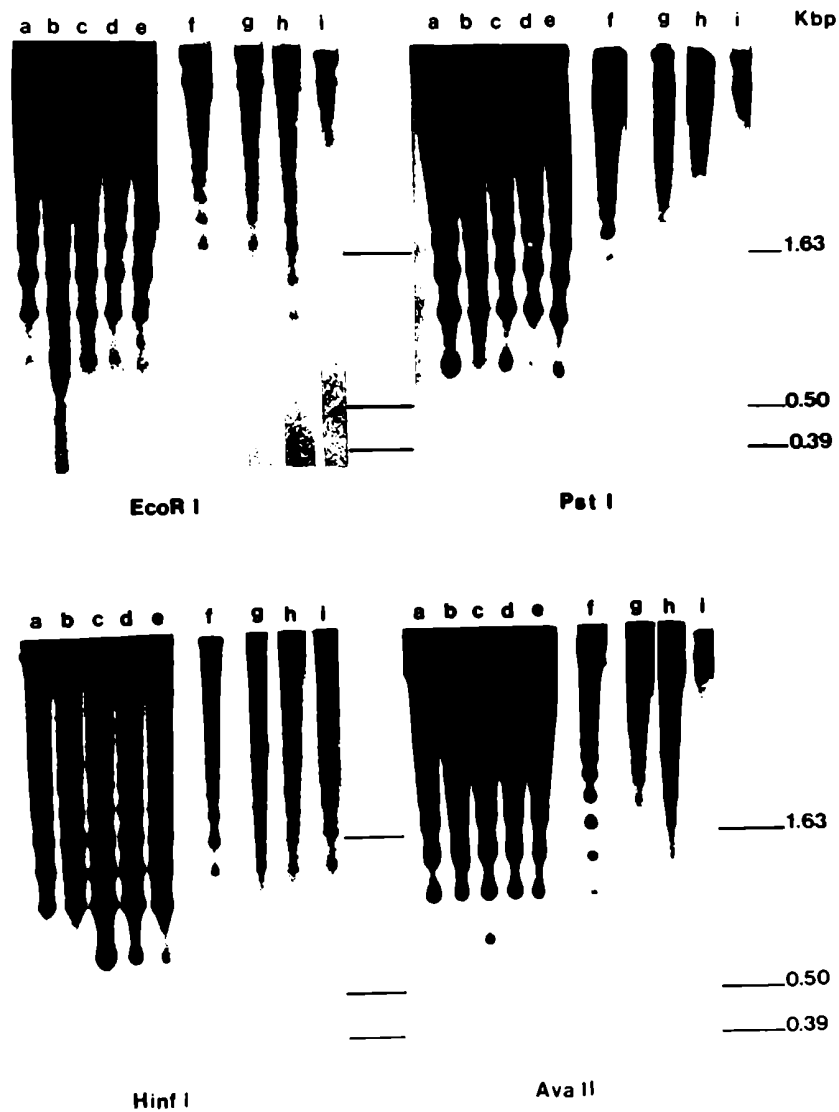


FIGURA 12. *Diferencias interespecíficas en los patrones de restricción de la SRPC en diez especies de Ctenomys.* Southern-blot conteniendo ADNs de varias especies de *Ctenomys* digeridas con EcoR I, Pst I, Hinf I y Ava II e hibridados con pSRPC en condiciones de alta exigencia de identidad. Las especies son las siguientes: a) *C. mendocinus*, b) *C. porteousi*, c) *C. australis*, d) *C. talarum*, e) *C. azarae*, f) *C. latro*, g) *C. cf. perrensi* ( $2n=54$ ), h) *C. tuconax* e i) *C. occultus*. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular.



en particular a los de Octodontidae, y ha sido considerado el tipo ancestral (Vitullo et al. 1988). Varios autores (Feito y Gallardo 1982, Vitullo et al. 1988) han observado que las especies con espermio simétrico se distribuyen al norte de las de espermio asimétrico, aunque con alguna excepción. El límite entre un grupo de especies y otro está aproximadamente a los 30° de latitud sur.

Una correlación análoga a la de morfología espermática y distribución geográfica existe respecto a este último parámetro y la cantidad y calidad de SRPC.

La figura 13 muestra la distribución geográfica de las diez especies analizadas en experimentos de *dot-blot* y *Southern-blot*. Todas las especies con alto contenido en SRPC e iguales patrones de restricción (Tabla II y fig. 12), con excepción de *C. latro*, están distribuidas al sur de los 30° de latitud sur. Al norte de esta latitud están distribuidas las especies del grupo con bajo contenido en SRPC, así como también *C. opimus*. La correlación entre cantidad y calidad de SRPC y distribución de las especies será discutida en referencia a las relaciones filéticas dentro de *Ctenomys* (ver Discusión).

### **5.7. Secuencias relacionadas con SRPC en *C. opimus***

Los experimentos de las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran que en condiciones de alta exigencia de identidad no es posible detectar secuencias relacionadas a SRPC en *C. opimus*. Dentro del grupo de especies de *Ctenomys* analizadas, *C. opimus* es la única que presenta esta particularidad. Para investigar la posibilidad de que secuencias más lejanamente relacionadas a SRPC estuvieran presentes en esta especie, se hibridó ADN de *C. opimus* digerido con Pvu II con pSRPC en condiciones en las que identidades mayores del 60 % generan señal positiva (fig. 14).

En estas condiciones fue posible detectar secuencias relacionadas con SRPC en *C. opimus*. El patrón Pvu II en este caso es muy distinto del de *C. porteousi*. La señal en la posición correspondiente a los monómeros es muy baja o inexistente, casi no existen hexámeros ni oligómeros de mayor tamaño. Dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros son las especies moleculares presentes en cantidades significativas. Además, la disminución de la señal a medida que aumenta el tamaño del multímero no es regular como en el caso de *C. porteousi*.

La divergencia y escasa cantidad de SRPC en *C. opimus* respecto al resto de las especies



FIGURA 13. *Distribución geográfica de las especies analizadas.* El área sombreada señala la distribución de la subfamilia Ctenomyinae según Mares y Ojeda (1982). ●, ◐ y ○ indican alto, bajo y nulo contenido en SRPC, respectivamente, de acuerdo con la hibridación en dots realizada en condiciones de alta exigencia de identidad (ver fig. 11 y tabla II). Entre paréntesis se incluye el tipo de espermio y el número cromosómico. S = espermio simétrico; A = espermio asimétrico.

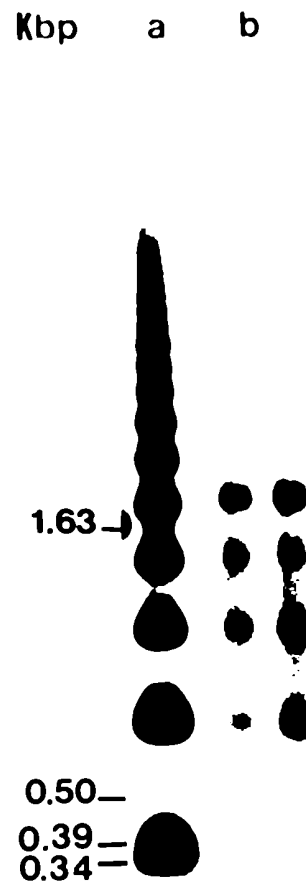


FIGURA 14. *Secuencias relacionadas a la SRPC en Ctenomys opimus*. *Southern-blot* conteniendo ADN de *C. porteousi* (carril a) y de *C. opimus* (carriles b, dos individuos), digeridos con Pvu II e hibridados con pSRPC. La hibridación se llevó a cabo en condiciones de baja exigencia de identidad. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular.

de *Ctenomys* analizadas sugiere que esta especie está lejanamente relacionada con el resto de las especies analizadas (ver Discusión).

#### **5.8. Secuencias relacionadas con la SRPC en Octodontoidea**

*Ctenomys* es el único género viviente de la subfamilia Ctenomyinae y se caracteriza por poseer adaptaciones a la vida subterránea y herbívora (ver 1.1.4). Los miembros de la subfamilia hermana Octodontinae son roedores de hábitos más generalizados, la misma incluye especies habitantes de la superficie como *Octodontomys gliroides*, o de madrigueras como *Octodon degus*. Ambas subfamilias están incluidas en la familia Octodontidae. Una familia hermana de esta última es la familia Echimyidae (ver 3.1.1).

Reig (1986) sugirió que los echímidos poseen características fenotípicas próximas a las de la cepa del stock ancestral del infraorden Caviomorpha. Varios autores (Ellerman 1940, Pascual et al. 1965, Reig et al. 1990) concuerdan a su vez en señalar que los octodontinos son un grupo muy próximo a los ctenominos.

El estudio de las secuencias relacionadas a la SRPC en estos grupos puede a su vez aportar datos que permitan analizar con otra metodología las hipótesis basadas en datos paleontológicos.

Con el propósito de estudiar la presencia de secuencias relacionadas a SRPC en Octodontidae y Echimyidae se realizaron experimentos de hibridación en puntos con ADNs de especies de ambas familias (fig. 15). Las especies *Octodontomys gliroides* y *Octodon degus* pertenecen a la familia Octodontidae y la especie *Proechimys gualrae* a la familia Echimyidae. El experimento se realizó en condiciones en las que secuencias con una identidad mayor o igual al 60 % generen señal positiva. Cuando la hibridación se realizó en condiciones de mayor exigencia de identidad (95 % o más), no se detectó señal significativa en ningún caso.

De acuerdo con este experimento, secuencias relacionadas con SRPC no están presentes en *Proechimys*, pero sí en *Octodon* y *Octodontomys*. En *Octodon* dichas secuencias son unas diez veces más abundantes que en *Octodontomys*.

