

Tesis de Posgrado

Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite : su relación con la evolución de los roedores tuco-tucos (*Ctenomys*, Octodontidae)

Slamovits, Claudio H.

2002

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Slamovits, Claudio H.. (2002). Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite : su relación con la evolución de los roedores tuco-tucos (*Ctenomys*, Octodontidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3475_Slamovits.pdf

Cita tipo Chicago:

Slamovits, Claudio H.. "Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite : su relación con la evolución de los roedores tuco-tucos (*Ctenomys*, Octodontidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3475_Slamovits.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite: su
relación con la evolución de los roedores tuco-tucos
(*Ctenomys*, Octodontidae)**

Autor: Lic. Claudio H. Slamovits

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Director: Dra. María Susana Rossi

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular

2002

5 4 7 5

RESUMEN

Los tuco-tucos, roedores subterráneos del género *Ctenomys*, constituyen un excelente modelo para el estudio de los mecanismos implicados en la evolución cromosómica y la especiación. Estos roedores poseen en sus genomas el satélite SRPC, el cual mostró ser particularmente dinámico. Para explorar la relación entre la dinámica de cambio del SRPC y la variabilidad cromosómica, se abordó un enfoque que combina estudios filogenéticos y moleculares. Se llevó a cabo el análisis filogenético de unas 25 especies utilizando la secuencia del gen mitocondrial citocromo b, se determinó el número de copias y los patrones de restricción del satélite SRPC. Se empleó una aproximación filogenética para inferir la historia evolutiva de SRPC a lo largo de la filogenia de los tuco-tucos, y se encontró que su historia fue compleja. El satélite SRPC siguió un patrón conservativo en algunos grupos y altamente dinámico en otros. Por otro lado, se estudiaron aspectos relacionados con la estructura del satélite y la evolución de su secuencia nucleotídica. Se discuten las relaciones filogenéticas en el género y el rol del SRPC en la evolución cromosómica.

Parte de los resultados que se presentan en esta tesis han dado origen a las siguientes dos publicaciones:

-Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution*. 2001.18(9):1708-1719.

Slamovits, C.H., Cook, J.A., Lessa, E.P. y Rossi, M.S.

-Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review *Journal of Neotropical Mastozoology-Mastozoología Neotropical*. En prensa.

Slamovits, C. H. y Rossi, M. S.

ABSTRACT

Subterranean rodents tuco-tucos of the genus *Ctenomys* constitute an excellent model to study the mechanisms involved in chromosome evolution and speciation. These rodents possess in their genomes the satellite RPCS, which showed to be highly dynamic. To explore the relationship between the dynamics of change of RPCS and chromosomal variability, an approach was used that combines phylogenetics and molecular studies. A phylogenetic analysis was carried out with 25 species, using the sequence of the mitochondrial gene cytochrome b, and the copy number and restriction pattern of RPCS were determined. A phylogenetic approximation was employed to infer the evolutionary history of RPCS along the tuco-tuco phylogeny, and a complex history was found. The SRPC satellite followed a conservative pattern in some groups, and a highly dynamic one in others. On the other hand, aspects related to the satellite structure and the evolution of its nucleotide sequence were studied. The phylogenetic relationships of the genus are discussed, as well as the role of the SRPC in the chromosomal evolution.

Part of the results presented in this thesis was published in:

-Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution*. 2001,18(9):1708-1719.

Slamovits, C.H., Cook, J.A., Lessa, E.P. and Rossi, M.S.

-Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review *Journal of Neotropical Mastozoology-Mastozoología Neotropical*. In press. Slamovits, C. H. and Rossi, M. S.

AGRADECIMIENTOS

La defensa de la tesis doctoral es un momento para el que uno se prepara durante años, esperando con ansia percibir el orgullo y el cariño de nuestros seres queridos, pero a veces suceden cosas frente a las cuales todo aquello que anhelamos, por lo que nos esforzamos, parece carecer de sentido. Sin embargo, a pesar de toda la tristeza que siento por haber perdido a mi padre hace sólo tres semanas, quiero compartir con la gente que quiero los sentimientos que me produce el haber llegado hasta aquí.

Gracias a Tito, mi papá, porque luchó durante toda su vida por su familia, y porque con su esfuerzo yo pude hacer lo que elegí. A mi mamá, porque la quiero mucho.

Gracias, Susana por TODO lo que compartimos durante estos últimos 11 años. Sobre todo, gracias por nuestras hijas. Ah, y por lo de la escritura de la tesis.

Gracias a mis hijas, que me acompañan todos los días a la Facultad desde que nacieron. Además, son lo mejor que me pudo haber pasado.

Gracias a Susana Rossi, por toda la dedicación y apoyo que me brindó a pesar de todas las dificultades que supone pretender trabajar en la ciencia.

A Alberto Kornblihtt, por su apoyo, sin el cual no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A todos los integrantes, pasados y presentes, del LFBM, por hacer de este laboratorio un lugar muy agradable para trabajar. Especialmente quiero agradecer a los ARKs, por su infinita ayuda, a Federico, porque en aquella época se podía escuchar música como la gente, a Hoch, por el mate y por dejarme usar la mac de Omar, a Tami, por lo mismo (la mac), y por supuesto, también a Omar. A Sebas, por compartir la docencia durante estos años y por entender algo de evolución, a pesar de ser molecular. También a Lorena, por innumerables charlas y por compartir la coordinación de IBMC, y también a Carolina. A Lidia y su grupo, por el hardware y la buena onda.

Gracias a María, Marisa y Sergio por décadas de amistad.

A Susana, Caterina y Victoria

A mis padres

*La ciencia puede descubrir lo que es cierto,
pero no lo que es bueno,
justo y humano.*

Marcus Jacobson

CONTENIDO

1. <u>Introducción</u>	
1.0. Prólogo	1
1.1. El género <i>Ctenomys</i>	3
1.1.1. Origen, historia y taxonomía	3
1.1.2. Diversidad	4
1.1.3. Adaptaciones al ambiente subterráneo	7
1.1.4. Estructura poblacional	10
1.1.5. Variabilidad cromosómica	12
1.1.6. Estudios de biología celular y molecular en <i>Ctenomys</i>	14
1.2. Evolución cromosómica y especiación	15
1.3. Filogenia de <i>Ctenomys</i>	17
1.4. Inferencia Filogenética	21
1.4.1. La filogenia molecular	24
1.4.2. El reloj molecular	25
1.4.3. Modelos de evolución molecular	30
1.4.4. Árboles de genes y árboles de especies	35
1.4.5. Elección del marcador	36
1.4.6. Métodos de inferencia filogenética molecular	38
1.4.7. Neighbor-Joining o método del vecino más próximo	39
1.4.8. Máxima parsimonia	41
1.4.9. Máxima verosimilitud	44
1.4.10. Calidad de los datos y confianza	47
1.4.11. Tiempo de divergencia	49
1.4.12. Inferencia de estados ancestrales	51
1.5. ADN repetido	53
1.5.1. ADN repetido disperso	56
1.5.2. ADN repetido en tándem	60
1.6. ADN satélite	61
1.6.1. Origen y amplificación del ADN satélite	62
1.6.2. ADN satélite y evolución cromosómica	65
1.6.3. Evolución de la secuencia nucleotídica de los ADN satélites	67
1.6.4. ADN satélite de los tuco-tucos	72
2. <u>Materiales y métodos</u>	
2.1. Especímenes examinados	76
2.2. Extracción y purificación de ADN genómico	77
2.2.1. Digestión con <i>Proteinasa K</i>	78
2.2.2. Purificación con Fenol – Cloroformo – Isoamílico	78
2.2.3. Precipitación del ADN genómico	78

2.2.4 Cuantificación del ADN	79
2.3. Digestión con enzimas de restricción	79
2.4. Electroforesis en geles de agarosa	79
2.4.1. Analítica	79
2.4.2. Preparativa	79
2.5. Transferencia y fijación del ADN a membranas	79
2.5.1 Southern	79
2.5.2. Dot blot	80
2.6. Marcación de sondas	80
2.7. Hibridación del ADN	80
2.8. Ligaciones	81
2.9. Transformación de bacterias competentes	81
2.10. Preparación de plásmidos en pequeña escala	81
2.11. Oligonucleótidos	82
2.12. PCR (polymerase chain reaction)	82
2.13. Secuenciación de ADN	82
2.13.1. Método de Sanger	83
2.13.2. Secuenciación por PCR	83
2.13.3. Lectura de las secuenciaciones:	84
2.14. Análisis de secuencias y filogenéticos	84
2.15. Estimación del número de copias ancestral de SRPC	85
2.16. Tiempos de divergencia	85
3. Resultados	
3.1. Filogenia molecular de <i>Ctenomys</i>	86
3.1.1. Variabilidad a nivel nucleotídico del gen citocromo b	86
3.1.2. Análisis filogenéticos	87
3.1.2.1. Máxima parsimonia	87
3.1.2.1.1. Árbol de MP con pesado a posteriori	89
3.1.2.1.2. Árbol de MP con pesado a priori	91
3.1.2.1.3. Análisis de bootstrap en MP	93
3.1.2.2. Máxima verosimilitud	93
3.1.2.3. Método de distancia	100
3.2. Tiempos de divergencia en ctenominos	102
3.3. Evolución del número de copias de SRPC	108
3.3.1. Número de copias de SRPC	108
3.3.2. Estimación del número de copias de SRPC en nodos ancestrales de la filogenia	110
3.4. Patrones de restricción del satélite SRPC en especies de <i>Ctenomys</i>	113
3.5. El satélite homólogo a SRPC presente en los octodontinos	115

3.5.1. Secuencia nucleotídica de SRPO7	121
3.6. Variabilidad nucleotídica de la SRPC en las especies de Ctenomys	121
3.6.1. Amplificación por PCR de las secuencias homólogas a SRPC en otras especies de Ctenomys	121
3.6.2. Similitud intra e interespecífica de la SRPC a nivel de secuencia	125
3.6.3. Clonado de monómeros en tres especies de Ctenomys	133
3.6.4. Variabilidad de los clones	135
3.6.5. Comparación de las secuencias de PCR y los clones	139
4. <u>Discusión</u>	
4.1. Patrones y tiempos de la cladogénesis en Ctenomys	147
4.2. SRPC y evolución cromosómica en los tuco-tucos	154
4.3. Evolución de la secuencia de SRPC	158
4.4. Dinámica de la evolución de SRPC	163
4.5. SRPC como agente de evolución en los tuco-tucos	166
5. <u>Bibliografía</u>	167
6. <u>Apéndice</u>	
6.1. Secuencias nucleotídicas del gen citocromo b	202
6.2. Matriz de distancias entre las secuencias del citocromo b	207
6.3. Matriz de distancias entre las secuencias de SRPC	213

1. INTRODUCCION

1.0. Prólogo

Desde tiempos remotos, el hombre se ha visto fascinado por la enorme diversidad de formas vivientes. A medida que el progreso cultural y tecnológico fue haciéndolo posible, los límites del mundo conocido se fueron expandiendo. En cada paso se descubrieron nuevas formas de vida, mostrando que no existe prácticamente ningún rincón del planeta carente de ella. Esta fascinación llevó al hombre a preguntarse acerca del origen de los organismos. Sin embargo, las ideas sobre el origen de la diversidad biológica han sido extremadamente cambiantes, reflejo de la compleja evolución de la cultura humana. La idea del hombre sobre el origen de los seres vivos ha sido moldeada no solamente por el grado de conocimiento de la naturaleza que lo rodea, sino también por innumerables factores inherentes a la sociedad humana, como las cosmovisiones religiosas y filosóficas (principalmente), la política, etcétera.

Entre los siglos XVIII y XIX comenzó a tomar forma el concepto de evolución biológica, cuyo hito fundacional fue la célebre publicación "El origen de las especies" de Charles Darwin en 1859. Este nuevo campo de la biología se fue nutriendo con los avances provenientes de otras disciplinas como la genética, la sistemática, la paleontología, la embriología, convirtiéndose en un campo sólido y unificador, capaz de dar respuesta a muchos de los innumerables cómo y porqué de la biología. Hacia mediados de los años sesenta se abre la posibilidad de estudiar la composición genética de los organismos en su nivel más elemental: la secuencia de las proteínas y del ADN. A partir de entonces, las investigaciones sobre los mecanismos y procesos que operan en las poblaciones naturales se incrementaron enormemente.

Así, el desarrollo de estas nuevas herramientas brindó a los estudiosos de la biología evolutiva la posibilidad de abordar en forma racional y objetiva la comprensión de los mecanismos y procesos que subyacen a la generación de nuevas especies, constituyendo el estudio de la especiación uno de los puntos de partida para explicar la génesis de la biodiversidad. A pesar de las décadas de debate y los innumerables modelos de especiación propuestos hasta el

momento (Schluter 2001; Turelli et al. 2001), no ha sido aún posible dar explicaciones satisfactorias a todos los casos estudiados. Esto se debe principalmente a dos factores: la controversia que ha existido siempre en torno al concepto mismo de especie, (Hey 2001) y a que la especiación no es el resultado de un único mecanismo sino que es el producto de múltiples procesos que involucran en muchos casos a distintos niveles de organización (molecular, poblacional, ecológico, geológico, etcétera)

Gran parte del conocimiento de la biología moderna proviene de investigaciones realizadas sobre determinados organismos, seleccionados muchas veces por razones de índole práctica y otras veces por la posibilidad de extrapolar los conocimientos obtenidos a la biología humana. Así, la mosca *Drosophila*, el ratón, la rata, el batracio *Xenopus*, la planta *Arabidopsis*, la bacteria *E. coli* y muchos otros organismos constituyen modelos para estudiar y comprender tanto los procesos comunes a todas las formas de vida, como los propios de determinados grupos de organismos como el desarrollo, la fisiología, el comportamiento, etcétera. Algunos de estos modelos, como *Drosophila*, han sido extremadamente útiles para la biología evolutiva dada la facilidad para estudiar su genética y simular procesos poblacionales a escala de laboratorio. Existen sin embargo, organismos que no fueron utilizados como modelos de laboratorio pero que exhiben en la naturaleza características que los hacen sumamente interesantes para estudiar los procesos evolutivos.

El estudio de los procesos de especiación se ha servido de numerosos modelos biológicos cuyas características los hacen aptos para abordar el tema. Algunos modelos son los suficientemente versátiles para estudiar distintos modos de especiación, como son los casos de los grupos de especies de *Drosophila*. Otros modelos son adecuados para estudiar casos particulares: por ejemplo, los pinzones de las Galápagos constituyen un modelo para estudiar factores ecológicos y de selección sexual en la especiación, en la planta *Clarkia* y en los roedores norteamericanos *Thomomys*, en cambio, la influencia de los rearrreglos cromosómicos en la especiación es particularmente evidente (White 1978; Patton y Sherwood 1982).

Los roedores del género *Ctenomys* presentan una gran riqueza de especies, inusual para el grupo taxonómico al que pertenece. Este hecho,

observado hace ya más de treinta años, lo convierte en un atractivo modelo para estudiar mecanismos de especiación (Reig et al. 1990). Desde la década de 1960, el Dr. Osvaldo Reig ha realizado y promovido numerosos trabajos tendientes a conocer a fondo la biología de estos roedores desde diversos puntos de vista (paleontología, sistemática, morfología, genética, citogenética y biología molecular), y los resultados obtenidos confirman la riqueza del género *Ctenomys* como modelo de investigación de los mecanismos especiogénicos.

1.1. El género *Ctenomys*

1.1.1. Origen, historia y taxonomía

Los roedores caviomorfos, uno de cuyos representantes es el género *Ctenomys*, pertenecen al suborden Hystricognathi (Carleton 1984) y constituyen una parte importante de la fauna actual de roedores en Sudamérica. La sistemática del género puede resumirse de la siguiente manera:

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia Bowdich, 1821

Suborden Hystricognathi Tullberg, 1899

Infraorden Caviomorpha Wood and Patterson (Wood, 1955)

Familia Octodontidae Waterhouse, 1839

Subfamilia Ctenomyinae Tate, 1935

Género: *Ctenomys*

† *Palaeoctodon*

† *Xenodontomys*

† *Actenomys*

† *Eucelophorus*

† *Praectenomys*

Los primeros representantes de esta fauna de Sudamérica aparecen en el Oligoceno temprano (alrededor de 35 M.A.), aunque se piensa que su origen es aún anterior, ya que para ese entonces estaban diferenciados en cierto

grado (Reig 1989). El mismo autor especuló que la implantación de los caviomorfos ancestrales en Sudamérica podría haber ocurrido hacia el Eoceno medio o superior (alrededor de 40 M.A.) a partir de la inmigración de un grupo que llegó probablemente de África (Hoffstetter 1975; Reig 1989). Por el contrario, Alderton (1996) propuso que los inmigrantes originales provienen de Norteamérica.

Dentro de la familia Octodontidae se reconocen dos subfamilias: Octodontinae, cuyos géneros vivientes son *Octodon*, *Octodontomys*, *Octomys*, *Tympanoctomys*, *Spalacopus* y *Pithanotomys* (= *Aconaemys*), y Ctenomyinae, que incluye al género *Ctenomys* como único representante viviente. La historia de los ctenominos se caracteriza por dos etapas claramente diferenciadas. La primera comenzó con la dicotomía entre octodontinos y ctenominos, ocurrida probablemente durante el Mioceno medio-superior, alrededor de 10 M.A. (Quintana 1994; Verzi 1999). Esta primera etapa se caracterizó por una baja riqueza en especies, aunque con mayor diversidad adaptativa, hecho reflejado por la existencia de cuatro géneros (*Xenodontomys*, *Actenomys*, *Eucelophorus* y *Praectenomys*) que presentaban distintas estrategias de adaptación al medio subterráneo (Verzi 1994). Dichos géneros desaparecieron hacia el comienzo del Pleistoceno (Vucetich and Verzi 1995), en una etapa muy diferente de la historia de la subfamilia, caracterizada por la intensa cladogénesis experimentada por un único género: *Ctenomys* (Reig et al. 1990; Verzi 1994), único representante actual de los ctenominos. Reig (1989) propuso una antigüedad de 1,8 M.A. para el género *Ctenomys*. Sin embargo, nuevos hallazgos paleontológicos indican que hace 2,4 M.A. ya existían representantes del género en la región central de Argentina (Verzi 1994; Cione and Tonni 1995).