La ausencia de secuencias relacionadas a SRPC en *Proechimys* sugiere que éstas se originaron después de la divergencia de este clado y antes de la divergencia de los octodontinos. Una explicación alternativa a ésta es que las secuencias relacionadas a la SRPC estaban presentes en

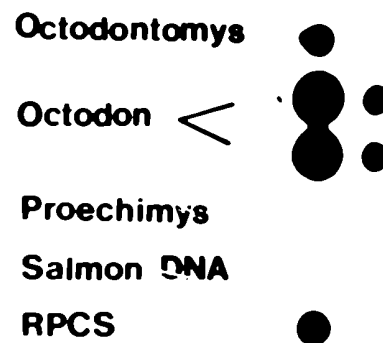


FIGURA 15. *Secuencias relacionadas con la SRPC en octodontinos y echímidos*. Hibridación en dots de 1000, 100 y 10 ng de ADNs de *Octodontomys gliroides*, *Octodon degus* (dos individuos), *Proechimys gualrae* y de salmón (como control negativo), con pSRPC en condiciones de baja exigencia de identidad. 1000, 100 y 10 pg de ADN de pSRPC se incluyeron como controles positivos.

el ancestro común a estos dos grupos y que luego de la divergencia de los echimidos existió una delección total de la secuencia en esta última rama. Esta última explicación es menos parsimoniosa que la anterior, por lo cual considero que la ausencia de secuencias relacionadas a la SRPC en **Proechimys** está de acuerdo con lo postulado desde el ámbito de la paleontología sobre la temprana divergencia de este grupo del stock ancestral. Sin embargo, sería importante analizar mayor número de especies de ambas familias y de familias relacionadas.

Para estudiar más detalladamente las secuencias relacionadas a SRPC en **Octodontomys gllroides** y **Octodon degus**, se digirieron ADNs de ambas especies con Pvu II y se los hibridó con pSRPC en condiciones de alta y baja exigencia de identidad (fig. 16). En condiciones de hibridación de alta exigencia de identidad ninguna de las especies produce una señal significativa.

El patrón Pvu II de estas dos especies es del tipo B, a diferencia de las especies de **Ctenomys** (con excepción de **C. opimus**), donde los patrones con esta enzima son típicamente del tipo A.

De la comparación de los patrones Pvu II en **O. gllroides** y **O. degus** surge que si bien ambos son similares desde monómero hasta heptámero u octámero, en la primera especie no hay señal en multímeros de mayor tamaño, mientras que en la segunda hay acumulación de señal en fragmentos de alto peso molecular. A estas secuencias que aparecen en una especie y no en otra se debe la diferencia en masa de la secuencia total encontrada en el experimento de *dot-blot* (fig. 15).

Estos resultados sugieren que en el ancestro común de estas dos especies el patrón Pvu II básico observado en **Octodontomys gllroides** ya estaba presente y que luego de la divergencia se produjo en **Octodon degus** una amplificación muy significativa de secuencias relacionadas con SRPC en las cuales el sitio Pvu II estaba ausente. Al igual que en el caso de los patrones Pvu II en las distintas especies de **Ctenomys**, estos resultados señalan que la velocidad de amplificación de SRPC o secuencias relacionadas puede variar significativamente en distintos linajes.

### **5.9. Secuencia nucleotídica de la SRPC**

El conocimiento de la secuencia nucleotídica de un satélite puede brindar información importante sobre su origen y mecanismo de amplificación. Con este propósito se determinó la secuencia nucleotídica de la SRPC.

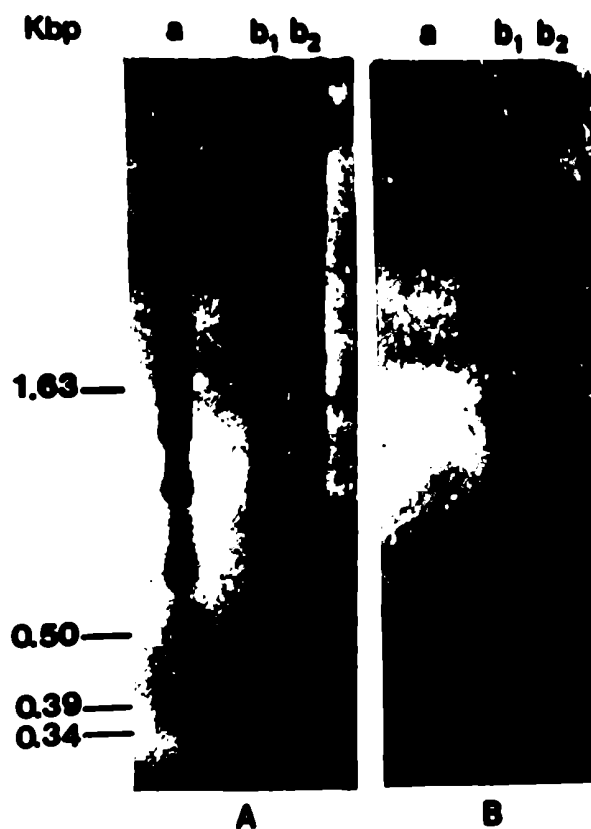


FIGURA 16. *Comparación de secuencias relacionadas a la SRPC en Octodontomys gliroides y Octodon degus. Southern-blot de ADNs de Octodontomys gliroides (a) y Octodon degus (b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>, dos individuos) digeridos con Pvu II e hibridados en condiciones de baja (A) y alta (B) exigencia de identidad con pSRPC. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular.*

El inserto del pSRPC se extrajo del vector pUC 18 por digestión conjunta con EcoR I y Hind III. El inserto se electroeluyó, se reclonó en M13mp18 y M13mp19 y se secuenciaron ambas cadenas mediante el método de Sanger (Sanger et al. 1977). La figura 17 muestra la secuencia obtenida. El monómero tiene 337 pb y su composición en C+G es aproximadamente del 42 %.

En la figura 17 están indicadas las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo. De acuerdo con lo estadísticamente esperable, no hay en el monómero clonado sitios de reconocimiento para aquellas enzimas cuyo patrón de restricción es del tipo B: Ava II, EcoR I, Msp I, Hae III, Hinc II y Pst I. Hinf I es una excepción, dado que tiene una secuencia de reconocimiento en el monómero y patrón de tipo B, lo cual indica que por azar el monómero secuenciado tiene sitio de reconocimiento para dicha enzima, aunque de acuerdo con el patrón de tipo B no es probable que una alta proporción de monómeros lo contengan. La enzima Dde I tiene cuatro sitios de restricción en la SRPC. Los productos de digestión con esta enzima rinden fragmentos de 144, 70, 47, 38 y 9 pb, es decir, de muy bajo peso molecular. Esta es la razón por la cual no se detecta señal en el carril correspondiente a esta enzima en el experimento de *Southern-blot* de la figura 7.

Cuando se hibridó el ADN de *C. porteus* digerido con varias enzimas de restricción con pSRPC (fig. 6) se evidenciaron diferencias en los patrones de cada una de las enzimas utilizadas. Como se señaló, estas diferencias se deben a una distinta proporción de monómeros que componen la secuencia total que contienen sitios de restricción para cada una de estas enzimas. Es interesante señalar que cuando se analizaron las subsecuencias de la SRPC que mediante la sustitución de un solo nucleótido pueden dar origen a una secuencia de restricción (a las que se denominó sitio potencial de restricción), se encontró una buena correlación entre el número de este tipo de sitios para cada una de las enzimas analizadas y sus patrones de restricción. Por ejemplo, la enzima Hae III, que tiene una mayor proporción de monómeros con secuencias de reconocimiento respecto a EcoR I y Hinc II (fig. 6), tiene cinco sitios potenciales de restricción en el monómero. Estos sitios potenciales están en las posiciones 4, 136, 179, 269 y 304. La enzima EcoR I, que tiene una proporción intermedia de monómeros con secuencias de reconocimiento, tiene dos sitios potenciales en las posiciones 54 y 238. La enzima Hinc II, que presenta menor proporción de monómeros con sitios de reconocimiento, tiene un solo sitio potencial en la posición 33.

Dado que una única mutación puntual en el sitio potencial origina el sitio de restricción para una enzima dada, cuanto mayor sea el número de los primeros, mayor será la probabilidad de



Pvu II	10	20	30	40	50	60	70
Alu I	CTGGGCTATT	CTCTATTCCA	<u>GACTCACTCT</u> TAGACAACAT	GATGGAGCAC	AAGAAATTCC	ATCTTGAAC	
			Hinf I	Dde I			
	80	90	100	110	120	130	140
	ACCCTGCATA	CATACCAGGG	GAAATAACCT	<u>CAGTCCCTT</u> AGGAATGAAA	GGGAGAGAAA	ACATGTGCCT	
			Dde I				
	150	160	170	180	190	200	210
	GTATCTCTTT	TGCACTAAGA	ACTGGAAGC	ACCAACTTCG	CCTATACTTT	<u>CTCTTAGGAG</u>	ACTGAACGAG
			Dde I				
	220	230	240	250	260	270	280
	TTGCAACACT	CACAACCTCA	CACCTCTGAA	TTGGTTTGGGA	ACCAATGTGA	CACACATTAG	CCAAAATGCT
			Dde I				
	290	300	310	320	330		
	GTATTTTGCT	ATATCAGGAA	ACAGGCATTG	CAGTCCCTG	CTTCCCAATT	<u>TGATCAG</u>	
			Pvu II	Alu I			

FIGURA 17. *Secuencia nucleotídica de la SRPC*. Dentro de la secuencia están señaladas las posiciones de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas que poseen secuencias de reconocimiento dentro del monómero.

aparición de los segundos y, por lo tanto, mayor será la probabilidad de que el monómero que los contenga sea amplificado (ver Discusión).

### **5.9.1. Ausencia de repeticiones internas en la SRPC**

El principal ADN satélite de ratón (*Mus musculus*) tiene 234 pb y está organizado como una unidad compuesta por un conjunto jerárquico de subsecuencias de longitud decreciente, que puede reducirse a una unidad básica de 9 pb (Southern 1975 a y b). Se ha postulado que ésta es la unidad que originalmente se amplificó y que la secuencia de 234 pb es el resultado de esta amplificación y de algunas mutaciones puntuales e inserciones que ocurrieron durante la misma. Para saber si SRPC pudo haberse originado en forma similar, se buscaron en el monómero de la SRPC subsecuencias que se repitieran internamente de tal manera que pudieran haber sido la unidad básica a partir de la cual se originó el monómero. Se utilizó el programa "DNA Inspector II" y se analizaron todas las subsecuencias posibles de la SRPC de 4, 5, 7 y 9 nucleótidos. El programa "recorre" la secuencia total con cada una de las subsecuencias buscando identidades. En la figura 18 se muestra el resultado de la búsqueda con secuencias de cuatro nucleótidos, que indica que no hay repeticiones internas importantes. Resultados similares se obtuvieron con las restantes subsecuencias.

De acuerdo con estos resultados, SRPC no parece haberse originado por sucesivas ampli-ficaciones de una subsecuencia, como parece ser el caso para otros satélites (Southern 1975a y b, Dennis et al. 1980, Prosser et al. 1986). Por lo tanto, es probable que la protosecuencia que originó a SRPC fuera similar en tamaño al monómero de 337 pb.

### **5.9.2. Metilación y abundancia de dinucleótidos CG en la SRPC**

Algunos satélites son particularmente ricos en poliCA de dos o unos cuantos pares de bases, intercalados o no con secuencias de otro tipo (Epplen et al. 1983, Jean y Hayward 1983). La abundancia en CA ha sido explicada por la ocurrencia de la conversión del duplete CG en CA y la eventual expansión de estos últimos por "replicación con deslizamiento" (*slipped-strand mispairing* o *replication slippage*) (Levinson y Gutman 1987). La conversión de dupletes CG en CA tiene lugar porque los nucleótidos C metilados pueden sufrir desaminación (Raizin y Riggs 1980), causando

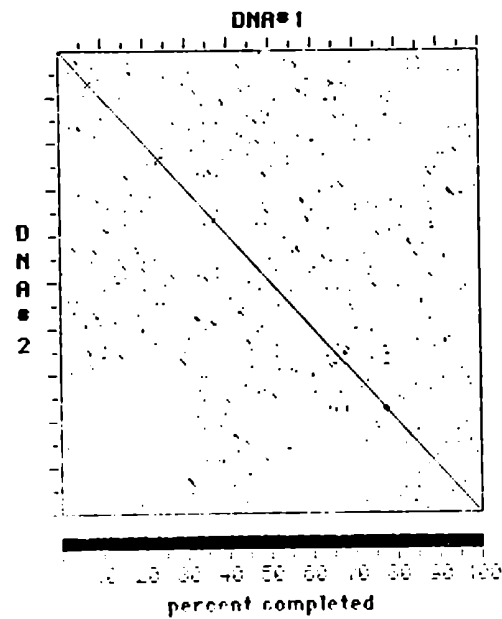


FIGURA 18. *Análisis de las repeticiones internas de la SRPC.* Se utilizó el programa DNA Inspector II para buscar subsecuencias de cuatro nucleótidos del monómero de SRPC que se repitieran internamente. DNA<sub>1</sub> y DNA<sub>2</sub>, que figuran en los ejes de ordenadas y abscisas, respectivamente, simbolizan la secuencia nucleotídica del monómero de SRPC. El programa toma todas las subsecuencias posibles de cuatro nucleótidos y "recorre" nucleótido por nucleótido la secuencia total buscando identidades. Cada punto indica identidad. La línea de puntos indica la identidad del monómero consigo mismo.

la transformación de C en T. Dado que el 90 % de los residuos C metilados ocurren en dupletes 5' CG 3' (Raizin y Riggs 1980), este proceso tiende a aumentar la abundancia de 5' TG 3' junto con su complementario 5' CA 3'.

Para saber si este proceso de enriquecimiento en el duplete CA estaría ocurriendo en la SRPC, se analizaron dos parámetros: la abundancia de los dupletes CG, TG y CA y el grado de metilación del duplete CG.

Para analizar el grado de metilación de los dupletes CG se digirió exhaustivamente el ADN de una de las especies que tiene alto contenido en la SRPC, *C. australis*, con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II. Ambos reconocen la secuencia 5' CCGG 3', pero Hpa II no corta si la segunda C está metilada. El resultado se muestra en la figura 19. En comparación con Msp I, Hpa II digiere sólo parcialmente SRPC, es decir, la secuencia está parcialmente metilada.

En la Tabla III se indican los valores observados y esperados de dinucleótidos CG, TG y CA. La frecuencia de CG observada es menor que la esperada por azar, mientras que la frecuencia de TG y CA observadas son mayores que las esperadas por azar. Tomados en conjunto, los resultados de metilación de CG y proporción de dinucleótidos CG, TG y CA sugieren que existe una tendencia a la desaminación de los residuos C metilados en SRPC.

### 5.9.3. Subsecuencias significativas de la SRPC

Para verificar si la SRPC poseía identidad significativa con alguna subsecuencia previamente descrita, se realizó una búsqueda utilizando una computadora, un banco de datos (Gen Bank) y el programa de IBI para analizar relaciones de identidad. No se encontró identidad con otras secuencias de su tipo; es decir, la SRPC es un satélite nuevo. Sin embargo, este análisis reveló que existe una identidad del 70 % entre una subsecuencia de la SRPC que abarca la zona comprendida entre los nucleótidos 226 y 289 y una porción correspondiente al extremo 3' del dominio U3 del *LTR (long terminal repeat)* del retrovirus *RSV (Rous sarcoma virus)*, como se muestra a continuación:

LTR-RSV

└ CagACAggTCTGAc aTGGaTTGGAACCAcTGa a t t cGgCATT\_GCagAgATa t TGTATTTTGC

└ Ct cACA c t TCTGaa.t TGGt TTGGAACCAcTG t g a c aCaCATTaGCc aAaATg c TGTATTTTGC

SRPC

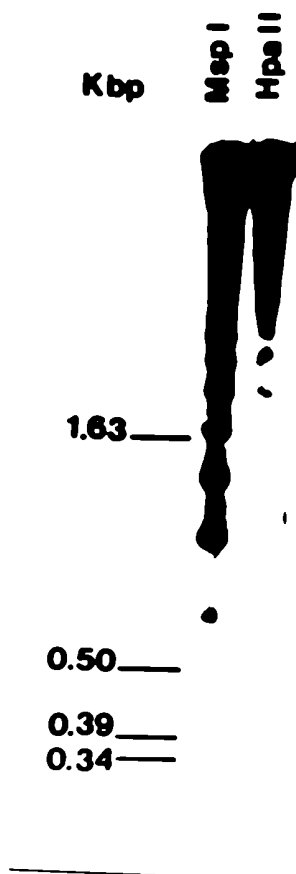


FIGURA 19. *Metilación de la SRPC.* Southern-blot conteniendo ADN de *C. australis* digerido con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II e hibridado con pSRPC en condiciones de alta exigencia de identidad. pBR322 digerido con Hinf I se utilizó como marcador de peso molecular.

TABLA III. *Frecuencias de nucleótidos y dinucleótidos en la SRPC*

NUCLEOTIDOS			DINUCLEOTIDOS		
<i>Observado</i>			<i>Esperado*</i>		
<i>Frecuencias</i>			<i>Frecuencias</i>		
A	104	(0,3086)	CG	2	(0,0060) 0,0421
C	81	(0,2403)	TG	23	(0,0682) 0,0483
G	59	(0,1751)	CA	31	(0,0920) 0,0741
T	93	(0,2760)			

\* El valor esperado se calculó como el producto de las frecuencias observadas de cada nucleótido del par/100.

Esta porción del *LTR* del *RSV* contiene secuencias relevantes a la replicación y a la transcripción de este virus (Fields y Knipe, 1990). Este hecho condujo a realizar un análisis exhaustivo de las subsecuencias presentes en la SRPC que pudieran estar involucradas en estos procesos. De este estudio pudo concluirse que la SRPC tiene los siguientes elementos:

a) Entre el nucleótido 111 y el 131 una secuencia polipurínica AAGGAATGAAAGGGAGAGAAAA. Este tipo de secuencias están flanqueando el extremo 5' del dominio U3 del *LTR* de los retrovirus (Varmus 1982) (fig. 20).

b) A continuación de la secuencia polipurínica se encuentra la secuencia CATGT que constituye el extremo 5' del dominio U3 del *LTR* de los retrovirus (Varmus 1982) (fig. 20).

c) Entre el nucleótido 252 y 256 se encuentra la secuencia CCAAT, presente en numerosos promotores de genes y también en la región U3 de varios retrovirus (Fields y Knipe 1990) (fig. 21). Esta secuencia es sitio de unión de proteínas regulatorias, entre las que se encuentran los productos de los oncogenes *Myc*, *Jun* y *Fos* y una proteína reguladora aislada de levaduras, denominada GC N<sub>4</sub> (Landschulz et al. 1988). Estas proteínas poseen en común una serie de grupos leucina que se alinean en la estructura tridimensional de la proteína para constituir un dominio hidrofóbico que, al intercalarse con otro semejante, constituye una unión denominada "cierres relámpago" (*leucine zipper*). Esta unión permite que dos subunidades de la proteína que poseen un dominio básico se unan al ADN de manera tal que quedan próximas dos secuencias de ADN linealmente separadas.

d) Entre el nucleótido 290 y el 297 se encuentra la secuencia TATATCAG, que presenta una gran identidad con las secuencias promotoras situadas cerca del extremo 3' de la región U3 ("TATA box") del *LTR* de los retrovirus (Varmus 1892) (fig. 20).

e) Entre los nucleótidos 163 y 169 y los nucleótidos 241 y 248 se encuentran las secuencias TGGAAAG y TGGTTTG, las cuales poseen una significativa identidad con la secuencia *core* TGG(A\T)(A\T)(A\T)G de numerosos *enhancers* transcripcionales de genes eucariotas y genomas virales (Geuzman y Shenk 1983, Norton y Coffin 1987).

f) Entre los nucleótidos 151 y 159 se encuentra la secuencia TGCACTAAG presente también en la región U3 del *LTR* de varios virus oncogénicos (Ryden y Beemon 1989). Estas secuencias también se unen a las proteínas que poseen "cierres relámpago", descritas más arriba.

g) Entre los nucleótidos 51 y 56 está la secuencia AAGAAA, que es muy semejante a la señal

<u>Virus</u>	<u>Primer de cadena (+)</u>	U3	R
RSV	AGGGAGGGGA	AATGT	<u>TATTTAG</u> AATAAA
ev1	AGGGAGGGGA	AATGT	TATATAA AATAAA
SNV	AGTGGGG	AATGT	<u>TATAAG</u> AATAAA
MoMLV, MSV	AGAAAAGGGGG	AATGA	<u>AATAAAG</u> AATAAA
MMTV	AAAAGAAAAGGGGA	AATGC	<u>TATAAAG</u> AGTAAA
SRPC	AGGAATGAAAGGGAGAGAAA	CATGT	<u>TATATCAG</u> AAGAAA

FIGURA 20. *Identidad entre subsecuencias de la SRPC y "long terminal repeats" de varios retrovirus.* RSV = Rous sarcoma virus; ev1 = RSV de pollo endógeno del locus ev1; SNV = virus aviar necrosante del bazo; MoMLV, MSV = cepas Moloney de leucemia y sarcoma murinos, respectivamente; MMTV = virus de tumor mamario murino. (Varmus 1982 y trabajos allí citados.)