1.1.2. Diversidad

Los roedores del género *Ctenomys* son conocidos vulgarmente como tuco-tucos (figura 1), debido al sonido que producen para comunicarse, aunque dependiendo de la región, suelen utilizarse otras denominaciones, como "tunduques", "anguyá tutús", "ocultos", etcétera. Habitan prácticamente toda la mitad septentrional de América del Sur (figura 2), incluyendo Argentina, Chile,

Uruguay, Bolivia, Paraguay, sur de Perú y de Brasil (Reig et al. 1990). El gran número de especies, sumado a su amplia distribución y a cierta homogeneidad de características morfológicas y ecológicas hacen de la sistemática de este género una tarea complicada. Sucesivas revisiones han ido modificando el número de especies reconocidas. La primera lista fue de 49 especies (Rusconi 1928), luego se reportaron 53 (Tate 1935) y 51 (Ellerman 1940). Más tarde, Honacki y col. (1982) listaron 32 y Woods (1984) reconoció 33 especies. Reig y col. (1990) reconocen la existencia de 56 especies, aunque desde entonces han sido nombradas varias especies más (Giménez et al. 1997; Giménez et al. 1999). Además del continuo aporte de nuevos datos provenientes del trabajo de laboratorio y de campo, es frecuente que los cambios en la sistemática del género se deban a las diferentes maneras en que los taxónomos interpretan la aplicación de los conceptos de especie. Así, se observan en los extremos tendencias a reunir muchas entidades en unas pocas especies nominales (*lumpers*) o bien a separar y nombrar como especies a poblaciones o pequeños grupos de poblaciones que comparten algún rasgo en particular (*splitters*). Las particulares estructuras poblacionales que presentan algunas especies de tuco-tucos (marcada diferenciación entre poblaciones, aislamiento) sumadas a otras características como los polimorfismos cromosómicos que se encuentran en poblaciones de muchas especies (Massarini et al. 1991; Giménez et al. 1997; Massarini et al. 1998) pueden tentar a los investigadores a caer en uno de los extremos mencionados. El panorama se complica al observar que distintos linajes parecen sufrir diferentes patrones evolutivos: algunos grupos de especies parecen sufrir procesos típicamente vinculados con la especiación cromosómica, con profunda y rápida diferenciación cariotípica, como se ha sugerido para el complejo arreglo de especies y poblaciones del Litoral Argentino (Ortells et al. 1990), mientras que otros, como el "grupo mendocinus" (Massarini et al. 1998) parecen responder más a modelos de diferenciación alopatrica (Bidau et al. 2000). Este panorama complejo obliga a considerar cada caso en particular al momento de evaluar criterios para realizar consideraciones taxonómicas. Además, los mecanismos de especiación son difícilmente comprensibles fuera de un marco filogenético amplio de las especies del género, por lo que reforzar tal marco es uno de los objetivos de

esta tesis. Queda claro, sin embargo, que el género *Ctenomys* es, sin lugar a dudas, altamente especioso en términos absolutos y en términos relativos a sus grupos hermanos y a su antigüedad (Reig 1989).



Figura 1: *Ctenomys australis* (arriba), *C. argentinus* (izquierda) y *C. talarum* (derecha).

1.1.3. Adaptaciones al ambiente subterráneo

Los tuco-tucos son roedores de hábito subterráneo, que salen a la superficie exclusivamente para recoger alimento o para incursiones de índole reproductiva (Busch et al. 2000). Excavan madrigueras que discurren a unos 30 centímetros de la superficie y pueden llegar a extenderse hasta 90 metros en longitud. Las madrigueras consisten en una galería central, con ramificaciones que conducen a salidas o a cámaras utilizadas como habitación o para guardar pequeñas cantidades de alimento (Antinuchi y Busch 1992). Pueden utilizar desde suelos arenosos con vegetación herbácea y arbustiva, como en las áreas costeras de la Provincia de Buenos Aires, hasta pedregales, faldeos y laderas montañosas y desiertos.

Las cuevas de los tuco-tucos mantienen un microclima adecuado, con independencia de las condiciones del exterior, de manera muy eficiente. El animal residente puede regular el microclima de la madriguera abriendo o cerrando las entradas de acuerdo a la dirección e intensidad del viento. Esta capacidad es particularmente importante para las especies de *Ctenomys* que viven en regiones áridas como la Puna, donde las extremas condiciones de humedad y temperatura serían, de otro modo, letales. *C. fulvus* por ejemplo, es una especie que habita el Salar de Atacama en Chile, una de las regiones más áridas del mundo. Allí la variación diaria de temperatura es de casi 38 grados, sin embargo, la variación dentro de la cueva es de sólo 5,8 grados. La humedad relativa en el exterior varía de aproximadamente 1,6% durante el día a 27% durante la noche, mientras que dentro de la madriguera permanece entre 53 y 65%, independientemente de la hora o estación (Cortes et al. 2000).

Su alimentación es exclusivamente vegetariana, con una dieta de amplio espectro, dependiendo principalmente de la vegetación presente en la zona. Utilizan tanto raíces y tallos de vegetación silvestre, como arbustos y pastos, y también pueden alimentarse de cultivos en zonas agrícolas. En ese caso pueden atacar sembrados de papa, batata, sorgo, zanahoria, mandioca, frutilla, etcétera (Borrueal et al. 1998). Entre los predadores de los tuco-tucos se encuentran otros mamíferos, como zorros, comadrejas, hurones, aves rapaces como las lechuzas y víboras.

Su anatomía y fisiología presentan importantes adaptaciones al medio subterráneo, aunque carecen de especializaciones extremas como reducción de ojos y cola, como ocurre en otros roedores subterráneos. Presentan glóbulos rojos grandes, alta concentración de mioglobina muscular y un eficiente sistema buffer en la sangre (Busch 1987), que les permite estar adaptados a vivir con bajas concentraciones de oxígeno y altas concentraciones de dióxido de carbono en el aire.

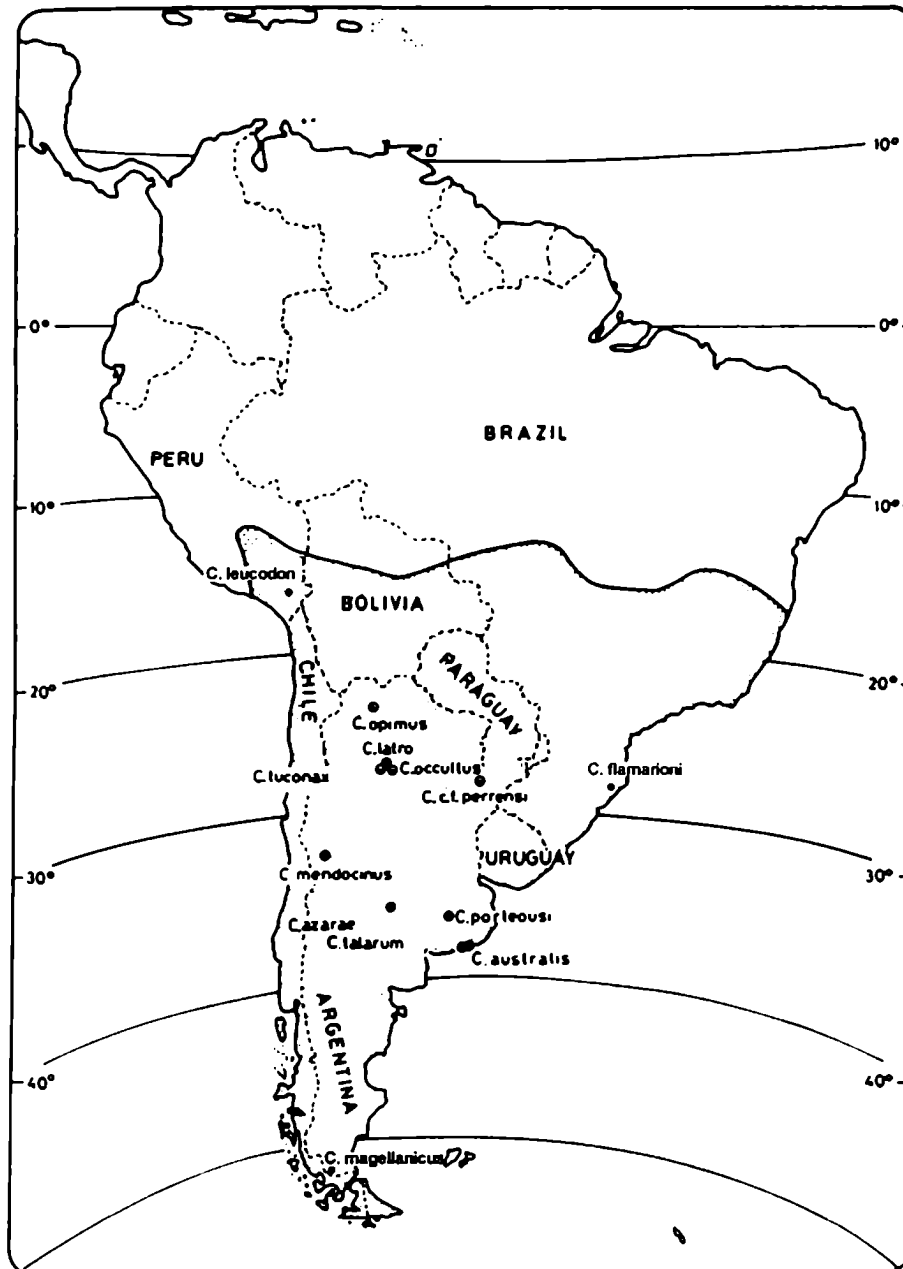


Figura 2: Distribución geográfica del género *Ctenomys*. El área sombreada señala la distribución del género. Se indica la ubicación de poblaciones de algunas especies.

Tienen un cuerpo robusto, con cabeza grande, y cuello y miembros cortos y musculosos. Los dedos presentan fuertes garras que utiliza para excavar y pelos que forman "cepillos" que utilizan para extraer tierra de su piel (Nowak 1991). Esta característica explica la etimología de su nombre (*ctenos* = pelos). El aspecto externo es muy similar entre las especies, variando principalmente el color, que va desde muy oscuro, pasando por pardos de distinta intensidad hasta amarillo-blancuino. El peso promedio es otro

carácter variable entre especies, variando entre 100 gramos en *C. pundti* hasta más de un kilogramo en *C. conoveri*.

1.1.4. Estructura poblacional

Las características asociadas al estilo de vida subterráneo condicionan la distribución de estos roedores en muchos demos o colonias relativamente pequeñas y semiaisladas, lo cual conduce a una fuerte estructuración geográfica de las poblaciones. (Reig et al. 1990; Steinberg and Patton 2000). Muchas especies de *Ctenomys* no escapan a esta tendencia, y muestran estructuras poblacionales muy fragmentadas, con poblaciones discontinuas distribuidas en parches, con escaso intercambio entre ellas. Esta distribución es resultado por un lado de una limitada vagilidad, lo cual hace que en zonas de baja densidad de población la distancia represente una barrera al intercambio entre colonias, y por el otro de factores propios del hábitat, como la presencia de barreras más o menos efectivas a la dispersión, como áreas inundables, distintos tipos de suelos, etcétera (Reig et al. 1990; Busch et al. 2000). Por ejemplo, la distribución local de *C. talarum* está influenciada por el suelo y la vegetación, ya que en regiones donde suelos y vegetación apropiados están distribuidos en parches, los individuos también tienden a estar espacialmente agrupados (Busch et al. 1989). Sin embargo, en áreas donde los ambientes propicios son extensos e ininterrumpidos, las poblaciones pueden llegar a ser grandes y continuas, como es el caso de poblaciones de *C. australis* en extensiones homogéneas de dunas costeras de la Provincia de Buenos Aires (Zenuto and Busch 1998).

La mayoría de las especies de tuco-tucos son típicamente solitarias y fuertemente territoriales. Las cuevas están habitadas por un solo individuo, o bien por una hembra y sus crías. Sin embargo, *C. sociabilis* constituye una excepción al modo solitario. Esta especie muestra características sociales, pudiendo encontrarse hasta siete individuos adultos por cueva (Lacey et al. 1997).

Las características poblacionales de una especie están estrechamente vinculadas con su variabilidad genética, y por lo tanto deben ser tenidas en cuenta al estudiar problemas evolutivos en un grupo de organismos. Hasta el

momento existen pocos estudios genéticos realizados en especies de tuco-tucos. Sage y col. (1986) llevaron a cabo el primer estudio de variabilidad alozímica en tuco-tucos. Su objetivo fue caracterizar la variabilidad de algunas poblaciones y también poner a prueba la hipótesis de amplitud del nicho (Nevo 1979), según la cual, la heterogeneidad ambiental determina la variabilidad genética. La presunta homogeneidad del ambiente subterráneo favorecería la homocigosis en genes estructurales que codifican proteínas analizadas en los estudios alozímicos. Al comparar sus resultados con los obtenidos en el caso del roedor norteamericano de superficie *Peromyscus*, Sage et al. (1986) observaron los mismos niveles de variabilidad alozímica en ambos grupos, contradiciendo la hipótesis de Nevo. Una explicación alternativa sería que en este caso el ambiente subterráneo no sería tan homogéneo. Los autores también encontraron que la diferenciación interespecífica de las especies de *Ctenomys* que estudiaron es sensiblemente menor a la habitual para especies cogenéricas de otros roedores. En el citado trabajo (donde se analizan principalmente poblaciones de *C. mendocinus*, *C. haigi*, *C. bonettoi*, *C. dorbignyi* y *C. argentinus*) y en el de Gallardo y Köhler (1992), donde se analizan poblaciones chilenas de *C. maulinus*, se sugiere que la diferenciación genética no se relaciona con la especiación, ya que se encontraron bajos niveles de diferenciación genética interespecífica, sugiriendo que otras causas (además de la diferenciación genética) estarían participando del establecimiento de las barreras reproductivas. Apfelbaum y col. (1991) estudiaron la variabilidad alozímica en poblaciones de *C. australis* y *C. porteousi*, encontrando también altos niveles de variación, contrapuestos a los esperados según la hipótesis de la amplitud del nicho. Aquí los autores sugieren que la estructura poblacional es probablemente más determinante que la homogeneidad ambiental en la variabilidad genética. Cook y Yates (1994) encontraron un panorama diferente en las especies bolivianas que estudiaron. En promedio, la diferenciación intraespecífica en las especies de Bolivia fue más baja que las encontradas por Sage y col. (1986) en *C. mendocinus*, *C. haigi* y *C. bonettoi*. Por otro lado, la diferenciación interespecífica fue mayor en las especies bolivianas que en las estudiadas por Sage y col. (1986). Otros estudios poblacionales son los de Gallardo y col. (1995 y 1996), quienes

estudiaron los efectos de catástrofes naturales sobre la variabilidad genética en poblaciones de *C. maulinus* que fueron afectadas por la erupción del volcán Lonquimay, y de *C. coyhaiquensis*, por el volcán Hudson en el sur de Chile. En ambos casos se observó una importante reducción en la heterocigosidad, atribuible al cuello de botella causado por la erupción.

D'Elía y col. (1998) estudiaron la estructura genético-poblacional en 7 poblaciones de *C. rionegrensis* en Uruguay, con el objeto de determinar si la fijación de un tipo de coloración del pelaje en un área donde aparentemente resulta desfavorable ocurrió por deriva (el color del pelaje contrasta con el de los suelos, lo cual hacía a los individuos más visibles). Al no encontrar evidencia de cuellos de botella, además de detectar la ocurrencia de flujo génico entre las poblaciones con diferentes colores, concluyen que la fijación no ocurrió por deriva, sino que es parte de un reciente proceso de expansión del rango habitado por la especie en el área. Más recientemente se han realizado estudios con microsatélites para analizar patrones de paternidad en *C. talarum* (Zenuto et al. 1999), encontrando que en cada población ensayada cada macho produjo más de una camada, sugiriendo que *C. talarum* es poligínico. El mismo tipo de marcador se utilizó para comparar poblaciones de *C. haigi* y *C. sociabilis*. Las diferencias interpoblacionales en la distribución de longitud y frecuencia de los alelos sugieren que *C. sociabilis* estuvo sujeto a reducciones históricas en el tamaño poblacional, a diferencia de *C. haigi*. El estudio mostró que el análisis de la estructura poblacional por microsatélites puede proveer información sobre fenómenos históricos que tienen una importancia decisiva en los niveles actuales de variabilidad genética (Lacey 2001).

1.1.5. Variabilidad cromosómica

Además de una gran diversidad de especies, los tuco-tucos poseen un rango de heterogeneidad cariotípica extremadamente grande. El número de cromosomas (2N) varía entre 10 en (*C. steinbachi*) y 70, en *C. dorbignyi* (Reig 1989). Si consideramos la familia Octodontidae en su conjunto (es decir, octodontinos y ctenominos), el rango se eleva aún más, ya que

Tympanoctomys barrerae posee un complemento de 102 cromosomas, el más alto descrito en mamíferos (Contreras et al. 1990; Gallardo et al. 1999).