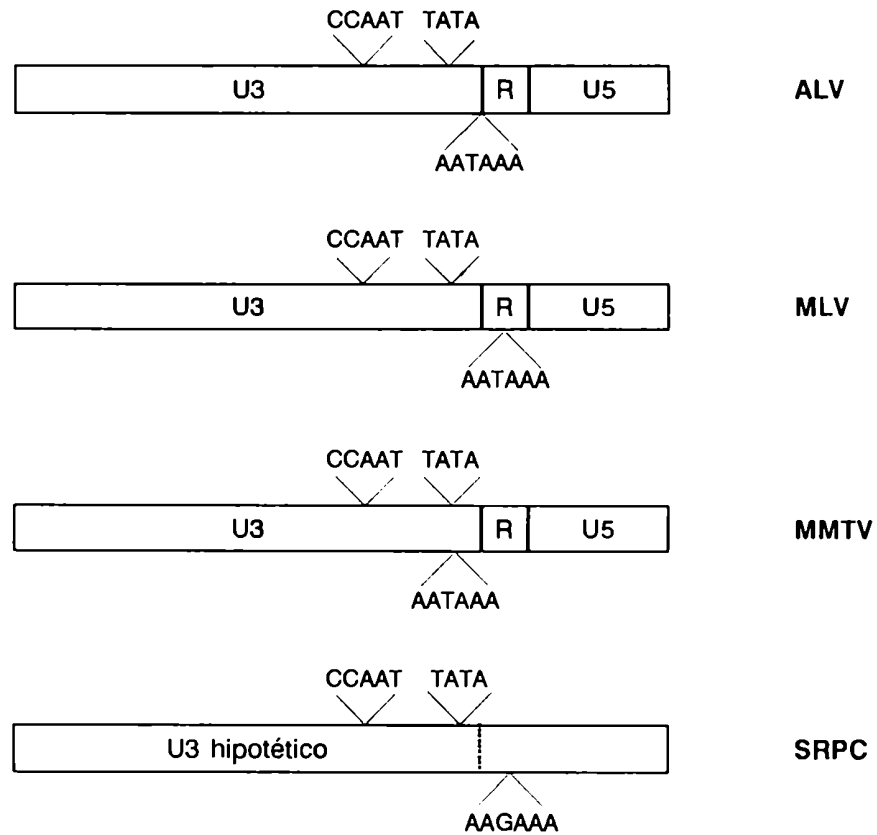


FIGURA 21. *Señales de transcripción en varios retrovirus y sus contrapartes en la SRPC.* U3, R y U5 son dominios de los LTRs. AVL = virus de leucemia aviar; MLV = virus de leucemia murina; MMTV = virus de tumor mamario murino.

de poliadenilación de eucariotas AATAAA (Proudfoot y Brownle 1974) y a la de varios retrovirus (Varmus 1982) (figs. 20 y 21).

Todos estos elementos sugieren que la SRPC se originó como consecuencia de la integración de un retrovirus, seguida de la delección de una gran parte de su genoma, o bien de un retrovirus delecionado.

h) Es interesante señalar que en la secuencia del monómero se encuentran las secuencias 5' CAGG 3' y 5' GAGG 3' o sus complementarias, que han mostrado promover eventos de recombinación. Estas secuencias están presentes en los minisatélites aislados por Jeffreys y colaboradores (1985a) y también se hallan presentes en los "hot spots" recombinacionales del complejo mayor de histocompatibilidad murino (Steinmetz et al. 1986), y su secuencia está muy relacionada con la señal de recombinación  $\chi$  del fago  $\lambda$  (Smith et al. 1981). Bogenberger y colaboradores (1987) encontraron estas mismas secuencias en una familia de ADN satélites en ciervos. La secuencia 5' CAGG 3' está en los nucleótidos 86 y 295 del monómero, y su complemento 5' CCTG 3' en los nucleótidos 73, 138 y 317. La secuencia complementaria de 5' GAGG 3', 5' CCTC 3', está en los nucleótidos 98 y 226 (ver fig. 17).

i) Si bien aún se sabe poco sobre el origen de replicación en eucariotas, se han identificado secuencias denominadas "secuencias de replicación autónoma" (ARS: *autonomous replication sequences*) que son capaces de amplificarse en levaduras cuando se las clona en vectores que carecen de origen de replicación propio (Montiel et al. 1984; Grodberg et al. 1990). Se ha postulado que estas secuencias son el origen de replicación de los cromosomas eucariotas (Huberman et al. 1988; Amati y Gasser 1988). Secuencias ARSs se han aislado de un satélite de *Drosophila* (Marunouchi y Hosoya 1984), así como de ADN de *Tetrahymena*, *Zea mays* y humanos. Las ARSs no presentan una gran identidad de secuencia entre sí, a excepción de una secuencia consenso de 11 pb, relativamente conservada, necesaria para la replicación autónoma. En algunos ARSs se han identificado además otras secuencias conservadas, localizadas hacia 3' de la anterior, a una distancia de entre 55 y 88 pb, denominados elementos 3' (Palzkill et al. 1986). Ambos tipos de secuencias están presentes con una identidad del 73 % en el monómero de la SRPC (fig. 22). La secuencia consenso de 11 pb de bases está en la posición 277 del monómero y los dos elementos 3' en las posiciones 6 y 27.

	Secuencia consenso de 11 pb	Elemento 3'	Elemento 3'
ARS	$\overline{\text{A}}$ $\overline{\text{T}}$ T T T A T P u T T T T ..... $\overline{\text{A}}$	C T T T T A G C T T T ..... $\overline{\text{A}}$ $\overline{\text{A}}$ $\overline{\text{A}}$	C T T T T A G C T T T ..... $\overline{\text{A}}$ $\overline{\text{A}}$ $\overline{\text{A}}$
SRPC	T g c T g T A T T T T ..... C T a T T c t C T A T ..... C T c T T A G a c A A	C T a T T c t C T A T .....	C T c T T A G a c A A
	277	6	27
	(1)	(68)	(88)

FIGURA 22. *Identidad entre secuencias de la SRPC y secuencias de replicación autónoma (ARSs)*. Las subsecuencias del monómero de la SRPC de las posiciones 227, 6 y 27 tienen una identidad del 73 % con la secuencia consenso de 11 pb y los elementos 3' de las ARSs, respectivamente. Los números que figuran entre paréntesis son los pb que hay entre la primera subsecuencia y las dos últimas. Pu = purina.

**6. *DISCUSSION***

## 6. DISCUSION

### 6.1. Características generales del satélite SRPC

La SRPC es el ADN satélite más abundante presente en el genoma de *Ctenomys*. De acuerdo con la sensibilidad de los experimentos de *dot-blot*, y considerando que el genoma haploide de *Ctenomys* es de 7,2 pg (Ruedas et al. 1990), la SRPC constituye entre el 15 y 20 % del genoma de *C. porteus*, lo que representa aproximadamente 3 a 4 × 10<sup>6</sup> copias por genoma haploide. Los patrones de *Southern-blot* de tipo A y B obtenidos con varias enzimas de restricción (figs. 6 y 7) indican que el satélite SRPC está dispuesto en cadenas compuestas por un gran número de monómeros. El monómero de la SRPC tiene un contenido de C+G del 42 % y parece estar parcialmente metilado (fig. 19, tabla III) por lo menos en hígado.

La ausencia de subsecuencias que se repitan internamente (fig. 18) indica que el monómero no se ha originado por mecanismos como replicación con deslizamiento (Levinson y Gutman 1987) o amplificación de una subsecuencia, como está postulado en el caso de algunos satélites (Southern 1975a y b; Prosser et al. 1986). La secuencia que originó el monómero de la SRPC fue probablemente similar en tamaño a la unidad de 337 pb.

El análisis de relaciones de identidad de la SRPC con otras secuencias publicadas en el Gen Bank indicó que un segmento de la misma tiene una similitud muy marcada con una secuencia presente en el extremo 3' del dominio U3 del LTR (*long terminal repeat*) del retrovirus RSV (ver 5.9.3 y fig. 20). Un análisis de subsecuencias de la SRPC llevó a la identificación de todos los elementos consenso presentes en la región U3 del LTR de los retrovirus (figs. 20 y 21). En los LTRs están las señales que regulan la replicación del virus y la iniciación y velocidad de transcripción (Norton y Coffin 1987; Fields y Knipe 1990). También en esta región se encuentran secuencias reconocidas por proteínas celulares que regulan ambos procesos (Ryden y Beemon 1989).

Estos hallazgos permiten especular sobre el origen de la SRPC y su posible influencia en el proceso de especiación.

En cuanto al origen de la SRPC, podemos imaginar que en el genoma del ancestro común de los ctenominos y octodontinos se insertó un retrovirus, que sufrió *a posteriori* una delección importante en su genoma. Otra posibilidad es que esta delección se haya producido antes de la

inserción, quedando las regiones U3, R y quizás una parte de U5 insertadas en forma estable en el genoma. El mecanismo por el cual esta secuencia pudo haberse amplificado será discutido más adelante (ver 6.2), pero es evidente que esta secuencia tuvo la capacidad de amplificarse e insertarse en el genoma a lo largo de su historia evolutiva.

La pregunta es: ¿puede una secuencia con estas características haber influido en la historia evolutiva del genoma que la contiene? Planteada en estos términos la pregunta puede responderse afirmativamente. Los mecanismos por los cuales esta secuencia pudo haber influido en el proceso de surgimiento de nuevos taxones son:

a) El proceso de amplificación puede generar grandes diferencias en la disposición de distintos bloques cromosómicos y aun en la de los propios cromosomas, lo que podría traer como consecuencia problemas en el apareamiento durante la meiosis y por lo tanto en el aislamiento reproductivo. La dispersión de este satélite podría también alterar las relaciones espaciales de bloques génicos y alterar su programa de regulación (efecto de posición). Estas consideraciones valen para cualquier ADN satélite.

b) La presencia de secuencias promotoras, *enhancers* de transcripción y otros elementos de regulación en la SRPC, sumados a su capacidad de insertarse en el genoma, hace prever la posibilidad de que esta secuencia pueda alterar considerablemente el programa genético global en los distintos linajes (*genome resetting*, Rose y Doolittle 1983).