La mayoría de las especies del género tienen un cariotipo distintivo, aunque como se mencionó más arriba, muchas especies presentan polimorfismos y politipismos cromosómicos. Existen, sin embargo, patrones de variación cromosómica que se apartan de esta regla general. El grupo de especies andinas *C. opimus*, *C. fulvus* y *C. robustus* presenta una marcada estabilidad cariotípica, con $2N=26$ y bandas C muy similares (Gallardo 1979). Las especies del centro de Argentina *C. mendocinus*, *C. porteousi*, *C. australis* y *C. azarae* comparten un complemento de 48 cromosomas, con gran homogeneidad interespecífica a nivel de morfología cromosómica y bandas C y G (Massarini et al. 1991), aunque existe en el grupo un polimorfismo complejo, excepto en *C. australis* (Massarini et al. 1991; Massarini et al. 1998). En contraste, otras especies presentan diferentes cariotipos coexistiendo en una misma población o como politipismos. Por ejemplo, la especie *C. boliviensis* constituye un arreglo politípico de poblaciones con números diploides de 36 y 42 a 46 que posiblemente constituyan, en realidad, más de una especie (Cook 1990). *C. pearsoni* representa un caso similar, con poblaciones de $2N=58$ y $2N=70$ que habitan en la región costera de Uruguay (Novello and Lessa 1986). El caso más extremo en este sentido está representado por una serie de especies y poblaciones de la Provincia de Corrientes, en Argentina, pertenecientes al llamado "grupo Corrientes". Cada población tiene un cariotipo distintivo, aunque pocas son polimórficas, con números diploides de 42, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 66 (Ortells et al. 1990; Bidau et al. 2000).

Pueden distinguirse, entonces, dos patrones generales de evolución cromosómica en el género. Uno caracterizado por la variación, en el cual las especies tienen cariotipos distintivos, producto de un dinámico proceso de evolución cromosómica. El otro patrón corresponde a grupos de especies entre los cuales hay poca variación en los cariotipos. Algo similar ocurre en los roedores norteamericanos del género *Thomomys* (*pocket gophers*). Estos roedores tienen algunos aspectos parecidos a los tuco-tucos y han sido muy estudiados. Las especies de *Thomomys* miembros del grupo *bottae* comparten

un cariotipo de 48 cromosomas, con polimorfismos solamente debidos a adiciones o pérdidas de heterocromatina. El grupo *talpoides*, por el contrario, contiene cariotipos que son específicos de cada especie (Patton and Yang 1977, Patton and Sherwood 1982).

La elevada diversidad cariotípica de *Ctenomys* condujo a postular que los cromosomas juegan un papel central en los procesos de especiación a través de los cuales se generó gran parte de la diversidad de especies que hoy se conocen en el género (Reig and Kiblicky 1969, Reig 1989, Reig et al. 1990).

1.1.6. Estudios de biología celular y molecular en *Ctenomys*

Un peculiar aspecto de los tuco-tucos que ha sido objeto de numerosos trabajos es el de la particular morfología espermática existente en algunas especies del género. Inicialmente, Feito y Gallardo (1976) observaron que los espermatozoides de *C. maulinus* presentan el flagelo desplazado de la región axial y además tienen una prolongación posterior del acrosoma. Posteriormente (Feito and Gallardo 1982; Vitullo et al 1988; Vitullo and Cook 1991) se encontró que otras especies, principalmente del centro de Argentina, poseen el espermatozoide asimétrico, mientras que otras poseen el tipo simétrico, similar al de la mayoría de los roedores. Vitullo y Cook (1991) propusieron que el tipo asimétrico representa una condición apomórfica, lo que permitiría distinguir dos grupos filogenéticamente diferenciados. Sin embargo, D'Elia et al (1999) sugirieron, en base a estudios filogenéticos, que el espermatozoide asimétrico se originó más de una vez durante la evolución del género.

Recientemente se ha descubierto que los tuco-tucos presentan un particular procesamiento de su ARN ribosomal. A diferencia del resto de los mamíferos, los tuco-tucos poseen la subunidad grande del ARN ribosomal partida en dos moléculas de 2,6 y 1,8 kilobases, respectivamente (Melen et al. 1999; Melen 2001). Al mismo tiempo, dicho ARN sufre una maduración por la cual se elimina un intrón de 106 nucleótidos. Este proceso de maduración del ARN es de expresión específica en tejidos testiculares. Estas peculiares características descubiertas en el género *Ctenomys* son desconocidas en otros vertebrados.

1.2. Evolución cromosómica y especiación

Consideraremos como evolución cromosómica a todos los procesos que intervienen en el cambio en la composición cariotípica de una población o de un conjunto de poblaciones o especies, sin suponer necesariamente una relación causal entre estos cambios cromosómicos y el proceso especiogénico.

La evolución cromosómica está condicionada tanto por el nivel poblacional, ecológico y demográfico, como por el nivel genómico y molecular. Los factores poblacionales, ecológicos y demográficos determinan la probabilidad que tendrán los cambios cromosómicos de permanecer y fijarse en una población, mientras que los factores genómico y molecular tienen influencia sobre el tipo y la frecuencia de los rearrreglos cromosómicos. La posibilidad de que diferencias cariotípicas entre poblaciones actúen como una barrera reproductiva generando aislamiento entre ellas originó el concepto de especiación por transiliencia cromosómica (Templeton 1980). Posteriormente surgieron otros modelos de especiación cromosómica que fueron clasificados por Sites y Moritz (1987) en tres clases: la primera incluye a los modelos que se basan en alteraciones en la eficiencia meiótica en los heterocariotipos causadas por los reordenamientos. Los modelos incluidos en esta clase son el estasipátrico (White 1968), de especiación por alopatria cromosómica primaria (King 1981), de cascada (Hall 1983) y en cadena (White 1978). Todos ellos plantean que la ocurrencia de uno o varios reordenamientos cromosómicos causan el aislamiento reproductivo de la población o subpoblación que lleva los rearrreglos respecto de la población ancestral. En el modelo estasipátrico, el cambio puede ocurrir dentro de la población original o en parapatria, mientras que los otros modelos (alopatria primaria, en cadena y de cascada) son esencialmente alopátricos. Estos modelos presentan una importante dificultad. La fijación de rearrreglos cromosómicos fuertemente negativos en heterocigosis por deriva es altamente improbable, a menos que ocurran en poblaciones muy pequeñas (Hedrick 1981, Lande 1985). Esto significa que la probabilidad de fijación de un rearrreglo es inversamente proporcional a su capacidad de funcionar como barrera reproductiva. Existen mecanismos conocidos como de "conducción meiótica" (*meiotic drive*) que son capaces de favorecer la transmisión de ciertas gametas portadoras de un determinado rearrreglo, en

cuyo caso aún en condiciones poblacionales no tan favorables, ocurre la fijación (King 1993).

La denominada clase II de Sites y Moritz (1987) contiene al modelo de fusiones monobraquiales (Capanna 1982, Baker and Bickham 1986). Este modelo propone que diferentes fusiones céntricas se fijan independientemente en distintas poblaciones con pequeño o nulo efecto en la fertilidad de los heterocigotas. Los híbridos que resulten del contacto entre las dos subpoblaciones resultarán interestériles debido a las diferentes combinaciones de brazos cromosómicos fusionados en las dos subpoblaciones. Es importante notar que la ocurrencia de este modelo no estaría limitada por las dificultades mencionadas arriba.

La clase III contiene al modelo recombinacional. El mismo describe un proceso en el cual la hibridación entre poblaciones cromosómicamente divergentes conduce a la ruptura de los rearrreglos que caracterizan a las poblaciones parentales, produciéndose la ruptura de complejos de genes coadaptados (Grant 1981).

Muchos autores han planteado dudas sobre el rol de los cromosomas en la especiación. Las críticas provienen principalmente de la observación de que muchos rearrreglos tienen poco efecto sobre la fertilidad, de las dificultades teóricas asociadas con la fijación de rearrreglos negativos en heterocigosis, etcétera (Sites and Moritz 1987, King 1993). Dichos cuestionamientos pueden ser adecuados para ciertos casos, pero los efectos de los rearrreglos dependen de muchos factores y serán diferentes en cada caso. Entre los tuco-tucos, las poblaciones del "grupo Corrientes" son candidatas a representar un ejemplo donde los reordenamientos cromosómicos juegan un papel primario en el aislamiento reproductivo (Ortells 1990), aunque resulta muy difícil encontrar el modelo que mejor describa la situación ya que en las especies del grupo se han observado todo tipo de rearrreglos. Sin embargo, para asignar fundadamente un rol especiogénico a los rearrreglos cromosómicos se requiere demostrar que éstos producen efectos heteróticos negativos. Estudios recientes sobre la meiosis de cariotipos reordenados en algunas zonas híbridas entre poblaciones han mostrado meiosis regulares y probablemente con escasos y nulos efectos sobre la fertilidad (Bidau et al. 2000).

Muchos modelos de especiación cromosómica casi no han tenido en cuenta factores intrínsecos del genoma como la presencia de secuencias de ADN repetido o elementos transponibles (ver ítem 1.5.1), que facilitan y/o que pueden generar, en forma recurrente, rearrreglos cromosómicos (Evgen'ev et al. 2000). Si los genomas tienen altas tasas de mutaciones cromosómicas, la evolución cariotípica ocurrirá incluso si las condiciones poblacionales no son tan estrictas como requieren los modelos. Los ADN repetidos, tanto los altamente como los medianamente repetidos son probablemente los componentes del genoma responsables de promover plasticidad genómica y por consiguiente altas tasas de evolución cromosómica (Cáceres et al. 1999; Evgen'ev et al. 2000). Dado que tanto la evolución cromosómica como la estabilidad son posibles resultados de la combinación de factores a nivel poblacional y genómico, la concurrencia de altas tasas de cambios cromosómicos y una estructura poblacional permisiva facilitarán altas tasas de evolución cromosómica (King 1993).

1.3. Filogenia de *Ctenomys*

La comprensión de las relaciones filogenéticas de los organismos constituye uno de los puntos de partida para el estudio de aspectos evolutivos, taxonómicos e incluso aquellos que atañen a la biología, como la biogeografía y la ecología, pero también la fisiología o el comportamiento. El marco filogenético, además de proveer una base formal para la clasificación natural, representa una herramienta clave para entender la influencia de factores históricos sobre la diversidad y distribución actual de las especies, y para discernir la naturaleza adaptativa o contingente y el modo de evolución de los rasgos tanto fenotípicos como genéticos.

La filogenia de los roedores octodóntidos ha sido desconocida durante mucho tiempo. Dado que esta familia posee representantes subterráneos y de superficie, es particularmente interesante para el estudio del origen de las adaptaciones a la vida bajo tierra. Se ha postulado que el estilo de vida subterráneo favorece elevadas tasas de diversificación en general y en los tuco-tucos en particular (Nevo 1979; Reig 1989). Los trabajos de Cook y Lessa (1998) y Cook y col. (2000) evaluaron estas hipótesis utilizando pruebas

estadísticas diseñadas para detectar posibles desbalances en las tasas de diversificación entre las ramas de un árbol filogenético al comparar grupos de hábitos subterráneos y no subterráneos. No encontraron evidencia para sostener que los primeros son más diversos que los segundos, aunque sí resultó evidente que el linaje de *Ctenomys* tiene una tasa de diversificación más elevada que sus parientes. En el caso particular de *Ctenomys*, la necesidad de contar con una filogenia confiable se hace evidente al observar las dificultades que existen tanto para el tratamiento taxonómico de muchas especies como para la comprensión de los complejos patrones de evolución cromosómica. En esta tesis se desarrollará un enfoque filogenético para intentar comprender, en un marco más amplio, los patrones de evolución cromosómica en los tuco-tucos.

Históricamente, las descripciones de las especies de *Ctenomys* estaban basadas principalmente sobre la variación en el color del pelaje, el tamaño del cuerpo y en unos pocos caracteres osteológicos (Sage et al. 1986). Los sucesivos estudios que utilizaron caracteres bioquímicos y citogenéticos mostraron que muchas entidades nombradas en base a los caracteres externos contenían a veces numerosas formas crípticas, distinguibles sólo por caracteres genéticos y/o citogenéticos. Los primeros de estos trabajos estudiaron la diferenciación entre especies comparando el grado de reacción de las proteínas del sistema inmune al confrontarlas entre sí (Roig and Reig 1969) y también analizaron la diferenciación cariotípica (Reig and Kiblisky 1969; Kiblisky et al. 1977) e inmediatamente pusieron en evidencia el impresionante potencial evolutivo de este género, que fue confirmado por posteriores trabajos sobre cromosomas (Anderson et al. 1987; Freitas and Lessa 1984; Gallardo 1991; Ortells et al 1990; Reig et al. 1992). La morfología espermática y del aparato genital fueron utilizadas también como caracteres para delinear relaciones evolutivas (Altuna et al. 1985; Feito and Gallardo 1982; Vitullo and Cook 1991). Dentro del género se conocen dos tipos principales de espermatozoide, uno simétrico con dos proyecciones laterales cortas del acrosoma y uno asimétrico, en el cual hay un único proceso lateral largo (Feito and Gallardo 1982). La morfología espermática fue utilizada por Feito y Gallardo (1982) para delimitar dos linajes principales basados en la supuesta

monofilia del carácter derivado asimétrico. Un estudio filogenético reciente (D'Elía et al 1999) sugiere que el espermatozoide asimétrico habría aparecido más de una vez, contradiciendo el modo de evolución propuesto por Feito y Gallardo (1982).

El primer estudio realizado utilizando métodos de inferencia filogenética fue el de Sage y col. (1986), que utilizaba como caracteres las variantes alozímicas de 34 *loci* en muestras procedentes de 11 localidades de Argentina. Más tarde, Cook y Yates (1994) exploraron las relaciones filogenéticas de 8 especies procedentes de Bolivia, estudiando también variación alozímica en 21 *loci*. Ortells (1995) utilizó datos de bandas G para analizar cladísticamente las relaciones entre 11 especies y 5 cariomorfos de Argentina, que abarcaban una distribución más amplia que las especies del estudio de Sage y col. (1986), aunque centrando el foco sobre el "grupo Corrientes". Más recientemente, Lessa y Cook (1998) realizaron el primer estudio de filogenia con secuencias de ADN en tuco-tucos. En dicho trabajo analizaron la variación en la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial citocromo b en 11 especies nominales de *Ctenomys* y 5 formas indeterminadas. Los individuos utilizados provienen mayoritariamente de la porción noroeste del área de distribución del género (Bolivia, Norte de Argentina, este de Paraguay, norte de Chile). Mascheretti y col. (2000) analizaron secuencias parciales del gen citocromo b en especies del centro y noreste de Argentina, agregando algunas de las ya publicadas por Lessa y Cook (1998). Ambos trabajos mostraron una notable falta de resolución entre las ramas basales de la filogenia, evidenciada por una gran politomía, mientras que los grupos más terminales son resueltos satisfactoriamente, mostrando concordancia con agrupamientos encontrados en los trabajos antes citados. La dificultad para determinar el orden de cladogénesis en un grupo de especies al realizar un análisis de inferencia filogenética puede responder a dos causas. Si las secuencias utilizadas para efectuar el análisis presentan un elevado grado de divergencia, no necesariamente en la totalidad de la misma, sino en una determinada proporción de los sitios variables, la información evolutiva que se espera obtener de las mismas pudo haberse "borrado" debido a la ocurrencia de más de una mutación en las mismas posiciones. En consecuencia, las

relaciones filogenéticas entre algunas especies no pueden resolverse (figura 3), generándose un árbol con una o varias politomías denominadas "blandas" (Hillis et al. 1996). En cambio, si las especies en cuestión han surgido durante un corto período de tiempo, las secuencias en estudio pudieron no haber acumulado suficientes mutaciones informativas. En este caso, se habla de politomías "duras", producto de verdaderos eventos de cladogénesis virtualmente simultánea (Hillis et al. 1996). Lessa y Cook (1998) discuten entonces que la falta de resolución en el árbol de los tuco-tucos puede deberse tanto a la saturación de los caracteres (politomía "blanda"), como a la radiación temprana de los tuco-tucos que involucró la diversificación simultánea de numerosos linajes (politomía "dura"). Al estudiar la filogenia de los equímidos, utilizando también el gen citocromo b, Lara y col. (1996) obtuvieron una politomía a niveles de divergencia más grandes que los observados para las especies de *Ctenomys*. Además, los datos de Lara y col. (1996) evidenciaban fuerte señal filogenética en ramas anteriores y posteriores a la politomía, sugiriendo que la politomía corresponde a cladogénesis simultáneas.

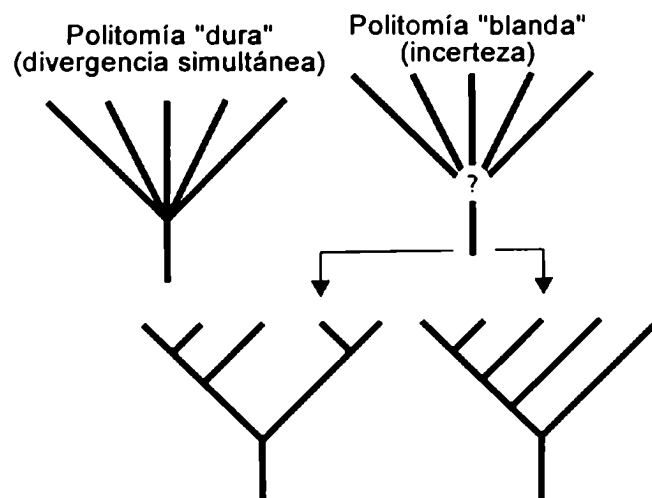


Figura 3: La falta de resolución en un árbol puede deberse a la diversificación simultánea de los organismos o a falta de información en el marcador. Modificado de Li (1997).

Utilizando el mismo gen, D'Elía y col. (1999) analizaron 12 individuos que representaban a 5 especies con la intención de evaluar la monofilia y los

límites de las especies del grupo mendocinus. El grupo mendocinus, compuesto originalmente por *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis* y *C. porteousi* (Massarini et al. 1991) se caracteriza por una gran cohesión morfológica, genética y cromosómica. Los resultados indican que la especie brasileña *C. flamarioni* y la especie uruguaya *C. rionegrensis* formarían también parte del grupo mendocinus (D'Elía et al 1999).

1.4. Inferencia Filogenética

Desde la antigüedad, los naturalistas han tratado de describir y explicar la diversidad de las formas vivientes. El primer esquema formal de clasificación de los organismos fue construido por Linneo (1758). Este sistema jerárquico de clasificación era independiente de cualquier tipo de consideración evolutiva, ya que los tiempos del pensamiento evolutivo no habían comenzado aún. Sin embargo, a pesar de ser concebido bajo la fuerte influencia del esencialismo aristotélico, el sistema sobrevivió y fue incorporado por los evolucionistas como marco para generar una clasificación basada en las relaciones filogenéticas. Hasta casi la mitad del siglo XX, la reconstrucción de la filogenia se basaba principalmente en muy pocos criterios objetivos, y la determinación sistemática era una atribución de los expertos en los respectivos grupos de organismos.

La tarea de la sistemática moderna, entonces, consiste en generar una clasificación natural, reflejo de las relaciones filogenéticas entre los organismos. Dichas relaciones son descritas como patrones de ramificación en representaciones conocidas como árboles filogenéticos. La manera y los criterios que los sistemáticos utilizan para efectuar las comparaciones difieren según los preceptos de las dos grandes corrientes conceptuales dentro de la sistemática. El feneticismo es el resultado del primer enfoque utilizado con la meta de dar objetividad a las metodologías de reconstrucción filogenética superando la subjetividad del criterio de autoridad que introducía, de hecho, el confiar la sistemática de un grupo de organismos a la opinión de prestigiosos expertos. Los métodos fenéticos funcionan agrupando las unidades taxonómicas operacionales (OTU, por *operational taxonomic unit*, corresponde a las especies, poblaciones o cualquier otra entidad taxonómica representada) sobre la base de su similitud general. Estos agrupamientos no representan

necesariamente genealogías. La escuela feneticista sostiene que la similitud general obtenida al comparar un gran número de caracteres (rasgos que se miden y comparan) resultará en una buena representación de las relaciones de parentesco.

La otra gran escuela sistemática surgió en la década del '50, a través del trabajo del entomólogo Willi Hennig (Hennig 1966). Esta nueva corriente, conocida como cladismo, se propone reconstruir explícitamente las relaciones evolutivas. A diferencia del feneticismo, quien no privilegia algún carácter en particular, el análisis cladístico busca inferir la historia real a través de ciertas características conocidas como rasgos derivados compartidos, o sinapomorfías en la terminología cladista. Los rasgos llamados primitivos o plesiomorfías (rasgos ya presentes en el ancestro común del grupo en estudio) por el contrario, no proporcionan información acerca de las relaciones de parentesco entre los organismos analizados. Desde el origen mismo de ambas vertientes sistemáticas existe una permanente controversia respecto de cuál de los dos enfoques es más adecuado para construir hipótesis sobre las relaciones evolutivas de los organismos. El debate planteado llegó a adquirir una ferocidad inusitada entre los proponentes más tenaces de ambas partes. Sin embargo, la mayoría de los biólogos parece reconocer una superioridad filosófica en el enfoque cladístico, aunque sin descartar en ciertos casos la utilidad de los métodos fenéticos.

Inicialmente la sistemática moderna comparó rasgos morfológicos entre los organismos en estudio. El fundamento consiste en que la variación en el acervo genético de las poblaciones a lo largo de su historia se traduce en cambios en el fenotipo de los organismos. Por lo tanto la observación de las diferencias y similitudes fenotípicas, aunque ocasionalmente se consideraron también rasgos fisiológicos y comportamentales, es interpretada como un reflejo de la diferenciación genética de los organismos dando por lo tanto información válida para inferir el grado de parentesco. Así, un sinnúmero de estudios abarcando en mayor o menor medida todo el espectro taxonómico permitió llegar a construir un panorama general de la historia de los seres vivos. Sin embargo, muchos grupos resultaban particularmente difíciles de estudiar y sus relaciones permanecían poco claras y los resultados cambiaban

de acuerdo al conjunto de datos o al método de análisis utilizado. Esta situación se debe a que existen limitaciones, resultando en algunos casos los caracteres morfológicos inadecuados para resolver las relaciones evolutivas. Como resulta evidente, el repertorio de caracteres disponibles para ser estudiados depende de la naturaleza de los organismos. Por ejemplo, un entomólogo podrá comparar una gran cantidad de caracteres morfológicos entre un conjunto de insectos pertenecientes a la misma familia, pero encontrará menos caracteres en común al extender la muestra a insectos de otros órdenes. Esta característica se profundiza al considerar estudios que involucren grupos muy alejados evolutivamente. Es fácil darse cuenta de que el número de caracteres morfológicos comparables entre, por ejemplo, las distintas clases de vertebrados, o entre las distintas divisiones de las plantas es muy reducido. Más aún, para comparar representantes de los distintos reinos sólo es posible utilizar características subcelulares, muchas veces difíciles de homologar entre sí.

Cuando los especímenes a analizar están estrechamente emparentados y se quiere determinar sus relaciones de parentesco, ocurre frecuentemente que a nivel morfológico los integrantes del grupo están poco diferenciados, haciendo a veces imposible encontrar diferencias que permitan establecer un patrón de diversificación entre ellos. Asimismo, la base genética implicada en el desarrollo y variación de los rasgos morfológicos es, en el mejor de los casos, poco conocida.

Otra dificultad que pueden mostrar los caracteres morfológicos aparece cuando un determinado carácter adquiere el mismo estado en distintos linajes independientemente. Esto ocurre frecuentemente con los rasgos que están implicados en adaptaciones al medio, por lo que se conoce a este fenómeno como convergencia adaptativa, o en términos generales, convergencia evolutiva, ya que no siempre la convergencia tiene razones adaptativas. Como consecuencia, las convergencias favorecen agrupamientos falsos al realizar un análisis filogenético. La similitud de caracteres no debida a ancestralidad común (adquirida independientemente) se denomina homoplasia.

Los caracteres moleculares no son ajenos a la homoplasia. Estos datos también están sujetos a convergencia por reversión o paralelismo. Si

pensamos en dos secuencias de ADN de distintas especies, es fácil darse cuenta que un mismo sitio, que en principio contiene nucleótidos diferentes, puede mutar en los dos linajes independientemente para llegar a contener la misma base, generando el mismo estado en un carácter, resultando en una homoplasia. Si el cambio es aleatorio (por ejemplo en el caso de mutaciones sinónimas) hablamos de paralelismo, mientras que si hay influencia selectiva se denomina convergencia. Por ejemplo, cuando una proteína se encuentra ante presiones selectivas similares en dos linajes y se favorece la fijación de determinado aminoácido. La presencia y los efectos de las homoplasias en un análisis de filogenia molecular depende en gran medida de la naturaleza de la matriz de datos y de los métodos analíticos que se utilicen.

1.4.1. La filogenia molecular

Cuando la disponibilidad de metodologías lo hizo posible, muchos biólogos comenzaron a explorar el uso de las técnicas bioquímicas empleadas por los genetistas para estudiar la variabilidad genética con el objeto de utilizar los datos como caracteres en análisis filogenéticos y genealógicos. Así, técnicas como el análisis de aloenzimas, empleadas desde los años '60 para estudiar la dinámica microevolutiva de las poblaciones (Lewontin and Hubby 1966), mostraron ser capaces de proveer información para estimar relaciones de parentesco entre poblaciones y especies cercanas. Técnicas inmunológicas fueron también utilizadas para explorar afinidades genéticas, permitiendo en este caso la comparación de especies más lejanamente emparentadas. Por ejemplo, las distancias inmunológicas fueron utilizadas para estudiar las relaciones entre el hombre y los grandes simios (Goodman 1963). Estos enfoques, si bien analizan diferencias y similitudes en un nivel más cercano al genético que los rasgos morfológicos, son aún relativamente indirectos. El primer método utilizado con fines sistemáticos que analiza en el nivel de los ácidos nucleicos fue la hibridación ADN-ADN. Esta técnica consiste en la desnaturalización térmica del ADN genómico de dos especies y la medición de la cinética de renaturalización conjunta de los ADN heterodúplex de las dos especies. Cuanto mayor es la similitud genética, la velocidad de

renaturalización es mayor. La hibridación ADN-ADN fue ampliamente utilizada en numerosos casos que hasta el momento no habían sido resueltos por los métodos tradicionales (Springer and Kirsch 1991; Kirsch et al. 1991). Los datos obtenidos por los métodos mencionados miden esencialmente el grado de divergencia genética, o distancia genética, lo cual los hace adecuados para análisis del tipo fenético y no cladístico. El desarrollo de las técnicas de biología molecular permitió a los biólogos sistemáticos tener acceso al máximo nivel de detalle al poder comparar las secuencias de nucleótidos que forman el material genético de los organismos. Las secuencias de ADN y de proteínas pueden ser utilizadas tanto a través de metodologías fenéticas como cladísticas.

La posibilidad de utilizar directa o indirectamente la información del ADN permite superar algunas de las dificultades que presentan los caracteres morfológicos. La existencia de un conjunto de genes que es común a todos los organismos conocidos permite hacer estudios filogenéticos que involucren representantes tan lejanos entre sí como lo son las bacterias, los animales, las plantas o cualquier otro ser vivo, y que comparten pocas características morfológicas. Por otro lado, aún especies muy cercanas, al grado de no presentar diferencias morfológicas, mostrarán algún tipo de diferenciación a nivel genético, lo cual puede ser evidenciado por un análisis molecular y utilizado para resolver su parentesco.

1.4.2. El reloj molecular

A partir de mediados de la década del '50 fue posible obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas, aunque en principio la técnica fue muy trabajosa y podía emplearse con proteínas que pudieran purificarse en gran cantidad. En 1962, Emile Zuckerkandl y Linus Pauling obtuvieron la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina de algunas especies de animales (Zuckerkandl and Pauling 1965). Al compararlas, notaron que el número de diferencias entre ellas parecía ser proporcional al grado de divergencia entre las especies. Así, Zuckerkandl y Pauling contaron 16 aminoácidos diferentes entre el hombre y el ratón, 18 entre el hombre y el caballo. Entre el hombre y pájaros, ranas y tiburones encontraron 35, 62 y 79 diferencias, respectivamente (Zuckerkandl and Pauling 1965). Este resultado indujo a sus autores a

proponer que los cambios de aminoácidos que ellos observaron son el resultado de mutaciones en el ADN que estarían ocurriendo a intervalos de tiempo relativamente regulares, lo que resultaría en una proporcionalidad entre los reemplazos de aminoácidos y el tiempo transcurrido desde la divergencia de las especies consideradas. Este trabajo fue casi un hito fundacional para la nueva disciplina de la sistemática molecular y significó una verdadera revolución para la biología evolutiva, ya que introdujo el concepto del reloj molecular. A pesar de permanecer aún en un candente debate, este concepto nos permite incorporar un marco temporal a la comprensión de, al menos, gran parte de la historia evolutiva.

A fin de convertir a las secuencias de proteínas y genes en herramientas apropiadas para recuperar confiablemente la historia evolutiva, se requirió el desarrollo de descripciones matemáticas del proceso de cambio de las secuencias en el tiempo. Estas descripciones son conocidas como modelos de evolución de las secuencias. Los modelos facilitan la reconstrucción de los eventos pasados, permiten hacer predicciones acerca de los cambios futuros y son una parte importante de la evolución molecular. A pesar de estar en constante desarrollo, los elementos básicos que formaban parte de los primeros modelos desarrollados hace ya casi 40 años son todavía relevantes. El supuesto básico se refiere a que la mayoría de los procesos de la evolución al nivel molecular son de naturaleza estocástica, aleatoria.

Al extenderse las comparaciones de secuencias a distintas proteínas y genes y a distintos grupos taxonómicos, rápidamente se hizo evidente que la acumulación de mutaciones no era la misma, tanto en el número de cambios por unidad de tiempo como en el modo de evolución. Secuencias de ADN pertenecientes a distintas regiones del genoma y con distintas funciones mostraban muy diferentes patrones de reemplazo nucleotídico (Li 1997, Page and Holmes 1998). Se notó, por ejemplo, que las sustituciones no estaban homogéneamente distribuidas, particularmente en las secuencias de ADN que codifican para proteínas o ARN ribosomal. Por otro lado, algunas secuencias mostraban mucha diferenciación entre especies cercanamente relacionadas, mientras que otras eran casi invariantes. Todas estas observaciones fueron paulatinamente interpretadas en términos de mecanismos de evolución y se

incorporaron a los modelos de evolución molecular a fin de hacer más preciso y realista el trabajo de reconstrucción filogenética.

El concepto de reloj molecular está íntimamente relacionado con la teoría neutralista de la evolución molecular. La misma sostiene que la mayoría de los cambios nucleotídicos no tienen efecto sobre la adecuación darwiniana (*fitness*) (Kimura 1983). Al mismo tiempo, puede demostrarse que la velocidad de fijación de las mutaciones en condiciones de neutralidad depende solamente de la tasa intrínseca de mutación (Li 1997). Por lo tanto, si la hipótesis neutralista es correcta, las mutaciones neutras serán las mayoritarias en una proteína y su tasa de evolución debería ser constante.

Los postulados de la teoría neutralista provocaron una encendida controversia en torno al rol de la selección natural en la evolución molecular. El estudio de la evolución de las secuencias nucleotídicas en cientos de genes y en numerosos organismos de todo tipo puso en evidencia que la selección natural es una fuerza que, en mayor o menor medida según el caso, opera a nivel molecular y llega a ser significativa (Kreitman 1983, Kreitman and Akashi 1995; Hartl et al. 1994). Las posiciones nucleotídicas en las que una mutación trae aparejado un cambio de aminoácidos suelen estar sujetas a presiones selectivas en contra de los reemplazos. La intensidad de la presión varía según el grado de restricción funcional que presenta el aminoácido en cuestión. Sin embargo, aquellas mutaciones que no determinan un reemplazo aminoacídico por la redundancia del código genético, conocidas como sinónimas, no están sujetas a restricciones selectivas y por lo tanto pueden evolucionar neutralmente.

A medida que se conocieron más datos sobre la evolución de las secuencias de ADN, se evidenciaron ciertas desviaciones a las predicciones de la teoría neutralista. Un ejemplo es el sesgo en el uso de los codones sinónimos. La degeneración del código genético significa que la mayoría de los aminoácidos están codificados por un cierto número de tripletes o codones que resulta de la combinación de distintos nucleótidos en la 1era y 3era posiciones. Los tripletes que codifican un mismo aminoácido son sinónimos. Una hipótesis nula sobre la frecuencia relativa de uso de los distintos codones sinónimos predice que todos deberían encontrarse en igual frecuencia en los genes. Sin

embargo, estudios realizados en algunos organismos como *E. Coli* (Sharp and Li 1987), muestran que codones sinónimos no se encuentran con la misma frecuencia, es decir, hay un sesgo en el uso de codones sinónimos.

En *E. coli* y en levaduras (Bulmer 1991) se vio que este sesgo era más pronunciado en genes que se expresan a niveles altos (como los que sintetizan proteínas de membrana) respecto de los que se expresan menos. Por otro lado se observó que, para un dado aminoácido (por ejemplo leucina), el codón que se encuentra con más frecuencia en las proteínas corresponde al tRNA^{Leu} transcrito en mayor abundancia. Es decir, lo que se observa es el resultado de un proceso de coevolución codón-tRNA; una explicación seleccionista, que encaja muy bien con poblaciones grandes como son las de bacterias.

También cabe un relato neutralista: el requerimiento funcional de los codones ubicados en genes de altos niveles de expresión es alto y por lo tanto es baja su velocidad de sustitución sinónima. De hecho, el sesgo en el uso de codones implica que una posición considerada neutra en extremo (3a posición de codones 4 veces degenerados), está sujeta a restricciones funcionales, lo que explica que su tasa de sustitución es menor que la máxima. El hallazgo de sesgo en el uso de codones sinónimos es una restricción a la teoría neutralista, es una desviación, (aunque de pequeña magnitud) a una de las predicciones de la teoría.

Tomoko Ohta, la principal discípula de Kimura, incorporó estos hallazgos y críticas y elaboró una nueva versión de la teoría, conocida como teoría casi neutralista, reconociendo que las sustituciones no sinónimas no son perfectamente neutrales, sino ligeramente deletéreas o casi neutrales (Ohta 1992; Ohta 1995). Esta revisión de la teoría neutralista proporciona una visión más realista de cómo las mutaciones afectan las complejas interacciones entre los aminoácidos que componen una proteína y su medio.

A pesar de las múltiples críticas que recibió y recibe, la teoría neutralista representa un aporte fundamental para la evolución molecular al proveer herramientas rigurosas con las cuales detectar efectos provocados por evolución adaptativa en proteínas, relajación de restricciones funcionales, e incluso grandes fluctuaciones en el tamaño poblacional de un linaje (McDonald and Kreitman 1991; Hudson et al. 1987). Además, los tratamientos

matemáticos propuestos por la teoría neutralista permanecen siendo válidos para las mutaciones neutrales o cercanamente neutrales. Se considera además que, si bien la tasa de evolución varía considerablemente entre linajes distantes, la variación entre especies relacionadas es lo suficientemente pequeña como para considerarla constante para el grupo en estudio, más aún cuando las especies se asemejan en parámetros como el tamaño corporal, tasa metabólica y tiempo generacional ya que la tasa de mutación depende de estos factores (Martin and Palumbi 1993).