## **6.2. Amplificación de la SRPC**

Quizás el modelo más sencillo de amplificación y generación de perfiles de restricción A y B de los ADNs satélites sea el de intercambio desigual y acumulación de mutaciones al azar (Southern 1975a y b; Smith 1976). Según este modelo la SRPC debería haberse duplicado (por lo menos duplicado) en tándem en algún momento y luego amplificado a través de sucesivos pasos de deslizamiento y recombinación. Si el monómero inicial contenía un determinado sitio de restricción, al principio este sitio estará presente en todos los monómeros, de manera tal que al digerir con esta enzima se generarían sólo monómeros.

Al producirse mutaciones puntuales que anularan algunos de los sitios de restricción se generarían dímeros, trímeros, etc. El perfil de restricción sería de tipo A. A su vez, la acumulación de

mutaciones generaría secuencias de reconocimiento para otras enzimas de restricción, que por ser menos frecuentes que las presentes en el monómero inicial generarían patrones de tipo B.

La primera objeción a este modelo proviene del análisis realizado por Walsh (1987), que demuestra que el proceso de intercambio desigual produce tanto amplificaciones como deleciones; es decir, no habría amplificación neta del satélite.

La segunda objeción proviene de los resultados de este trabajo al analizar los perfiles de restricción del satélite en distintos linajes. Al comparar los perfiles de restricción Pvu II en las distintas especies de *Ctenomys*, nos encontramos con que especies que poseen la misma cantidad de monómero, dímero y trímero difieren en las cantidades de los multímeros de mayor tamaño (por ejemplo, fig. 9, carriles g y j). Estos resultados no pueden ser interpretados en términos de divergencia global en la secuencia en las dos especies, porque las condiciones de hibridación de este experimento sólo permiten la hibridación de secuencias con una identidad mayor del 95%.

Mucho más evidentes son las diferencias observadas en los perfiles de tipo B entre especies (figs. 10 y 12). En algunas especies el patrón de restricción es típicamente de tipo B (por ejemplo, fig. 10, carril 10), mientras que en otras especies las mismas enzimas de restricción no digieren prácticamente el satélite (fig. 10, carriles a). Es decir, en los distintos linajes hay una variación importante en la proporción de monómeros con sitios de restricción para una determinada enzima, sin que medien diferencias significativas en las respectivas secuencias nucleotídicas. Estos resultados podrían explicarse considerando que en un linaje se amplificó preferencialmente un monómero que contenía un determinado sitio de restricción, mientras que en otros linajes no fueron éstos los monómeros que se amplificaron, sino otros con diferentes sitios de restricción (o quizá ninguno).

Un modelo que postule la amplificación local restringida a unas pocas unidades del satélite que por azar contiene sitios de restricción podría explicar los patrones observados. El modelo que mejor se ajusta a estas premisas es el que se presenta en la figura 23A. Este modelo implica la recombinación intracatenaria entre unidades contiguas o cercanas del satélite, con formación de una estructura circular extracromosómica, y posterior amplificación por círculo rodante (Rossi et al. 1990). Las unidades amplificadas se insertarían por recombinación en zonas homólogas y menos frecuentemente en zonas no homólogas. Los dímeros, trímeros y tetrámeros que se observan en los patrones de *Southern-blot* son consecuencia de la amplificación de monómeros en los que ha desaparecido el (los) sitio(s) por mutación puntual (fig. 23 B).

El modelo presentado implica una recombinación intracatenaria y la replicación autónoma de

---

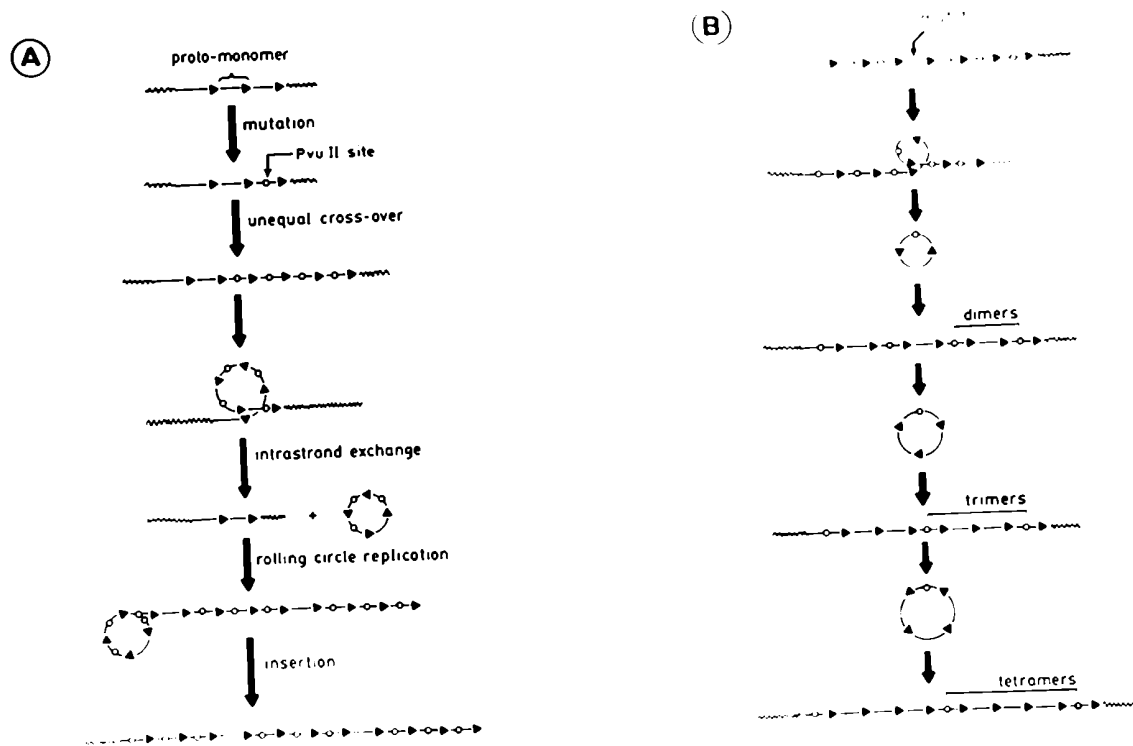


FIGURA 23. *Esquema del mecanismo propuesto de amplificación de la SRPC.* A: En la proto-secuencia precursora de la SRPC se produce una mutación puntual que origina un sitio Pvu II. Este monómero se amplifica por intercambio desigual a una forma oligomérica. Por recombinación intracatenaria entre unidades de una misma cadena portadoras de un sitio Pvu II se forma una estructura circular de doble cadena. Mediante círculo rodante se amplifican los monómeros que contienen el sitio Pvu II. La secuencia amplificada se inserta por recombinación homóloga en la cadena original o bien por recombinación ilegítima en otros sitios cromosómicos. B: La amplificación local de monómeros que contienen mutaciones, mediante el mecanismo descrito en A, origina multímeros de distinto tamaño.



una estructura circular. Respecto a la recombinación, es interesante señalar que en la secuencia del monómero están presentes secuencias que han mostrado promover recombinación (ver 5.9.3). El modelo implica también que la secuencia del monómero pueda, o al menos haya podido, contener un origen de replicación. Estructuras muy similares a las consenso de las *autonomous replication sequences* (ARS) están presentes en la secuencia del monómero (ver 5.9.3 y fig. 22)

El resultado de este mecanismo de amplificación es la formación de dominios dentro del satélite, cada uno de los cuales puede poseer sitios de restricción diferentes, sin que la secuencia del conjunto de los monómeros difiera significativamente. El caso de **Octodon degus** es un ejemplo de esto último. El género **Octodon** comparte con otro género hermano, **Octodontomys**, el patrón Pvu II desde el octámero hasta multímeros de menor tamaño (fig. 16). Sin embargo, en **Octodon** hay además acumulación de señal en fragmentos de alto peso molecular. Estos fragmentos serían el resultado de la amplificación local de monómeros que no contienen sitios Pvu II, que ocurrió en **Octodon** y no en **Octodontomys**.

Otro ejemplo es la gran amplificación de monómeros que contienen sitios Pvu II que se produjo en el linaje que incluye a la mayor parte de las especies de **Ctenomys**, por lo cual esta enzima genera patrones de tipo A en todas estas especies (fig. 9).

### **6.3. Historia evolutiva de la SRPC**

La presencia de secuencias relacionadas con la SRPC en octodontinos y la ausencia de éstas en echímidos induce a pensar que la protosecuencia que originó a la SRPC apareció luego de la divergencia de este último clado y antes de la divergencia de los octodontinos de los ctenominos. De acuerdo con lo discutido, la aparición de la protosecuencia pudo haber estado mediada por la integración y delección (o delección e integración) de parte del genoma de un retrovirus. Posteriormente esta secuencia se amplificó moderadamente, originando un perfil Pvu II que estaría representado por el patrón común a **Octodon** y **Octodontomys**. Como ya se discutió, en la primera rama ocurrió además otra importante amplificación que involucró a monómeros sin sitios Pvu II.

En **C. opimus**, que habría heredado este patrón Pvu II, la amplificación de las secuencias relacionadas a la SRPC no prosiguió; más aún, parte de las secuencias parecen haber sido delecionadas. Es interesante señalar que esta especie es la que contiene menor cantidad de ADN por

genoma haploide (6 pg en promedio) respecto a otras 10 especies bolivianas del género, que están todas muy cercanas al promedio de 7,19 pg (Ruedas et al. 1990).

Sin embargo, cabe la posibilidad alternativa de que el patrón básico haya sido uno semejante al de *C. opimus*, que haya quedado prácticamente sin evolucionar en esta línea y que en la rama de los octodontinos se haya amplificado moderadamente.

La divergencia entre las secuencias del satélite de *C. opimus* y del resto de las especies de *Ctenomys*, así como el patrón Pvu II atípico de esta especie, pueden estar indicando que *C. opimus* divergió tempranamente del tronco principal de *Ctenomys*.