Se ha mencionado más arriba que para estimar la divergencia entre secuencias se utilizan modelos que tienen en cuenta el proceso de evolución molecular. A continuación se mencionarán algunos de los factores que influyen de alguna forma en este proceso alterando ya sea la constancia de la tasa mutacional entre linajes como dentro de una secuencia.

Si comparamos la secuencia nucleotídica de un gen determinado entre especies cercanamente relacionadas podremos contar un número de diferencias entre ellas. Al extender la comparación a especies más alejadas, el número de diferencias será mayor, ya que otras posiciones nucleotídicas habrán experimentado mutaciones en uno u otro linaje. Así, en muchos casos la proporcionalidad pareciera ser lineal. Sin embargo, cuando el tiempo de divergencia aumenta, la probabilidad de que ocurra una mutación en un sitio que ya mutó previamente se hace significativa. Por lo tanto, el número observado de sustituciones al comparar las dos secuencias será menor que el número real de sustituciones ocurridas entre los linajes. Se conoce a este efecto como saturación por múltiples sustituciones. La figura 4 muestra un ejemplo de saturación: la pendiente de la curva de número de cambios versus el tiempo de divergencia para el gen mitocondrial COII en bóvidos disminuye gradualmente debido a que, a partir de cierto, tiempo las nuevas sustituciones tienen poco impacto sobre el número observado de sustituciones (Janecek et al. 1996).

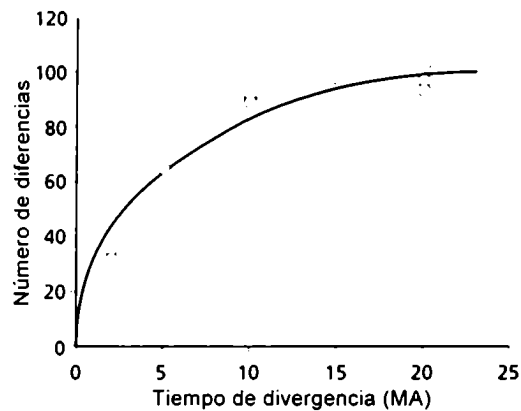


Figura 4: La acumulación observada de sustituciones en el gen mitocondrial COII pierde la linealidad debido a la saturación de sustituciones.

1.4.3. Modelos de evolución molecular

El primer objetivo de los modelos de evolución molecular es corregir el efecto de la saturación en los cálculos de la divergencia genética. La figura 5a) resume los parámetros que toman en cuenta algunos modelos de evolución molecular (para profundizar acerca de modelos de evolución consultar Hillis et al 1996; Li 1997). La figura 5b) muestra una representación gráfica del efecto de aplicar un modelo que corrige la desviación de la linealidad debida a sustituciones múltiples.

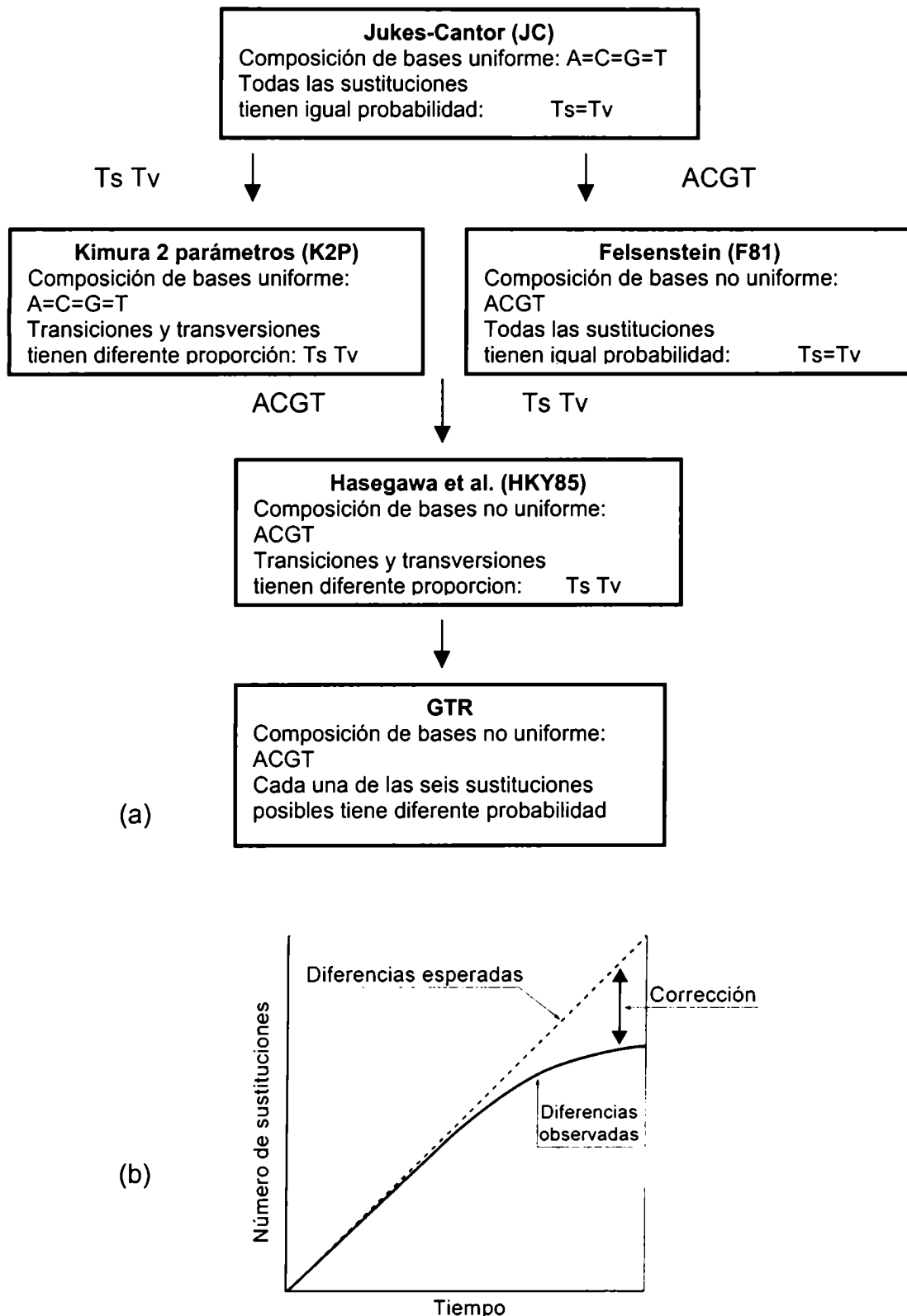


Figura 5: a) Relaciones entre cinco modelos para estimar el número de sustituciones nucleotídicas entre dos secuencias de ADN. Los modelos JC, K2P, F81 y HKY85 pueden ser generados restringiendo los parámetros del modelo GTR.

b) La ocurrencia de sustituciones múltiples en un mismo sitio provoca que las sustituciones sean subestimadas. Los modelos de evolución tienen el objetivo de corregir la discrepancia.

El modelo de Jukes-Cantor (Jukes and Cantor 1969) es el más sencillo. Asume que las cuatro bases tienen frecuencias iguales y que todas las sustituciones son igualmente probables. La distancia d corregida entre dos secuencias se expresa como:

$$d = -3/4 \ln(1 - 4/3p)$$

donde p es la proporción observada de diferencias entre dos secuencias.

Sin embargo, las sustituciones entre dos nucleótidos con el mismo tipo de base nitrogenada (purinas o pirimidinas) suelen ocurrir con más frecuencia que las sustituciones que cambian una purina por una pirimidina o viceversa. El modelo conocido como Kimura 2 parámetros (Kimura 1980) tiene en cuenta esta asimetría, y la divergencia d está expresada por:

$$d = 1/2 \ln[1/(1 - 2P - Q)] + 1/4 \ln[1/(1 - 2Q)]$$

donde P y Q son las diferencias proporcionales entre las dos secuencias debidas a transiciones y transversiones, respectivamente.

Cuando el conjunto de secuencias presenta una importante heterogeneidad en cuanto a la composición nucleotídica (es decir, A, C, G y T no están en igual proporción), las estimaciones también pueden verse afectadas con el consiguiente error en la inferencia filogenética. El modelo propuesto por Felsenstein (1981), conocido como F81, es similar al modelo Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984). Estos modelos consideran diferentes proporciones de cada uno de los cuatro nucleótidos.

El modelo HKY85 (Hasegawa et al. 1985) es una combinación de K2P y F81, ya que considera tanto frecuencia desigual de bases como diferente tasa de transiciones y transversiones.

Por último, el modelo GTR (por *general time reversible*), (Lanave et al. 1984; Rodríguez et al. 1990) permite especificar diferentes proporciones de

bases y una tasa de sustitución para cada uno de los seis tipos de sustitución posible (A por G, T por C, A por C, etcétera).

A pesar de que a mayor complejidad, el modelo parece ser más realista y por lo tanto es más tentador utilizarlo, se debe estudiar cuidadosamente el conjunto de datos ya que siempre es recomendable utilizar el mínimo número de parámetros que sea posible. Por ejemplo, si el conjunto de datos presenta una fuerte heterogeneidad de bases pero el cociente transiciones a transversiones es cercano a 1, es conveniente utilizar el modelo más sencillo que representa a los datos, en este caso el F81 y no el HKY85 o GTR.

Como se mencionó, algunas posiciones nucleotídicas están sujetas a presiones selectivas en contra de los reemplazos. La intensidad de la presión es mayor o menor, según el grado de restricción funcional que sufre el aminoácido determinado por el nucleótido. Otros sitios, no sujetos a selección, evolucionarán neutralmente. Algo similar ocurre en las secuencias de ADN que codifican para los ARN ribosomales y de transferencia. La función de los ribosomas y ARN de transferencia dependen fuertemente de su estructura secundaria, la cual está a su vez determinada por apareamientos entre tramos de la misma molécula. Una mutación en una región de apareamiento será seleccionada en contra porque probablemente afecte a la función de la molécula.

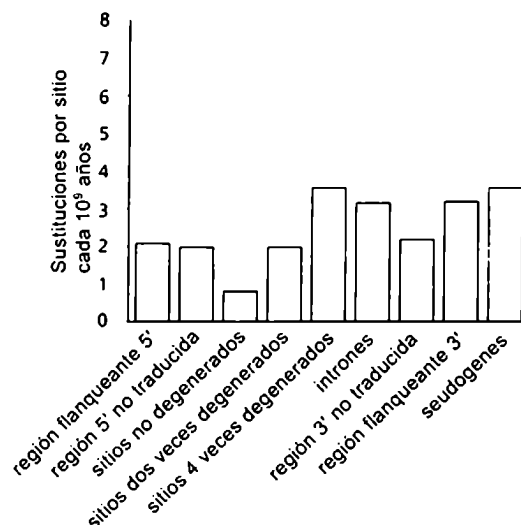


Figura 6: Tasas promedio de sustitución en diferentes regiones de genes de mamíferos y en seudogenes. Modificado de Li (1997).

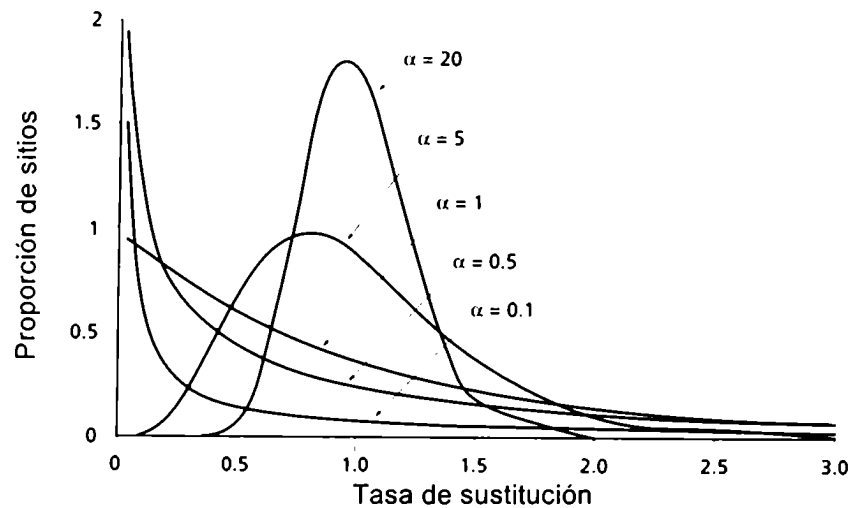


Figura 7: Distribuciones de las tasas de sustitución para diferentes valores del parámetro α . Bajos valores de α corresponden a grandes variaciones en la tasa. A medida que α aumenta, disminuye el rango de variación de la tasa. Para α tendiendo a infinito, todos los sitios tienen la misma tasa de sustitución. Modificado de Yang (1996).

Estos efectos explican porqué muchos genes presentan grandes diferencias en la tasa de evolución entre sitios. En estos genes suele ocurrir que algunas posiciones se saturan rápidamente, mientras que otras exhiben pocos cambios y otras son invariantes en toda la escala temporal representada por la muestra. La figura 6 muestra como varía la tasa de sustitución entre distintas regiones de los genes. Los modelos planteados arriba consideran que todos los sitios mutan con la misma probabilidad, por lo que utilizarlos con una secuencia que presenta gran variación de tasas entre sitios puede resultar inadecuado. La solución consiste en utilizar la distribución gamma (γ). Esta distribución tiene un parámetro de "forma" alfa (α), el cual especifica el rango de la variación de la tasa entre sitios (Hillis et al. 1996). Pequeños valores de alfa resultan en una distribución con una extrema variación de tasas: muchos sitios invariantes y pocos sitios con alta tasa de evolución. Por el contrario, a mayores valores de alfa, menor es la variación de las tasas (figura 7). El rango de alfa para la mayoría de los genes mitocondriales y nucleares estudiados es de 0,16 a 1,37 (Yang 1996). La distribución gamma puede utilizarse con

cualquiera de los modelos descritos arriba. El símbolo utilizado para indicar su uso en un modelo es "I". Otro parámetro que se refiere al grado de variación de tasas de evolución entre sitios de una secuencia es la proporción de sitios invariantes (I). Este parámetro estima la proporción de sitios que no varían, es decir, donde la ocurrencia de mutaciones tiene baja probabilidad, respecto de otras posiciones.

1.4.4. Árboles de genes y árboles de especies

Al trabajar con filogenias moleculares, nunca debe perderse de vista el hecho de que, al construir filogenias comparando la secuencia de un gen, estrictamente estamos construyendo la filogenia del gen, lo cual no implica necesariamente que estemos reconstruyendo la filogenia de las especies que lo portan. Es decir, no necesariamente hay coincidencia entre el árbol de genes y el de especies. Esta discrepancia puede deberse a varias razones. Cuando se utiliza una secuencia con altos niveles de polimorfismo en especies muy o relativamente cercanas, puede ocurrir que en algunas especies el o los alelos muestreados correspondan a variantes presentes en los ancestros, y por lo tanto compartidas por los descendientes. En este caso las verdaderas relaciones entre las especies no serán reflejadas por el árbol obtenido.

Otro motivo para la discrepancia entre el árbol del gen y el árbol de las especies es la ocurrencia de eventos de transferencia horizontal. Este proceso resulta cuando un linaje adquiere material genético de otro y lo integra a su genoma ya sea reemplazando a la versión propia, como ocurre en la conjugación de bacterias (Griffiths et al. 2000) o incorporándolo directa o indirectamente a su genoma, como ocurre con los retrovirus en los genomas de vertebrados cuando infectan especies distintas de su hospedador habitual e incorporan ADN exótico. Por ejemplo, un ARN mensajero del gen FAM8A1 presente en el genoma humano y de función aún desconocida, si la tiene, fue capturado por un retrovirus e integrado en el genoma durante la evolución de los primates (Jamain et al. 2001). La existencia de fenómenos de transferencia horizontal tiene profundas consecuencias en la forma en que representamos al árbol de la vida. La transferencia horizontal altera la naturaleza dicotómica que tradicionalmente se adjudica a cualquier árbol filogenético al aparecer ramas

que comunican distintas partes del árbol entre sí, transformando al árbol en una red o "jungla" (Page and Charleston 1998).

Finalmente, otra causa, tal vez la más común, por la cual la filogenia de genes no concuerda con la de las especies resulta de la comparación entre genes que se relacionan por un tipo particular de homología, la paralogía. Cuando en un linaje ocurre y se perpetúa una duplicación génica, las copias, producto de la duplicación, evolucionan independientemente entre sí. Cada una acumula mutaciones de acuerdo al proceso de evolución molecular, divergiendo de la otra copia en forma proporcional al tiempo transcurrido. Cuando ese linaje experimenta un evento de especiación, las dos copias permanecen representadas en ambas especies, al igual que el resto de los genes. Las copias que están en especies distintas y que eran "la misma copia" en el ancestro de las dos nuevas especies se dice que son ortólogos, su separación ocurrió en el evento de especiación. Los genes que están en distintas especies y que derivan de copias distintas en el ancestro, se denominan genes parálogos. Al comparar las secuencias nucleotídicas de los genes en ambas especies, el número de cambios entre genes ortólogos dará información del tiempo transcurrido desde el evento de especiación, mientras que los cambios acumulados entre parálogos, serán un reflejo del tiempo transcurrido desde la duplicación génica. Si las tasas de evolución molecular se mantuvieron constantes entre ambos linajes, el número de sustituciones entre los parálogos debería ser similar a los cambios entre los miembros del par de genes en cada especie. Por supuesto, al elegir un marcador para efectuar un análisis filogenético es importante tomar recaudos para asegurarse de estar comparando genes ortólogos.

1.4.5. Elección del marcador

En vistas de los numerosos factores que determinan el modo y velocidad de evolución de las secuencias nucleotídicas, es muy importante una cuidadosa evaluación al momento de elegir un marcador genético para trabajar en un estudio de filogenia. Dado que, para recuperar información evolutiva, un marcador debe presentar variación entre los individuos en estudio, es necesario utilizar un gen cuya tasa de evolución sea tal que se evidencien

mutaciones en el tiempo de divergencia de los taxones. Sin embargo, una tasa demasiado alta provocará que la información o señal filogenética sea “borrada” al ocurrir múltiples sustituciones en una gran cantidad de sitios.

Los genes mitocondriales han sido muy utilizados para reconstruir filogenias en un gran número de grupos de animales, pero especialmente en vertebrados y artrópodos (Hillis et al. 1996). El genoma mitocondrial de los mamíferos tiene un tamaño que varía entre 12000 y 17000 pares de bases. Contiene las secuencias de 13 genes de proteínas, dos de ARN ribosomal, 22 genes de ARN de transferencia y una región que regula la replicación y la transcripción conocida como región control o *D loop* (Attardi 1985). Los genes mitocondriales más utilizados son los que corresponden al ARN ribosomal 12S y 16S, citocromo oxidasa I y II, citocromo b y la región de control. La estructura y organización del genoma varía muy poco en los mamíferos. La tasa de sustitución sinónima en las mitocondrias de mamíferos ha sido estimada en $5,7 \times 10^{-8}$ sustituciones por sitio sinónimo por año (Brown et al. 1982). Esto es cerca de 10 veces el valor de sustituciones sinónimas en genes nucleares (Li 1997). Aunque la tasa de evolución no sinónima varía considerablemente entre los genes mitocondriales, siempre es mucho más alta que la misma para genes nucleares. La razón de las altas tasas de evolución nucleotídica en los genomas mitocondriales parece ser su alta tasa de mutación, resultado de la elevada tasa de recambio del genoma mitocondrial y de la alta concentración de radicales libres que resultan de las funciones metabólicas llevadas a cabo por la mitocondria (Martin 1995). Debido a su elevada velocidad de sustitución, el ADN mitocondrial resulta muy adecuado para inferir relaciones filogenéticas entre especies con divergencias no mayores a los 15 M.A., así como para estudios de dinámica intraespecífica (Avice 1994). Al no sufrir recombinación y tener herencia uniparental, el ADN mitocondrial no introduce las distorsiones debidas a la recombinación a las que sí están sometidos los estudios que utilizan genes nucleares. Debido a su herencia clonal, y a pesar de que existen hasta cientos de copias de mitocondrias por célula, los genes mitocondriales pueden considerarse ortólogos, es decir, no se provocan discrepancias entre el árbol de genes y el de especies.

En esta tesis se utilizaron las secuencias del gen de la proteína mitocondrial citocromo b, que forma parte del complejo citocromo c oxidasa, el cual es parte de la cadena de transporte de electrones que funciona entre la membrana interna y la matriz mitocondrial. Es una proteína integral de membrana con 8 pasos a través de la membrana interna. En la gran mayoría de los mamíferos su longitud es de 379 aminoácidos, y el gen tiene 1140 pares de bases, dado que, como todos los genes mitocondriales, no tiene intrones. La secuencia del gen citocromo b ha sido muy utilizada en filogenias de roedores, en rangos taxonómicos que van desde la diferenciación intraespecífica y filogeografía (Kim et al. 1998, Conroy and Cook 2000, Erlich et al. 2000, Harris et al. 2000, Demastes et al. 2002) hasta el nivel de superfamilia (Martin et al. 2000) y suborden (Montgelard et al. 2002).

1.4.6. Métodos moleculares de inferencia filogenética

Con el objeto de extraer e interpretar la información evolutiva contenida en los datos de secuencias se han desarrollado (y continúan desarrollándose) una serie de métodos analíticos basados en técnicas estadísticas elaboradas, que toman en cuenta tanto los mecanismos de evolución como las propiedades biológicas de las moléculas en estudio. Los métodos de inferencia filogenética son alimentados por datos, y mediante procedimientos conducidos por un algoritmo matemático se construye una representación gráfica de las relaciones entre los taxones, llamada árbol (figura 8).

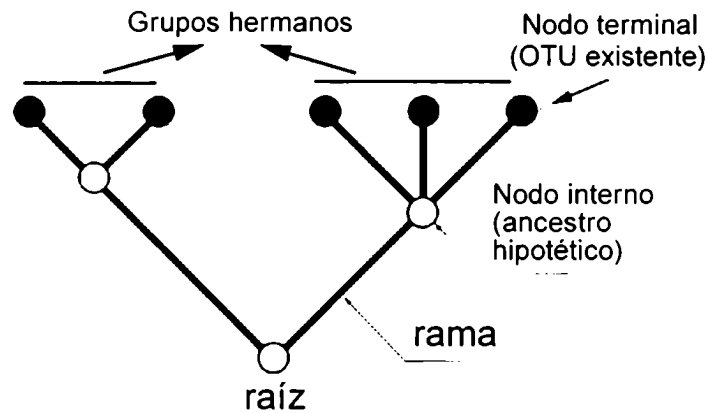


Figura 8: Esquema de un árbol con sus partes constituyentes.

Por supuesto, dada la complejidad de los algoritmos en uso y el tamaño de los conjuntos de datos a utilizar (secuencias de cientos a miles de bases) los métodos están implementados en programas de computación. Ninguno de los métodos conocidos funciona igualmente bien en cualquier circunstancia, por lo que es necesario tener una idea de cuáles son sus limitaciones y ante qué tipo de datos puede presentar dificultades cada uno de ellos. Ninguno de los métodos hace estimación alguna respecto de la ancestralidad de los taxones en estudio, lo que significa que los árboles obtenidos son árboles sin raíz. La raíz otorga al árbol direccionalidad, que permite tener idea de relaciones de ancestralidad entre las OTU. Para enraizar un árbol es necesario introducir en el análisis un grupo externo (*outgroup*). Un grupo externo es un organismo del cual se sabe fehacientemente que ha divergido más tempranamente que los taxones en estudio (el *ingroup*), pero al mismo tiempo debe tener cercana relación con los mismos.

A continuación, se presentará una breve descripción de los tres métodos más utilizados actualmente en los estudios de filogenia molecular: neighbor-joining (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV).

1.4.7. Neighbor-Joining o método del vecino más próximo

Este es un método de construcción de árboles basado en distancias (Saitou and Nei 1987). Esto significa que el algoritmo es alimentado con una matriz de distancias genéticas entre todos los pares posibles de OTUs calculada utilizando algún modelo de evolución (ver ítem 1.4.3), como Kimura 2 parámetros (K2P) u otro. El principio del método consiste en encontrar los vecinos (pares de OTUs simples y compuestas unidas por un nodo) de tal forma que minimicen la longitud total del árbol en términos de las distancias estimadas por el modelo de evolución empleado. Se comienza con una topología en estrella, donde todas las ramas que conducen a OTUs se unen en un único nodo central (figura 9). Luego se conectan dos OTUs cualesquiera y se calcula la nueva longitud total del árbol. El algoritmo ensaya todas las combinaciones posibles y permanece unido aquel par de OTUs que haya minimizado la longitud del árbol. El proceso se repite, esta vez considerando al par de OTUs elegido como una única OTU e incorporando los taxones restantes, originándose en este proceso OTUs compuestas. El método produce un único árbol con ramas de longitud proporcional al número de cambios acumulados en cada rama, dando información sobre el comportamiento de la secuencia respecto de las tasas de evolución en cada rama.

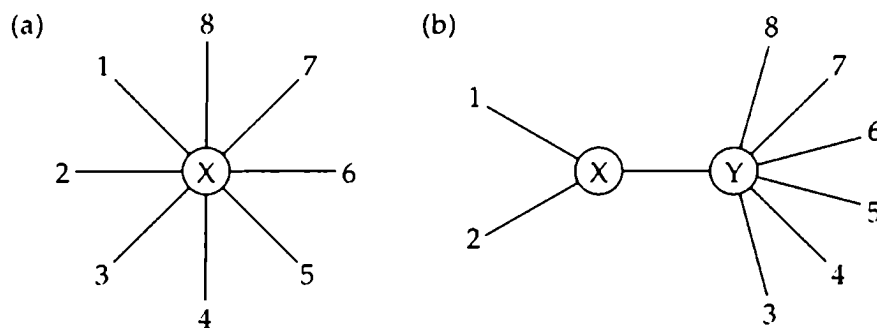


Figura 9: El algoritmo de construcción de árboles Neighbor-joining. (a) Se parte de una topología en estrella (todas las OTUs unidas a un nodo). (b) Se asocian dos OTUs, y si ello resulta en una longitud mínima, se mantiene esa agrupación como una nueva OTU.

Al no incorporar como supuesto la constancia de evolución entre linajes (reloj molecular) como ocurre con métodos de distancia más simples, este método es eficiente cuando se utilizan marcadores que no cumplen la condición del reloj molecular, al mismo tiempo que permite detectar diferencias en la tasa de evolución entre linajes del marcador utilizado. Es un método rápido y requiere poca potencia computacional, una computadora de escritorio puede ser utilizada para construir árboles a partir de, por ejemplo 50 OTUs con secuencias del orden de las mil bases, como las utilizadas en esta tesis, en pocos minutos.

1.4.8. Máxima parsimonia

Los métodos de construcción de árboles por el criterio de máxima parsimonia (MP) se basan en los postulados de la escuela cladista. El cladismo sostiene que la hipótesis filogenética que más probablemente refleje la filogenia real será aquella que se explique con el menor número posible de cambios en los caracteres (Farris 1973). El objetivo, entonces, es buscar el árbol que requiera el menor número de cambios evolutivos (mutaciones en este caso) necesarios para explicar las diferencias observadas entre las OTUs.

De todos los caracteres presentes en el conjunto de datos (posiciones nucleotídicas o aminoacídicas), sólo son consideradas aquellas que proporcionan información evolutiva según el criterio cladista. Dichos caracteres se denominan informativos. Los caracteres informativos son aquellos que presentan variación entre las OTUs, y donde cada variante está presente en al menos dos OTUs. El siguiente paso consiste en determinar el número de pasos mutacionales requeridos para cada una de las topologías posibles. Esta etapa es crítica ya que el número de árboles posibles crece exponencialmente respecto del número de OTUs. La tabla 1 muestra el número de árboles enraizados y no enraizados que pueden construirse con hasta 10 OTUs. Cuando el análisis involucra más de 10 OTUs, la evaluación de todas las topologías posibles puede hacerse impracticable debido a la enorme cantidad de tiempo requerido, aún en computadoras muy poderosas. La solución es provista por un modo de búsqueda conocido como heurístico, que evita explorar todo el espacio de topologías, aunque al costo de no poder asegurar la

obtención del árbol con el menor número de cambios posibles (Hillis et al. 1996). Sin embargo, la probabilidad de no obtener el mejor árbol es aceptablemente baja.

Número de Secuencias	Número de árboles sin raíz
2	1
3	1
4	3
5	15
6	105
7	945
8	10.395
9	135.135
10	2.027.025
22	3×10^{23}
50	3×10^{74}
100	2×10^{182}

Tabla 1: Número de topologías que es posible construir a partir de un determinado número de secuencias. (Tomado de Hillis et al. 1996)

A menudo se obtienen como resultado de la búsqueda más de un árbol de máxima parsimonia. Esto significa que varias topologías diferentes requieren el mismo número de cambios, que a su vez es el mínimo encontrado. En este caso se procede construyendo un árbol consenso superponiendo todas las topologías igualmente parsimoniosas. Aquellos grupos que aparecen iguales en todos los árboles obtenidos permanecerán en el consenso, mientras que las OTUs que cambian de ubicación, formarán nodos multiramificados o politomías en el consenso, como muestra la figura 10. Es importante notar que el método de MP no produce información de longitud de ramas, solamente del orden de ramificación, es decir de la topología.

No todos los caracteres informativos proporcionarán información que favorezca al mismo árbol. Se espera, sin embargo, que la mayoría de ellos determine la representación de la filogenia real, como explicita el principio de máxima parsimonia. Los sitios informativos que favorecen una topología errónea son homoplásicos, y corresponden a casos de similitud por paralelismo o reversión. En secuencias de ADN, los sitios que tienen más probabilidad de presentar homoplasia son aquellos que presentan mayor tasa de sustitución.

De la misma manera, los tipos de cambio que ocurren más fácilmente serán también más propensos a generar homoplasia (Page and Holmes 1998).

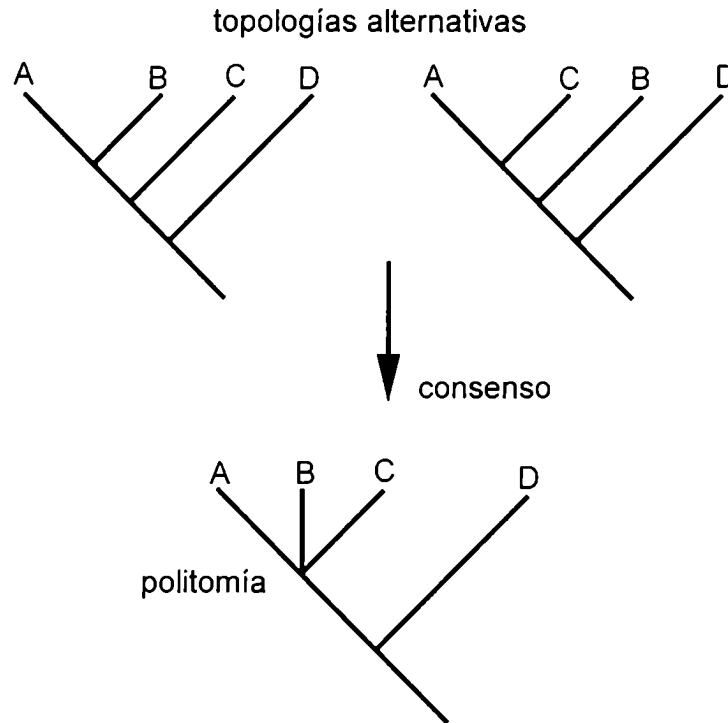


Figura 10: La representación combinada de topologías diferentes (consenso) genera nodos no dicotómicos (politomías).

Teniendo esta información en cuenta, es posible generar esquemas de pesado de caracteres que permiten reducir el efecto negativo de las homoplasias (Hillis et al. 1996). De esta manera, se asigna un peso mayor a las posiciones que presentan menor probabilidad de mutar, ya que es menos probable que presenten homoplasia y más probable que informen relaciones evolutivas. También se suele dar un peso mayor a las transversiones cuando el conjunto de datos presenta una alta relación de transiciones a transversiones, ya que es más probable que las transiciones, al ser más frecuentes, resulten en homoplasias. Es decir, es posible realizar análisis más realistas al tener en cuenta al proceso de evolución molecular.

El método de MP permite calcular índices que dan información sobre la congruencia de los datos entre sí y con la topología. El índice de consistencia

CI se calcula dividiendo el mínimo número de pasos posible para la topología obtenida por el número reconstruido de pasos para dicha topología (Farris 1969). El CI sería 1 si no hubiese homoplasia alguna y 0,5 si la topología requiere el doble de pasos que los mínimos necesarios. El índice de retención (RI) (Farris 1989) tiene el mismo sentido y se calcula dividiendo la diferencia entre el número máximo de pasos posible menos el número calculado, sobre el número máximo menos el número mínimo. Los índices pueden calcularse tanto para el árbol en conjunto, es decir para todos los caracteres, como para cada carácter.

Los esquemas de pesado mencionados arriba, como por ejemplo, asignar un peso mayor a una posición o conjunto de posiciones que evolucionan lentamente, se consideran pesado *a priori* porque el pesado de los caracteres se asigna previamente al análisis y sin que el resultado influya en los valores del pesado. Otra posibilidad es utilizar el pesado *a posteriori* (Williams and Fitch 1989). En este caso, primero se efectúa una corrida del algoritmo sin pesar los caracteres y luego se repite esta vez pesando los caracteres de acuerdo a alguno de los índices mencionados (CI, RI) calculados en la primera corrida para cada carácter. Por ejemplo, un carácter particularmente variable, resultará homoplásico con mayor frecuencia y obtendrá un valor bajo de CI. Si se adjudica como peso el valor de CI a todos los caracteres, dicho carácter tendrá menor peso en el análisis.

1.4.9. Máxima verosimilitud

Este es un método más reciente que los arriba mencionados. Es un enfoque sumamente atractivo por su versatilidad para incorporar modelos explícitos de evolución molecular y también porque permite hacer pruebas estadísticas de las hipótesis evolutivas (Felsenstein 1981; Page and Holmes 1999). El principio de verosimilitud (*likelihood*) sugiere que las relaciones entre los taxones expresadas como una topología particular (el árbol) que hace más probables los datos observados (las secuencias), debe ser la preferida. Dicho de otra forma, cada árbol lleva asociada una verosimilitud **L**, que representa la probabilidad **P** de obtener los datos observados dada una determinada topología.

$$L=P(D|H)$$

donde **D** son los datos, por ejemplo las secuencias nucleotídicas y **H** una topología determinada.

La topología preferida será entonces aquella cuyo valor **L** de verosimilitud sea máximo. El procedimiento requiere tres elementos: un modelo de evolución de los datos, los datos observados y árboles (topologías alternativas). Para llegar al resultado, el método de construcción de árboles debe resolver dos problemas: encontrar las longitudes de ramas que maximicen la verosimilitud de una topología respecto de los datos observados, y encontrar el árbol de mayor verosimilitud entre todos los posibles. Para resolver el primer problema se computan las longitudes de ramas que maximizan **L** para cada sitio de las secuencias, y luego se obtiene el logaritmo de **L** del árbol sumando los logaritmos de los **L** de cada sitio:

$$\ln L = \sum_{i=1}^k \ln L_i$$

donde **k** es el número de sitios en las secuencias.