En la rama principal de *Ctenomys* se produjo una amplificación considerable de monómeros que contienen sitios Pvu II, lo que originó patrones de tipo A en todas las especies estudiadas hasta ahora (fig. 9). Sin embargo, la amplificación alcanzó distinto grado en las distintas especies.

La distinta velocidad de amplificación puede estar relacionada a la regulación de la amplificación del satélite por parte de factores celulares que pueden estar en distinta proporción o calidad en los distintos linajes.

En la figura 24 se presenta un esquema de lo discutido en esta sección.

#### 6.4. La SRPC como marcador de la divergencia en *Ctenomys*

La posible historia evolutiva de la SRPC sugiere cuáles fueron las ramas que divergieron más tempranamente que otras. Por otro lado, de la comparación cuantitativa (fig. 11) y cualitativa (fig. 12) de la SRPC en diez especies de *Ctenomys* surge claramente diferenciado un grupo de especies que incluye a las que tienen alto contenido en SRPC.

*C. porteousi*, *C. australls*, *C. azarae* y *C. mendocinus* conforman el Grupo *mendocinus* por presentar todas el mismo  $2n=48$ , los mismos patrones de bandeo C y G y similares características morfológicas y bajas distancias alozímicas y por tener el mismo tipo simétrico de espermio (Massarini et al. 1990, Ortells 1990). *C. talarum* difiere sin embargo en cierto grado de las restantes en los patrones de bandeo C y G (Massarini et al. 1990) y en la presencia de espermio asimétrico (Ortells et al. 1990).

El grupo de bajo contenido en SRPC incluye a las especies *C. cf. perrensi*  $2n=54$ , *C. talarum*

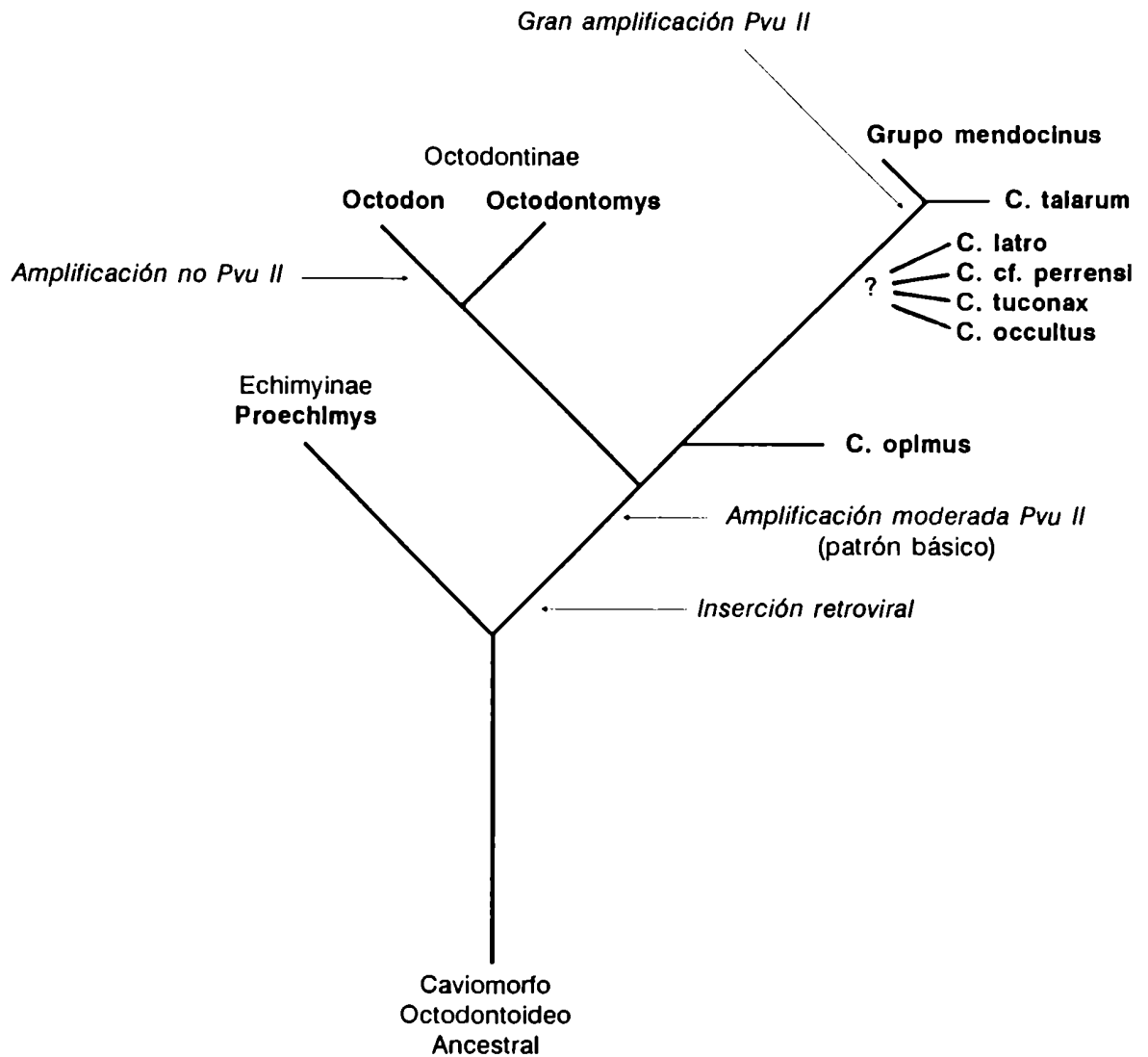


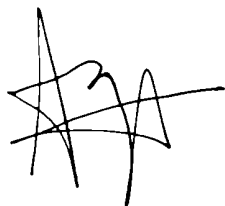
FIGURA 24. *Esquema de la historia evolutiva de la SRPC.* Las ramas indican orden de divergencia, no distancias evolutivas.

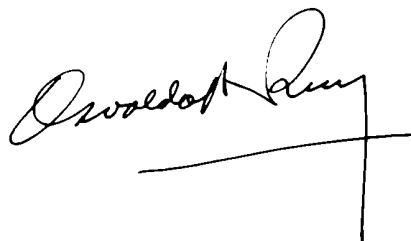
y *C. occultus*. Este grupo es heterogéneo de acuerdo con los patrones de *Southern-blot* de la figura 12 (carriles g, h e i) y de acuerdo con su número cromosómico (fig. 13).

Como se señaló, existe una correlación entre la cantidad y calidad de la SRPC y la distribución geográfica de las especies analizadas (Rossi et al., enviado). Las especies de alto contenido en SRPC están todas localizadas al sur de los 30° de latitud sur, con excepción de *C. latro* (fig. 13). La localización geográfica de esta última especie, así como su contenido intermedio de SRPC y la similitud de sus patrones de restricción con los del grupo *mendocinus*, sugiere como plausible la hipótesis de que esta especie pudo estar relacionada al stock ancestral que colonizó la zona sur de Argentina y que la mayoría de las especies que viven en esa área son derivados de este stock.

La buena correlación entre los agrupamientos de las especies que surgen del análisis de la cantidad y calidad de la SRPC y las características cariotípicas, de tipo de espermio y la localización geográfica, sugiere que la SRPC es un buen marcador del proceso de diversificación ocurrido dentro de *Ctenomys*. La dinámica de la evolución de la SRPC puede dar pistas importantes sobre las relaciones entre los distintos linajes de *Ctenomys*. Esto es coherente con el hecho de que los primeros eventos que ocurrieron en la amplificación de la SRPC en cada uno de los linajes determinaron en gran medida el curso posterior de evolución del satélite en cada uno de ellos.

U. Selomí





## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Amati BB y Gasser SM. 1984. Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* 45:967-978.
- Anderson S, Yates TL y Cook JA. 1987. Notes on bolivian mammals 4: The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *Amer. Mus. Novitates* 2891:1-20.
- Apfelbaum LI, Dalefe L, Massarini A y Reig OA. Enviado. Genetic variability in local populations of the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteus*. *Biochem. Sys. Ecol.*
- Árnason Ú. 1982. Southern blot hybridization in cetaceans, using killer whale restriction fragment as a probe. *Hereditas* 97:47-49.
- Árnason Ú, Höglund y Widegren B. 1984. Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans. *Chromosoma* 89:238-242.
- Árnason Ú y Widegren B. 1986. Pinniped phylogeny enlightened by molecular hybridizations using highly repetitive DNA. *Mol. Biol. Evol.* 3:356-365.
- Árnason Ú, Allderdice PW, Lien J y Widegren B. 1988. Highly repetitive DNA in the baleen whale genera *Balaenoptera* and *Megaptera*. *J. Mol. Evol.* 27:217-221.
- Arrighi FE, Hsu TC, Patbak S y Sawada H. 1979. The sex chromosomes of the chinese hamster: constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences. *Cytogenet. Cell Genet.* 13:268-274.
- Bains W. 1986. The multiple origin of human Alu sequences. *J. Mol. Evol.* 23:189-199.
- Beauchamp RS, Michell AR, Buckland RA y Bostock CJ. 1979. Specific arrangements of human satellite III DNA sequences in human chromosomes. *Chromosoma* 71:153-166.
- Benfante R, Landsberger N, Tubiello G y Badaracco G. 1989. Sequence-directed curvature of repetitive Alu I DNA in constitutive heterochromatin of *Artemia franciscana*. *N.A.R.* 20:8273-8282.
- Bird AP. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
- Birnboim HC y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bishop JM. 1987. The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.
- Bogenberger JM, Neitzel H y Fitter F. 1987. A highly repetitive DNA component common to all Cervidae: its organization and chromosomal distribution during evolution. *Chromosoma* 95:154-161.
- Britten RJ, Baron WF, Stout DB y Davidson EH. 1988. Sources and evolution of human Alu repeated sequences. 85:4770-4774.