El algoritmo debe estimar los estados de los caracteres (nucleótidos o aminoácidos) presentes en los nodos internos (ancestrales) para cada sitio tal que maximicen la verosimilitud de las secuencias observadas. La estimación de las longitudes de rama requiere de mucha capacidad computacional ya que se deben evaluar todas las combinaciones posibles de nucleótidos o aminoácidos en todos los nodos ancestrales del árbol. La etapa de búsqueda del árbol de máxima verosimilitud puede resolverse con aproximaciones heurísticas, como en el caso de la búsqueda de los árboles de máxima parsimonia.

Dijimos que el método de MV incorpora modelos de evolución, los cuales pueden llevar parámetros como un cociente de transiciones a transversiones, composición de bases, variación de tasa entre sitios, etcétera (ver ítem 1.4.3). Los valores de tales parámetros pueden provenir de estimaciones previas

realizadas para el mismo marcador en grupos taxonómicos relacionados o bien pueden ser estimados a partir de los datos. La estimación del valor de un parámetro será aquella que maximice la verosimilitud de los datos. La figura 11 ejemplifica la estimación del cociente de transiciones a transversiones. Para distintos valores de los parámetros a estimar, se calcula el $\ln L$ utilizando una topología que no necesariamente será la de $\ln L$ máximo ni obtenida bajo MV, por ejemplo, una topología obtenida por neighbor-joining.

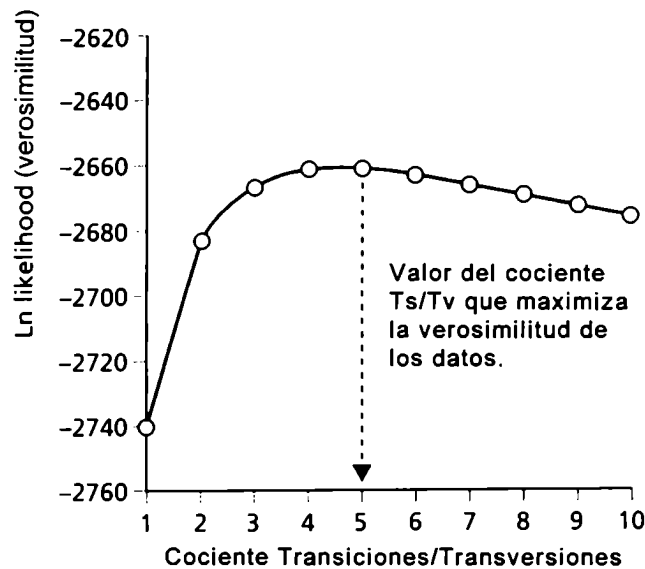


Figura 11: Una manera de estimar el cociente de transiciones (Ts) a transversiones (Tv) mediante el método de MV.

Al igual que en los métodos de distancias, el uso de los parámetros debe ser racional, ya que al incrementarse la cantidad de parámetros se intensifica enormemente la complejidad del análisis y por ende los tiempos de computación requeridos. Además, a mayor número de parámetros aumenta la varianza de la estimación, perdiéndose definición en el análisis.

¿Cómo decidir entonces qué modelo de evolución conviene utilizar? Existen procedimientos que aprovechan una importante propiedad de los métodos de MV, la de poder comparar estadísticamente si dos topologías difieren significativamente en verosimilitud para un conjunto de datos (Hillis et al. 1996; Posada and Crandall 1998; Page and Holmes 1999). El procedimiento básico consiste en calcular el valor de verosimilitud ($\ln L$) de una topología

obtenida por algún método rápido, como neighbor-joining, empleando el modelo más sencillo (Jukes-Cantor). A continuación de repite utilizando el siguiente modelo en orden de complejidad. Si el valor de $\ln L$ es significativamente mayor que el obtenido con el modelo anterior, entonces se avanza repitiendo el cálculo con un modelo más complejo. Cuando se obtiene un valor de $\ln L$ que no difiere significativamente del anterior, entonces se toma al modelo anterior como el modelo más sencillo que se ajusta a los datos y se utiliza para la búsqueda del árbol de máxima verosimilitud.

La principal desventaja de MV es su extremada complejidad de análisis, haciendo muy largos los tiempos de análisis para conjuntos de datos no muy extensos, comparados con aquellos que pueden manejarse con los otros dos métodos.

1.4.10. Calidad de los datos y confianza

Dada la naturaleza estocástica del proceso de evolución de las secuencias, es probable que, en un conjunto de secuencias, una parte importante de la variación sea "ruido filogenético", es decir, que no refleje las relaciones evolutivas. Al mismo tiempo, se dice que los datos son robustos cuando el número de caracteres que provee información filogenética es grande, lo cual reduce la posibilidad de errores de muestreo (Hillis et al. 1996). En este caso, el error de muestreo proviene de la incorporación de caracteres homoplásicos al análisis. Si por azar la muestra contiene una gran proporción de caracteres homoplásicos, las hipótesis filogenéticas obtenidas a partir de ella serán probablemente incorrectas.

El "ruido" en un conjunto de datos aparece cuando la variación aleatoria es importante respecto de la que refleja las relaciones históricas de los organismos en estudio. En este caso se habla de falta de señal filogenética en los datos. Hillis y Huelsenbeck (1992) elaboraron un método para evaluar la presencia de señal filogenética en los datos a través de la estimación del estadístico g , el cual describe la distribución de las longitudes en número de pasos de un gran número de árboles (1.000 ó 10.000, por ejemplo) arbitrariamente construidos según el criterio de parsimonia. Ellos mostraron que los datos con fuerte señal filogenética producen una distribución asimétrica

de los árboles ordenados en forma creciente por la suma de todos los cambios. En ese caso, se observan pocos árboles de longitudes cortas y muchos árboles de longitudes más largas. En contraste, un conjunto de secuencias aleatorias, produce una distribución simétrica, con gran cantidad de árboles de longitudes intermedias. Un valor de $g=0$ corresponde a una distribución perfectamente asimétrica, mientras que los valores negativos de g corresponden a distribuciones favorecidas por datos con fuerte señal filogenética.

Cuando el número de caracteres que favorecen la filogenia real es pequeño, puede llevar a obtener topologías que no están fuertemente respaldadas por los datos, debido al error de muestreo. La forma de evaluar esta situación es a través del *bootstrap* (Felsenstein 1985a; Hillis et al. 1996). Esta técnica puede utilizarse con cualquiera de los métodos de inferencia filogenética y consiste en generar muchos conjuntos de datos, donde cada uno es producto de haber eliminado un número pequeño de sitios y duplicado otros tantos, (ambos al azar) de forma tal que la cantidad de sitios queda constante. Luego se construye el o los árboles a partir de cada pseudoréplica y se obtiene un consenso de todos los árboles. Cada nodo en el consenso llevará asociado un índice de *bootstrap*, que no es más que el porcentaje de veces que ese nodo está representado en los árboles obtenidos a partir de cada pseudoréplica. Así, un nodo que no se vio afectado por el "barajado" de sitios en las secuencias aparecerá en todos los árboles y se le asignará un 100% de *bootstrap*, mientras que un nodo que aparece en la mitad de los árboles tendrá un 50%, indicando que ese agrupamiento no está respaldado por una gran cantidad de sitios en las secuencias, respecto de sitios que no lo favorecen. Este método permite detectar agrupamientos de OTUs que no están soportadas por un número importante de caracteres, es decir que son fuertemente dependientes del muestreo de algunos datos en particular.

En suma, cada uno de los diferentes métodos de inferencia filogenética tiene fortalezas y debilidades que dependen fuertemente de las características del conjunto de datos (Hillis and Huelsenbeck 1995; Hillis et al. 1996). Más allá de que algunos métodos pueden comportarse mejor que otros en muchas situaciones, la clave del éxito en la reconstrucción de la filogenia reside en la calidad de los datos. Por eso es aconsejable, en la medida de lo posible, utilizar

varios métodos y analizar los resultados en conjunto, tomando como medida de soporte no sólo el valor de *bootstrap* sino la congruencia entre los árboles producidos por los distintos métodos.

1.4.11. Tiempo de divergencia

Como se ha mencionado, una secuencia nucleotídica que acumula cambios con una tasa regular puede funcionar como reloj molecular mientras la relación entre la divergencia y el tiempo sea lineal. El uso de la hipótesis del reloj molecular para estimar tiempos de divergencia ha producido mucha controversia desde que fue propuesto por primera vez (Margoliash 1963; Zuckerkandl and Pauling 1965). Hoy se acepta que diferentes genomas dentro de un organismo (por ejemplo, mitocondrial y nuclear), genes dentro de organismos y taxones o clados de organismos, evolucionan a diferentes tasas (Li 1997; Avise 1994; Page and Holmes 1999). Hillis y col. (1996) sugieren que, incluso para un reloj molecular perfecto que sigue un proceso de Poisson, la variación estocástica vuelve al reloj muy impreciso para estimar tiempos de divergencia. No obstante, tras muchos estudios tendientes a determinar la factibilidad de la hipótesis, existen propuestas sobre la existencia de relojes moleculares "locales", lo que significa que la constancia de la tasa de evolución puede mantenerse dentro de un rango taxonómico restringido y para un tipo de genoma y secuencia en particular (Bailey et al. 1991; O'hUigin and Li 1992; Schneider et al. 1993; Easteal et al. 1995; Kishino et al. 2001).

Para utilizar el concepto del reloj molecular en la estimación de tiempos de divergencia es necesario, por un lado, emplear métodos filogenéticos que produzcan árboles con información sobre las longitudes de las ramas (métodos de distancia y de máxima verosimilitud) y por el otro, información que relacione por lo menos un nodo del árbol con una escala temporal absoluta. Para ello, es imprescindible que al menos uno de los taxones en estudio haya sido confiablemente datado. Si eso es posible, la antigüedad de las divergencias podrá extrapolarse a partir de la divergencia genética. Si el gen en cuestión se comporta como un perfecto reloj, entonces bastará con construir un sencillo árbol con un procedimiento que produzca ramas proporcionales al tiempo, como UPGMA (Sneath and Sokal 1973), ubicar en la escala la fecha de algún

ancestro y calcular las restantes fechas por extrapolación. Sin embargo, el método de UPGMA es muy sensible a variaciones en las tasas de evolución entre ramas y no funciona bien cuando se viola el supuesto del reloj molecular (Hillis et al. 1996), aunque en algunos casos es posible obtener buenas estimaciones aproximadas de los tiempos de divergencia entre especies (Nei et al. 2001).

El cálculo del número de sustituciones entre organismos de una filogenia provee información relativa de la divergencia entre ellos. Es posible, sin embargo, asignar datos absolutos a uno o más nodos de la filogenia a fin de establecer una cronología de tiempos reales. Este procedimiento se denomina calibración. La calibración sólo es posible cuando existen datos confiables sobre la edad de la divergencia entre especies o grupos. Dichos datos pueden provenir del registro fósil (por ejemplo, cuando un fósil es el ancestro común más reciente de dos especies actuales) o de información biogeográfica (por ejemplo, si se conoce la antigüedad de una barrera que generó el aislamiento a partir del cual divergieron dos grupos). Así, la existencia de un fósil que se piensa que pertenece a un determinado grupo taxonómico (por ejemplo a un género) determina la antigüedad mínima de ese género. Si se descubre un fósil más antiguo, cuyas características determinan su asignación al mismo género, entonces la antigüedad mínima conocida de dicho género será ahora mayor. Por otro lado, el fósil más reciente conocido, que resulta ancestral a dos especies actuales, determina una edad máxima para la divergencia entre ellas. Como es de esperar, la validez de las estimaciones realizadas sobre la base de datos moleculares está absolutamente sujeta a las fluctuaciones de las estimaciones paleontológicas debidas tanto a nuevos descubrimientos que proporcionan fechas diferentes de las que se asumían hasta entonces, como a la reevaluación del material existente, produciendo también cambios en las estimaciones previas o alterando los límites de confianza de las mismas.

Como se desprende de lo discutido al inicio de esta sección, una confiable estimación de tiempos de divergencia requiere el uso de un conjunto de datos que se comporte como reloj molecular. Varias metodologías han sido propuestas para evaluar la constancia de evolución en un conjunto de secuencias. La más simple es el test de tasas relativas, en el cual se estima la

diferencia en el número de sustituciones entre dos taxones cercanamente relacionados en comparación a un tercero, más lejano (Page and Holmes 1999). Takezaki y col. (1995) desarrollaron un método para estimar tiempos de divergencia en filogenias moleculares bajo el supuesto del reloj molecular. El procedimiento consiste en evaluar primero los datos, para verificar si cumple la constancia de velocidades de evolución, mediante un análisis derivado del test de tasas relativas llamado test de dos grupos (*two cluster test*). Las secuencias que no satisfacen la hipótesis del reloj a un alto nivel de significancia (1%) son eliminadas del análisis. Luego se construye un "árbol linealizado", cuyas ramas son proporcionales al tiempo transcurrido, sobre el cual se estiman los tiempos de divergencia a partir de la inclusión de un dato externo que aporte una fecha absoluta. El método mostró ser eficaz aún cuando secuencias que diferían en tasa a un nivel de significación menor (5%) eran incluidas (Russo et al. 1995, Takezaki et al. 1995). Este método fue utilizado para estimar los tiempos de divergencia de los principales grupos de especies en los drosofilidos a partir de la secuencia del gen Adh (Russo et al. 1995), Hedges y col. (1996) lo utilizó para reconstruir la cronología de la diversificación de los órdenes de mamíferos y Kooistra y Medlin (1996) lo usaron para reconstruir la edad de las diatomeas con la secuencia de ARN ribosomal.

Métodos más recientes trabajan incorporando la variación de tasas directamente en el procedimiento de inferencia, es decir, dejan de lado el supuesto de constancia de tasas o reloj molecular. Sanderson (1997) elaboró un método llamado "no paramétrico", que no asume constancias de tasas locales ni globales, y tiene la propiedad adicional de permitir la evolución de las tasas en el tiempo. Este trabajo fue seguido por estimaciones basadas en modelos de evolución de la tasa de evolución molecular (Thorne et al. 1998; Huelsenbeck et al. 2000; Korber et al. 2000; Cutler 2000; Kishino et al. 2001), aunque ninguno de ellos ha sido por el momento implementado en programas de uso accesible.

1.4.12. Inferencia de estados ancestrales

La comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso evolutivo se hace muchas veces difícil, sino imposible, al desconocer las características

de los organismos que antecieron a los que existen hoy en día. A pesar de que el registro fósil provee valiosa y en algunos casos abundante información sobre algunas características de ciertos organismos y de las transformaciones que ocurrieron entre ancestros y descendientes, no existen fósiles adecuados para el estudio de la evolución de muchos caracteres. Esto es especialmente cierto para el caso de los caracteres moleculares, los cuales difícilmente pueden ser observados en organismos fósiles, salvo los fósiles moleculares, sólo hallados en contados casos (DeSalle 1994).

Para superar esta dificultad, es posible utilizar técnicas analíticas para inferir los estados de los caracteres en los ancestros de un grupo de organismos, dada una filogenia. Tradicionalmente se ha empleado el criterio de parsimonia para inferir los estados en los nodos internos de una topología observando los estados presentes en los nodos terminales (Maddison and Maddison 1992; Schluter et al. 1997). El uso de los métodos de MP para la inferencia de caracteres ancestrales está favorecido por el carácter atractivo e intuitivo de la reconstrucción por parsimonia, además de estar implementados en programas de computación de fácil uso como MacClade (Maddison and Maddison 1992). La inferencia de estados ancestrales por máxima parsimonia ha sido habitualmente aplicada al estudio de caracteres morfológicos (Basolo 1990), comportamentales (Schluter et al. 1997) y ecológicos (Losos 1992). Recientemente se ha comenzado a aplicar este tipo de análisis a la reconstrucción de secuencias de ADN y proteínas. Jermann y sus colaboradores (1995) han utilizado este método para reconstruir la secuencia aminoacídica ancestral de la superfamilia de la ribonucleasa de los artiodáctilos. A partir de la secuencia ancestral inferida por el criterio de MP, los autores sintetizaron una proteína que mostró *in vitro* propiedades y función similares a las esperadas. El método de MV también puede utilizarse para reconstruir secuencias ancestrales (Yang et al. 1995). Fuera de la reconstrucción de secuencias, no se han realizado estudios de estados ancestrales en otros tipos de caracteres moleculares, y en todos los casos se trata de caracteres discretos, como lo son las secuencias y el orden de genes en genomas mitocondriales (Blanchette et al. 1999).

Recientemente han sido desarrollados nuevos métodos para la reconstrucción de estados ancestrales basados en algoritmos de máxima verosimilitud, tanto para caracteres discretos (Schluter 1995) como continuos (Schluter et al. 1997). Una característica importante de los métodos basados en MV es que proveen la oportunidad de cuantificar la incerteza, a diferencia de la reconstrucción por MP. Otra ventaja del método de MV es que considera las longitudes de las ramas, agregando una importante componente temporal ausente en el método de parsimonia. De esta manera, se tiene una mejor estimación de la probabilidad de que el estado de un carácter haya cambiado a lo largo de una rama. Una limitación de este método reside en asumir que la tasa de cambio del carácter en cuestión es constante a lo largo de la filogenia, aunque la incorporación de tasas variables sería problemática, ya que se deberán estimar muchos parámetros con pocos datos (Cunningham et al. 1998).