- Burtlag DL. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu. Rev. Genet.* 14:121-144.
- Busch C. 1987. Haematological correlates of burrowing in *Ctenomys*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:461-463.
- Busch C. 1989. Metabolic rate and thermoregulation in two species of tuco-tucos *Ctenomys talarum* and *C. australis* (Caviomorpha, Octodontidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A:
- Busch C, Malizia AI, Scaglia OA y Reig OA. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Mammal.* 70:204-208.
- Calaos MP y Miller JH. 1980. Transposable elements. *Cell* 20:579-595.
- Cameron JR, Loh EY y Davis RD. 1979. Evidence of transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16:739-751.
- Contreras JR. 1966. El tucu-tuco en relación con los problemas del suelo. En: *Progresos de la Biología del Suelo*. UNESCO, Montevideo, p. 469-482.
- Contreras JR y Reig OA. 1965. Datos sobre la distribución del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) en la zona costera de la Provincia de Buenos Aires comprendida entre Necochea y Bahía Blanca. *Physls* 25:169-186.
- Course J y Amorese D. 1987. Ethanol precipitation: Ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus* 9 (2):3.
- Charlesworth B, Langeley CH y Stephan W. 1986. The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences. *Genetics* 112:947-962.
- Cheng JF, Printz R, Callaghan T, Shuey D y Hardison C. 1984. The rabbit C family of SINE: nucleotide sequence determination and transcriptional analysis. *J. Mol. Biol.* 176:1-20.
- Daniels GR y Deininger PL. 1985a. Integration site preferences of the Alu family and similar repetitive DNA sequences. *N.A.R.* 13:8939-8954.
- Daniels GR y Deininger PL. 1985b. Repeated sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature* 317:819-822.
- Datta U, Dutta P y Mandal RK. 1988. Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. *Gene* 62:331-336.
- Deininger PL y Daniels GR. 1986. The recent evolution of mammals repetitive DNA elements. *Trends In Genetics* 2:76-80.
- Dennis ES, Dunsmuir P y Peacock WJ. 1980. Segmental amplification in a satellite DNA: Restriction enzyme analysis of the major satellite of *Macropus rufogriseus*. *Chromosoma* 79:179-198.

- Denoya C, Trevisan AR, Zorzópulos J, Woloj M y Rubeglio E. 1985. Diversity of plasmids profiles in multiple resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from single nosocomial environment with a strong antibiotic selection pressure. **Microbiol. Letter** 29:87-93.
- Di Nocera PP y Sakaki Y. 1990. LINEs: a superfamily of retrotransposable ubiquitous DNA elements. **Trends In Genetics** 6:29-30.
- Dod B, Mottez E, Desmarais E, Bonhomme F y Roizès G. 1989. Concerted evolution of light satellite DNA in genus *Mus* implies amplification and homogenization of large blocks repeats. **Mol. Biol. Evol.** 6:478-491.
- Doolittle WF y Sapienza C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature** 284:601-603.
- Dopazo HJ. 1990. Estudio ecológico y genético-poblacional de *C. porteousi*. Seminario de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires.
- Dover GA. 1982. Molecular drive: a cohesive model of species evolution. **Nature** 299:111-117.
- Duncan C, Biro PA, Choudary PV, Elder JT, Wang R, Forget B, De Riel J y Weisman R. 1979. RNA polymerase III transcriptional unit are interspersed among human non-alfa-globin genes. **P.N.A.S.** 76:5095-5099.
- Ellerman JR. 1990. Rodents other than Muridae. En: **The Families and Genera of Living Rodents**, Vol. 1. British Museum (Natural History), London.
- Elordi M y Busch C. 1990. Myoglobin contents in the heart and masseter muscles of the tuco-tucos and white rats. **Comp. Biochem. Physiol.** (en prensa).
- Epplen J, Cellini TA, Romero S y Ohno S. 1983. An attempt to approach the molecular mechanism of primary sex determination: w- and y-chromosomal conserved simple repetitive DNA sequence and their differential expression in mRNA. **J. Exp. Zool.** 228:303-312.
- Fanning T. 1987. Origin and evolution of a major feline satellite DNA. **J. Mol. Biol.** 197:627-634.
- Feinberg AP y Vogelstein BA. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry** 132:6-13.
- Feinberg AP y Vogelstein BA. 1984. Addendum. **Analytical Biochemistry** 137:266-267.
- Feito R y Gallardo M. 1982. Sperm morphology of the chilean species of *Ctenomys* (Octodontidae). **J. Mammal.** 63:658-661.
- Fields BN y Knipe D. 1990. **Virology**, pp 463-467.
- Flavell R. 1982. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation



- during species divergences. En: Dover GA y Flavell R (eds.). **Genome Evolution**. Academic Press, London-New York, pp. 301-323.
- Frailey D, Campbell KE y Wolff RG. 1980. Additions to the knowledge of **Hippocamelus**, **Ctenomys** and **Myocastor** from the middle Pleistocene of the Tarija basin, Bolivia. **Occ. Pap. Mus. Nat. Hist.**, Univ. Kansas 85:1-14.
- Freitas TRO y Lessa EP. 1984. Cytogenetics and morphology of **Ctenomys torquatus** (Rodentia, Octodontidae). **J. Mamm.** 65:637-642.
- Fry K y Salser W. 1977. Nucleotide sequences of HS- $\alpha$  satellite DNA from kangaroo rat **Dipodomis ordii** and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell** 12:1069-1084.
- Gallardo M. 1979. The chilean species of **Ctenomys** (Rodentia: Octodontidae). I. Karyotypical stability. **Arch. Biol. Med. Exper.** 12:71-82.
- Geuzman Y y Shenk T. 1983. Enhancers and eucaryotic gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Gillespie D, Donehower L y Strayer D. 1982. Evolution of primate DNA organization. En: Dover GA y Flavell RB (eds.). **Genome Evolution**. Academic Press, London-New York, pp. 113-133.
- Grodberg J, Salazar N, Oren R y Mirelman D. 1990. Autonomous replication sequences in an extrachromosomal element of a pathogenic **Entamoeba histolytica**. **Nucleic Acid Res** 18:5515-5519.
- Hanaham D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.** 166:557-580.
- Hanklen T y Schmidt ER. 1987. Cotransposition of a highly repetitive DNA element with flanking sequences in the genome of the midge **Chironomus thummi**. **J. Mol. Evol.** 26:311-319.
- Hardman N. 1986. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochem. J.** 234:1-11.
- Hastie ND y Allshire RC. 1989. Human telomers: fusion and interstitial sites. **Trends In Genetics** 5:326-331.
- Honacki JH, Kinman KE y Koeppel JW (eds.). 1982. **Mammal Species of the World**. Allen Press and Assoc. Syst. Collect., Lawrence, Kansas.
- Hörz W y Zachau HG. 1977. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. **Eur. J. Biochem.** 73:383-392.
- Huberman JA, Zhu J, Davis LR y Newlon C. 1988. Close association of a DNA replication origin and ARSs element on Chromosome III of the yeast **Saccharomyces cerevisiae**. **Nucleic Acid Res** 16:6373-6384.

- 
- Hwu HR, Roberts JW, Davidson EH y Britten RJ. 1986. Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *P.N.A.S.* 83:3875-3879.
- Jagadeeswaran P, Forget BG y Weissman SM. 1981. Short interdispersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III transcripts? *Cell* 26:141-142.
- Jeang KT y Hayward GS. 1983. A cytomegalovirus containing tracts of tandemly repeated CA dinucleotides hybridizes to highly repetitive dispersed elements in mammalian cell genomes. *Mol. Cel. Biol.* 3:1389-1402.
- Jeffreys AJ, Wilson V y Thein SL. 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Jeffreys AJ, Brookfield JF y Semeneonoff R. 1985b. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317:818-819.
- Jelinek WR y Schmid CW. 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annual Rev. Biochemistry.*
- John B. 1986. The biology of heterochromatin. En: Verma RS (ed.). *Heterochromatin*. Cambridge University Press, p. 101.
- John B y Miklos GLG. 1979. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 58:1-114.
- Kidwell MG, Kidwell JF y Sved JA. 1977. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics* 86:813-833.
- Krane DE y Hardison RC. 1990. Short interdispersed repeats in rabbit DNA can provide functional polyadenylation signals. *Mol. Biol. Evol.* 7:1-8.
- Kress M, Barra Y, Seidman JG, Khowry G y Jay G. 1984. Functional insertion of an Alu type 2 (B<sub>2</sub> SINE) repetitive sequence in murine class I genes. *Science* 226:974-977.
- Labuda D y Striker G. 1989. Sequence conservation in Alu evolution. *N.A.R.* 17:2477-2490.
- Landachulz WH, Johnson PF y McKnight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764.
- Levinson G y Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequences evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4:203-221.
- Longmire JL, Lewis AK, Brown NC, Buckingham JM, Clark LM, Jones MD, Meincke LJ, Meyne J, Ratliff RL, Ray FA, Wagner RP y Moyzis RK. 1988. Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics* 2:14-24.
-

- 
- Mandel M e Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:154.
- Maniatis T, Fritsch EF y Stambrook J. 1982. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York.
- Manueledis L. 1982. Repeated DNA sequences and nuclear structure. En: Dover GA y Flavell RB (eds.). **Genome Evolution**. Academic Press, London-New York, pp. 263-285.
- Mares MA y Ojeda RA. 1982. Patterns of diversity and adaptation in South American hystricognath rodents. En: Mares MA y Genoways HH (eds.). **Mammalian Biology in South America**. Special Publication, Pymatuning Laboratory of Ecology, Linsville, PA, University of Pittsburgh, pp. 393-432.
- Marunouchi T y Hosoya H. 1984. Isolation of an autonomously replication sequence (ARS) from satellite DNA of *D. melanogaster*. *Mol. Gen. Genetics* 196:258-265.
- Massarini AI, Barros MA, Ortells MO y Reig OA. 1990. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia, Octodontidae). *Genetica*. 0:00
- McClintock B. 1951. Chromosome organization and genetic expression. **Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.** 16:1347.
- Messing J. 1983. New M13 vectors for cloning. **Methods In Enzymology** 101:20.
- Meyne J, Baker R, Hobart H, Hsu T, Ryder O, Ward O, Wiley J, Wurster-Hill D, Yates T y Moyzis R. 1990. Distribution of a non-tellomeric site of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma** 9:3-10.
- Miklos GLG, Willcocks DA y Baverstock PR. 1980. Restriction endonuclease and molecular analysis of three rat genomes with special reference to chromosome rearrangements and speciation problems. **Chromosoma** 76:339-363.
- Mones A y Castiglioni LR. 1979. Additions to the knowledge of fossil rodents of Uruguay (Mammalia: Rodentia). **Paläontol.** 2, 53:77-87.
- Montiel JF, Norbury CJ, Tuite MF, Dobson MJ, Mills JS, Kingsman AJ y Kingsman SM. 1984. Characterization of human chromosomal DNA sequences which replicate autonomously in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acid Res.** 12:1059-1068.
- Morris J, Kushner SR e Ivarie R. 1986. The simple repeat poly (dt-dG) · poly (dC-dA) common to eukaryotes is absent from eubacteria and archaeobacteria and rare in protozoans. **Mol. Biol. Evol.** 3:343-355.
- Nevo E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. **An. Rev. Ecol. Syst.** 10:269-368.
-

- Norton PA y Coffin JM. 1987. Characterization of Rous Sarcoma Virus sequences essential for viral gene expression. *J. Virology* 61:1171-1179.
- Okino ST, Quattroch LC, Barnes HJ, Osanto S, Griffin J, Johnson EF y Tukey RH. 1985. Cloning and characterization of cDNAs encoding 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin inducible rabbit mRNAs for cytochrome P450 isozymes 4 and 6. *P.N.A.S.* 82:5310-5314.
- Orgel LE y Crick FHC. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607.
- Ortells M. 1990. Biología evolutiva del género **Ctenomys** (Octodontidae, Rodentia). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Ortells M, Contreras J y Reig OA. 1990. New **Ctenomys** karyotypes (Rodentia Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the chromosomal multiformity of the genus. *Genetica* (en prensa).
- Otha T y Dover GA. 1984. The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108:501-521.
- Palzkill TG, Oliver SG y Newlon CS. 1986. DNA sequence analysis of ARS elements from chromosome II of **Saccharomyces cerevisiae**: identification of a new conserved sequence. *Nucleic Acid Res* 14:6247-6264.
- Pardue ML y Gall JG. 1970. Chromosomal location of mouse satellite DNA. *Science* 168:1356-1358.
- Pascual R, Pisano J y Ortega EJ. 1965. Un nuevo Octodontidae (Rodentia, Caviomorpha) de la formación Epecuén (Plioceno Medio) de Hidalgo (Prov. de La Pampa). *Ameghiniana* 4:19-30.
- Pascual R, Cattoi NV, Francis JC, Goudar O, Ortega Hinojosa E, Tonni E, Pisano JA, de Ringuélet AB y Zetti J. 1966. Fascículo I: Vertebrata. En: Borello AV (ed.). *Paleontografía Bonaerense*. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, La Plata.
- Patton J y Sherwood S. 1982. Genome evolution in pocket-gophers (genus **Thomomys**). I. Heterochromatin variation and speciation potential. *Chromosoma* 85:149-162.
- Patton J y Young S. 1977. Genetic variation in **Thomomys bottae** pocket-gophers: Macrogeographic patterns. *Evolution* 31:697-720.
- Peacock WJ, Dennis ES y Gerlach WL. 1982. DNA sequence changes and speciation. En: Barigozzi C (ed.). *Mechanisms of Speciation*. Alan R. Liss, New York, pp. 123-142.
- Pearson OP. 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *J. Zool. London* 202:225-237.
- Pearson OP. 1989. Biology of subterranean rodents **Ctenomys** in Peru. *Mem. Mus. Hist. Nat. "J. Prado"* 9:1-59.
- Pearson OP, Binsztein N, Boiry L, Busch C, Di Pace M, Gallopin G, Penchaszadeh P y Piantanida

- M. 1968. Estructura social, distribución espacial y composición por edades de una población de tuco-tucos (*C. talarum*). *Inv. Zool. Chilenas* 13:47-80.
- Pearson OP y Christie MI. 1985. Los tuco-tuco (gro. *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lanín y Nahuel Huapi, Argentina. *Hist. Nat. (Corrientes)* 5:337-343.
- Prosser J, Frommer M, Paul C y Vincent PC. 1986. Sequence relationship of three human satellite DNAs. *J. Mol. Biol.* 187:145-155.
- Proudfoot NJ y Brownle GG. 1974. Sequence at the 3' end of globin mRNA shows homology with immunoglobulin light chain mRNA. *Nature* 252:259-363.
- Razin A y Riggs AD. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-610.
- Reig OA. 1986. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. En: Vuilleumier F y Monasterio M (eds.). *High Altitude Tropical Biogeography*. Oxford University Press, New York-Oxford, pp. 404-439.
- Reig OA y Kiblicky P. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma* 28:211-244.
- Reig OA, Busch C, Ortells MO y Contreras J. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology and speciation in *Ctenomys*. En: Nevo E y Reig OA (eds.). *Evolutionary Biology of Subterranean Mammals*. Alan R. Liss, New York, pp. 71-96.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C y Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:236-251.
- Rimpau J, Smith DB y Flavell RB. 1980. Sequence organization in barley and oat chromosomes revealed by interspecies DNA/DNA hybridization. *Heredity* 44:131-149.
- Rogers J. 1983. CACA sequences—the ends and the means? *Nature* 305:101-102.
- Rogers J. 1985. The origin and evolution of retrotransposons. *Int. Rev. Cytol.* 93:187-279.
- Rose MR y Doolittle WF. 1983. Molecular biological mechanisms of speciation. *Science* 220:157-161.
- Rossi MS, Reig OA y Zorzópulos J. 1990. Evidence of rolling-circle replication in a major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol. Biol. Evol.* 7:340-350.
- Rossi MS, Reig OA y Zorzópulos J. Enviado. A major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*: Qualitative and quantitative differences in species with different geographical distribution. *Genetica* (Holanda).
- Rovereto C. 1914. Los estratos araucanos y sus fósiles. *Ann. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires* 25:1-247.

- 
- Rubin CM, Houck CM, Deininger PL, Friedman T y Schmid CW. 1980. Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interdispersed repeated human DNA sequences. **Nature** 284:372-374.
- Ruedas LA, Cook JA, Yates TL y Bickham JW. 1990. Conservative genome size evolution in chromosomally variable family of rodents (Rodentia: Ctenomyidae). **Evolution** 0:00.
- Ryan SC y Dugaiczky A. 1989. Newly arisen DNA repeats in primate phylogeny. **P.N.A.S.** 86:9360-9364.
- Ryden TA y Beemon K. 1989. Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT-enhancer-binding protein. **Mol. Cell Biol** 9:1155-1164.
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **P.N.A.S.** 74:5463-5467.
- Schimke RT. 1984. Gene amplification in cultured animal cells. **Cell** 37:705-713.
- Schmid C y Jelinek WR. 1982. The Alu family of dispersed repetitive sequences. **Science** 216:1065-1070.
- Sharma S, Metha S, Morgan J y Maizel A. 1987. Molecular cloning and expression of a human B cell growth factor gene in *E. coli*. **Science** 235:1489-1492.
- Sharp PA. 1983. Conversion of RNA to DNA in mammals: Alu-like elements and pseudogenes. **Nature** 301:471-472.
- Singer MF. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **Int. Rev. Cytol.** 76:67-112.
- Skowronski J y Singer MF. 1985. Expression of a cytoplasmic LINE-I transcript is regulated in a human teratocarcinoma cell line. **P.N.A.S.** 82:6050-6054.
- Smith GP. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science** 191:528-535.
- Smith GR, Kunes SM, Schultz DW, Taylor A y Triman KL. 1981. Structure of Chi hot spots of generalized recombination. **Cell** 24:429-436.
- Southern EM. 1975a. Long range periodicity in mouse satellite DNA. **J. Mol. Biol.** 94:51-69.
- Southern EM. 1975b. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98:503-517.
- Steinmetz M, Stephan D y Lindhal FK. 1986. Gene organization and recombination hot spot in the murine major histocompatibility complex. **Cell** 44:895-904.
- Thompson WF y Murray MG. 1980. Sequence organization in pea and mung bean DNA and a model for genome evolution. En: Davies JR y Hopwood DA (eds.). **Fourth John Innes Symposium**, pp. 31-45.
-

- Ullu E. y Tschudi C. 1984. Alu sequences are processed 7SL RNA genes. **Nature** 312:171-172.
- Van Arsdell SW, Denison RA, Bernstein LB y Weiner AM. 1981. Direct repeats flank three small nuclear RNA pseudogenes in the human genome **Cell** 26:11-17.
- Varmus E. 1982. Form and function of retroviral proviruses. **Science** 216:812-820.
- Villarroel C. 1957. Dos nuevos ctenomyiinae (Caviomorpha, Rodentia) en los estratos de la formación Umala (Plioceno Superior) de Vizcachani (Prov. Aroma, Dpto. La Paz, Bolivia). **Actas Primer Congreso Argentino de Paleontografía y Bloestraflografía**, Tucumán, 12-16 Agosto 1974, 2:495-503. Asociación Paleontológica Argentina.
- Vitulo AD, Roldán ERS y Merani MS. 1988. On the morphology of spermatozoa of tuco-tucos, **Ctenomys** (Rodentia: Ctenomyidae): New data and its implications for the evolution of the genus. **J. Zool. London** 215:675-683.
- Walker PMB. 1971. Origin of the satellite DNA. **Nature** 229:306-308.
- Walsh JB. 1987. Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNA. **Genetics** 115:553-567.
- Wetton JH, Carter RE, Parkin DT y Walters D. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprints. **Nature** 327:147-149.
- Widegren B, Árnason Ú y Aküsjarvi G. 1985. Characteristics of a conserved 1579-bp highly repetitive component in the killer whale **Orclnus orca**. **Mol. Biol. Evol.** 2:411-419.
- Woods CA. 1984. Hystricognath rodents. En: Anderson S y Knox Jones J Jr (eds.). **Orders and Families of Recent Mammals of the World**. John Wiley and Sons, New York, pp. 389-446.
- Yamamoto M y Miklos GLG. 1977. Genetic dissection of heterochromatin in **Drosophila**: the role of basal X heterochromatin in meiotic sex chromosome behavior. **Chromosoma** 60:283-296.
- Yannopoulos G, Stamantis N, Monastirioti M, Hatzopoulos P y Louis CH. 1987. Hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of **D. melanogaster** bearing the male recombination factor 23.5MRC. **Cell** 49:487-495.
- Yunis JJ y Yasemineh WG. 1971. Heterochromatin, satellite DNA and cell function. **Science** 174:1200-1209.