Schluter y col. (1997) utilizaron el método de reconstrucción de caracteres continuos por MV para analizar casos que ya habían sido estudiados con el método de MP. En uno de ellos, Losos (1992) midió algunos rasgos morfológicos en los lagartos *Anolis* de las Antillas que permitían asignar las distintas especies a diferentes ecotipos y clasificarlos como especialistas o generalistas. A través de la reconstrucción por MP, hipotetizó que el ancestro del grupo era generalista de acuerdo a los valores que obtuvo en su inferencia. Schluter y col. (1997) cuantificaron la incerteza de la estimación de los rasgos morfológicos y resultó que los límites de la misma (con un 95% de confianza) eran muy amplios, con lo que la asignación de un ecotipo al ancestro se hacía imprecisa. Las estimaciones de caracteres continuos en los ancestros serían adecuadas si el grado de incerteza de las estimaciones es bajo comparado con el rango de variación de los valores en las especies existentes (Schluter et al. 1997).

1.5. ADN repetido

Los genomas eucariotas contienen mucho más ADN que el directamente involucrado en las secuencias regulatorias y codificantes de proteínas y los diferentes ARNs. El ADN "extra" está compuesto principalmente por secuencias

de ADN no codificante, repetido desde cientos a miles y millones de veces. La presencia de este tipo de secuencias en los genomas, su abundancia y grado de variación entre grupos de organismos, permitió dar una explicación al problema conocido como "paradoja del valor C". Se denomina valor C al contenido de ADN por genoma haploide. Los eucariotas presentan una enorme variación en el contenido de ADN: el genoma eucariota más grande es unas 80.000 veces mayor que el más pequeño. Sin embargo, dicha variación no guarda correlación con el grado de complejidad del organismo o el número de genes. Por ejemplo, varios eucariotas unicelulares poseen mucho más ADN que los mamíferos, mientras que organismos que parecen similares en complejidad (por ejemplo, moscas o saltamontes y salamandras o sapos) presentan enormes diferencias en su valor C (tabla 2). Esta falta de correspondencia entre contenido de ADN y la presunta cantidad de información genética contenida en los genomas es conocida como paradoja del valor C (Thomas 1971; Cavalier-Smith 1985).

Al conocerse en mayor detalle la estructura de los genomas, se hizo evidente que el ADN con información codificante y regulatoria es minoritario, mientras que el ADN no codificante, cuya cantidad varía entre 3 millones y 100.000 millones de pares de bases, constituye entre un 30% y casi el 100% del genoma (Cavalier-Smith 1985). El ADN repetido consiste en secuencias de longitud y composición variada que aparecen desde unas pocas veces hasta varios millones en el genoma, y pueden disponerse en tándem o en forma dispersa.

Rango de valor C para varios grupos de organismos eucariotas	
Grupo	Rango de valor C (kb)
Protistas	23.500 - 686.000.000
Hongos	8.800 - 1.470.000
Animales	49.000 - 139.000.000
Moluscos	421.000 - 5.290.000
Insectos	98.000 - 7.350.000
Peces óseos	382.000 - 139.000.000
Anfibios	931.000 - 84.300.000
Mamíferos	1.420.000 - 5.680.000
Algas	80.000 - 30.000.000
Angiospermas	50.000 - 125.000.000

Tabla 2: Rango del valor C en kilobases en distintos grupos de organismos eucariotas

Una explicación satisfactoria de la paradoja del valor C y de la estructura del genoma eucariota requiere descubrir los mecanismos responsables del mantenimiento a largo plazo de las vastas cantidades del aparentemente superfluo ADN no génico. Esta cuestión está a su vez íntimamente ligada con la pregunta acerca de cuál podría ser la función, si es que la tiene, de este tipo de ADN. Durante décadas se han propuesto numerosas explicaciones evolutivas para este fenómeno.

Una de las posturas extremas plantea que el ADN no codificante posee importantes funciones regulatorias, por lo que su eliminación resultaría deletérea para las células (Zuckerandl 1976). Según esta postura, el exceso de ADN sólo es aparente, ya que todo el ADN sería indirectamente funcional.

En el otro extremo, Ohno (1972) propone que el ADN no génico es inútil, una suerte de chatarra que es llevada pasivamente por el cromosoma sólo por su ligamiento físico con los genes funcionales. Al no afectar a la adecuación darwiniana del organismo, puede ser pasado indefinidamente de generación en generación. Una variante de esta última idea es que el ADN no codificante es "parásito" o "egoísta" (Orgel and Crick 1980; Doolittle and Sapienza 1980), que es activamente mantenido por su eficiente capacidad para replicarse y propagarse en el genoma.

Varios autores suponen que al menos gran parte del ADN no codificante es egoísta o chatarra, ya que es posible eliminar en forma experimental ciertas porciones sin aparentemente afectar el fenotipo (ver revisión de John and Miklos 1988). Es común además observar grandes variaciones en la cantidad de ADN repetido aún entre especies muy cercanas, sin que pueda adjudicarse a ello algún efecto biológico (Rees et al. 1982). La variación interespecífica en contenido de ADN repetido puede generar polimorfismos heterocromáticos. Por ejemplo, en el grillo *Atractomorpha similis* todos los miembros de su conjunto haploide pueden estar afectados por estos polimorfismos, habiéndose detectado más de 250 citotipos (John and King 1983). Desde el punto de vista evolutivo, el ADN no codificante podría participar en 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* podría ser una de las causas de la perpetuación de las secuencias repetidas en el genoma eucariota.

Existen, sin embargo, algunas funciones descritas del ADN no codificante. Los telómeros están formados por repeticiones de secuencias cuya función es proteger los extremos de los cromosomas de la degradación exonucleolítica (Zakian 1989). La cromatina centromérica está también compuesta por ADN repetido con una estructura particular y conservada, que se distingue del resto de la cromatina y heterocromatina por su particular condensación (Gilbert and Allan 2001; Blower et al. 2002). Los ADN repetidos centroméricos son capaces de unir proteínas histónicas específicas del centrómero, como CENP-A (o CenH3s en general, ya que son similares a la Histona 3) y son de vital importancia para la actividad cinética de los cromosomas en la segregación meiótica y mitótica (Bernard et al. 2001). Debido a su particular estructura, las regiones centroméricas han sido difíciles de estudiar con los métodos habituales de clonado, mapeo y secuenciación, constituyendo regiones "oscuras" para los proyectos de secuenciación de genomas. Ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas de mapeo de alta resolución que permitieron comenzar a analizar en detalle el ADN centromérico, y revelar su particular estructura (Schueler et al. 2001; Henikoff 2002).

De acuerdo a su organización, la cual es a su vez una consecuencia de sus modos de amplificación y dispersión, el ADN repetido se clasifica, según los esquemas corrientes, en dos clases principales: ADN repetido disperso y ADN repetido en tándem.

1.5.1. ADN repetido disperso

A esta clase pertenecen los elementos repetidos que presentan secuencias de estructura definida y que se encuentran dispersas usualmente en intrones, regiones flanqueantes y regiones intergénicas. Debido a su modo de dispersión se los denomina también elementos transponibles (ET), o elementos genéticos móviles a causa de su habilidad para “saltar” a diferentes localizaciones en el genoma mediante distintos mecanismos conocidos como transposición.

Un primer análisis permite distinguir dos tipos principales de ET: retrotransposones o elementos de clase I, que transponen a través de un intermediario de ARN replicando una copia del elemento en cada evento (transposición replicativa) y los transposones o elementos de clase II, que transponen por escisión desde su localización genómica y posterior integración en otro sitio, no existiendo intermediarios de replicación, sin que haya aumento en el número de copias (transposición conservativa) (Capy et al. 1997).

Entre los ET de clase I pueden reconocerse dos grandes grupos. Algunos retrotransposones (o retroelementos) derivan de los retrovirus y tienen en común la presencia de típicos LTR (*long terminal repeats*) característicos de los genomas retrovirales, por lo que son conocidos como retrotransposones con LTR (Xiong and Eickbush 1990). Los retroelementos con LTR son similares a los genomas retrovirales pero no son infecciosos por sí mismos. La diferencia básica entre un retrovirus y un retroelemento con LTR es que el último carece del gen de la glicoproteína de envoltura. Esta crucial diferencia impide la formación de una partícula viral extracelular infecciosa, dejando al retrotransposón encerrado en la célula (Garfinkel et al. 1989; Löwer et al. 1996). Los genomas de los primates poseen familias de retroelementos de este tipo conocidos como ERV (*endogenous retrovirus*). Los ERV presentes en humanos (HERV, por *human endogenous retrovirus*) representan probablemente huellas de antiguas infecciones retrovirales a tejidos germinales y ocupan alrededor del 1% del genoma humano (Bock and Stoye 2000; Sverdlov 2000). Se postula que estos elementos jugaron un rol importante en la evolución del genoma de los homínidos. La presencia de estos elementos en los ancestros de humanos y simios podrían haber conferido resistencia antiviral a sus portadores, constituyendo un importante factor adaptativo. (Best et al. 1997; Svoboda 1998). Retroelementos con estructura retroviral también aparecen en roedores, como por ejemplo el elemento *mys* en sigmodontinos (Cantrell et al. 2001), MuERV-C (*murine endogenous retrovirus type C*) en ratón (Zhao et al. 1999) y el elemento IAP (*intracisternal A-particle*) en hámster (Meyer et al. 1996).

Otras dos familias de retroelementos con LTR son los elementos *gypsy* y *Ty1-copia*. *Ty1-copia* y *gypsy* son conocidos en plantas, hongos y animales,

sugiriendo que los retrotransposones constituyen un linaje muy antiguo (Capy et al. 1997). La distinción entre ellos se basa en el arreglo interno de los genes y en que *gypsy* contiene un marco de lectura abierto que codifica genes de envoltura que en algunos casos mostró ser funcional, otorgando propiedades infectivas al elemento y convirtiéndolo en el primer retrovirus descrito en invertebrados (Bucheton 1995). Además de participar en el mecanismo de transposición, los LTR contienen secuencias como promotores y *enhancers* con capacidad de conducir la expresión de los genes propios del elemento y de genes vecinos al sitio de integración. Por ejemplo, Mager y col. (1999) encontraron dos genes humanos de función aún desconocida que utilizan señales de poliadenilación presentes en los LTR del retrovirus endógeno HERV-H. De la misma manera, la inserción de un elemento *gypsy* río arriba del gen *yellow* en *Drosophila* causa su silenciamiento en algunos tipos celulares (Pelisson et al. 1994). Existen alelos del gen *waxy* de maíz cuyos patrones de *splicing* alternativo están alterados por la presencia de un retrotransposón en uno de sus intrones (Varagona et al. 1992). Por último, un caso conocido en detalle y muy ejemplificador es el de los genes de amilasa. Todos los mamíferos producen amilasa en el páncreas, pero los primates, roedores y lagomorfos además la producen en la saliva por expresión de tres de los cinco genes en la glándula parótida (Samuelson et al. 1988). Los genes de expresión salival llevan insertado en su extremo 5' un retrovirus que aporta la regulación para la expresión específica en parótida (Ting et al. 1992).

El otro grupo de retroelementos carece de LTR, por lo que son conocidos como retroelementos no virales, o retrotransposones sin LTR (Capy et al. 1997). Dentro de este variado grupo de elementos, que comparten el hecho de provenir de la retrotranscripción de ARNs citoplasmáticos, existen dos subgrupos que pueden alcanzar un alto grado de repetición: SINEs y LINEs, por *short* y *long interspersed nuclear sequences*. Las SINEs son secuencias de entre 75 y 500 nucleótidos de longitud, producto de la copia reversa de transcriptos generados por la ARN Polimerasa III (Capy et al. 1997). Contienen un promotor para la POL III, un extremo 3' rico en adeninas y repeticiones flanqueantes directas producidas por duplicación del sitio blanco de integración (Li 1997). Se conocen diferentes familias de SINE. La más

conocida es la familia *Alu*, presente en humanos y otros primates (Schmid and Jelinek 1987). La secuencia nucleotídica de estos elementos tiene similitud con parte del gen del ARN 7SL, un ARN citoplasmático componente de la partícula de reconocimiento de la señal de translocación al retículo endoplásmico (Ullu and Tschudi 1984). Para explicar la abundancia de las secuencias *Alu*, Jagadeeswaran y col. (1981) y Van Arsdell y col. (1981) propusieron un modelo por el cual la secuencia *Alu* es transcripta a un ARN por la ARN polimerasa III, seguida de la transcripción reversa a ADN y posterior integración al genoma. Esto genera un proceso de cascada, ya que con cada integración hay nuevos sustratos para generar más copias. Se calcula que en el genoma humano existen más de 500.000 copias de la secuencia *Alu* (Capy et al. 1997).

Los elementos LINE fueron caracterizados originalmente en humanos, primates y roedores, aunque se encontró que existen también en insectos, protistas, hongos y plantas (Capy et al. 1997). La familia presente en humanos es conocida como L1 y conforma al menos un 15% del genoma. Los LINE tienen entre 5 y 8 kilobases de longitud, aunque son frecuentes las versiones truncadas (Li 1997). A diferencia de los SINEs, los LINEs contienen marcos de lectura abiertos que codifican alguna de las enzimas requeridas para su transposición, tales como la transcriptasa reversa y la RNasa H. El mecanismo de transposición comienza al transcribirse en un intermediario de ARN por acción de la ARN Polimerasa II utilizando promotores internos. La transcriptasa reversa reconoce el extremo 3' del transcripto, iniciándose la transcripción reversa e integración al mismo tiempo, utilizando como templado ADN genómico cortado (Luan et al. 1993).

En conjunto, los ETs representan un importante factor que participa de la evolución genómica de los eucariotas. El significado evolutivo de los ETs reside en su capacidad de producir mutaciones al integrarse en sitios aleatorios del genoma (McDonald 1995, Capy et al. 1997). La integración de estos elementos genéticos puede producir cambios en los patrones de expresión de los genes del portador. Las secuencias regulatorias que poseen algunos ETs son capaces de conducir la expresión de los genes cercanos al lugar de integración, provocando cambios en nivel de expresión, temporales y/o en

especificidad de tejido (ver ejemplos citados más arriba y referencias en Stravenhagen and Robins 1988; McDonald 1995; Kidwell and Lisch 1997).

Como consecuencia de los mecanismos involucrados en la transposición, los ETs podrían también estar involucrados en translocaciones, inversiones, y otros cambios estructurales que involucran ruptura del ADN (Evgen'ev et al. 2000). Por ejemplo, una copia del elemento de clase II *hobo* ubicado en un intrón del locus *Notch* de *Drosophila melanogaster* está implicada en la ocurrencia de una inversión que involucra dicho locus (Eggleston et al. 1996). Durante la evolución de los homínidos, posteriormente a la divergencia entre los humanos y chimpancés ocurrió una inversión en el cromosoma Y en el linaje de *Homo*. Dicha inversión ocurrió por recombinación entre dos unidades del elemento LINE L1 (Schwartz et al. 1998). Rearreglos cromosómicos inducidos por ETs han sido también reportados en *D. buzzatii* (Cáceres et al. 1999) y en el grupo *virilis* de *Drosophila*. En una línea de investigación similar, Kim y col. (1998) proponen que familias de retroelementos Ty han tenido gran influencia en la organización del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5.2. ADN repetido en tándem

Este tipo de secuencias está presente en virtualmente todos los eucariotas, y se encuentran usualmente en mayor número de copias que los ETs. No se caracterizan por poseer una secuencia nucleotídica particular ni por la organización interna de la secuencia básica, como en el caso de las SINE y LINE, y no poseen marcos de lectura abiertos. Se reconocen tres clases, que se diferencian en longitud, localización y otras propiedades: microsatélites, minisatélites y satélites (Jeffreys et al. 1991).

Los microsatélites son arreglos de repeticiones nucleotídicas cortas (de 2 a 5 pares de bases) que se localizan en regiones eucromáticas. Los números de copias presentan considerable variación a nivel poblacional, con tamaños medios de los arreglos del orden de 100 repeticiones. Por ejemplo, en el genoma humano existen aproximadamente 50.000 *loci* de repeticiones del dinucleótido CA (Hudson et al. 1992) y unos 300.000 arreglos de trinucleótidos y tetranucleótidos (Beckman and Weber 1992).

Los minisatélites presentan arreglos de repeticiones de longitudes del orden de la decena, mientras que el tamaño de los arreglos varía entre 0,5 y 30 kilobases. Se encuentran también en regiones eucromáticas y subteloméricas, y son variables en cuanto a la longitud de los arreglos (Charlesworth et al. 1994).

Una región de repeticiones en tándem que muestra variación en el número de repeticiones es conocida como locus VNTR (*variable number tandem repeat*) o "repeticiones en tándem de número variable". Muchos loci VNTR presentan un gran número de alelos (cada alelo se caracteriza por el número de repeticiones), y son altamente polimórficos (Awise 1994). El elevado grado de variación en el número de repeticiones presentes entre individuos ha sido aprovechado por la biología, la medicina y la ciencia forense. Dado el gran número de alelos en cada locus VNTR, una colección de loci puede proporcionar un número enorme de combinaciones posibles de alelos, lo que hace al análisis de VNTR una poderosa herramienta para estudios de identidad y parentesco con aplicaciones en genética y ecología de poblaciones, evolución, medicina de enfermedades genéticas y medicina forense (Awise 1994; Caetano-Anollés and Gresshof 1998).

1.6. ADN satélite

El tercer tipo de repeticiones en tándem consiste en secuencias de más de 100 pares de bases de longitud, usualmente de hasta 1000 ó 2000, aunque un satélite presente en el genoma del ciervo muntjac tiene una unidad monomérica de más de 40 kilobases (Benedum et al. 1986). La mayoría de los satélites descritos tienen longitudes de entre 150 y 400 pares de bases, mientras que los arreglos contienen varios miles de repeticiones. Estos largos arreglos forman conspicuos bloques de cromatina, principalmente en regiones centroméricas, pericentroméricas y teloméricas de los cromosomas que permanece en un estado diferencial de condensación conocido como heterocromatina (John 1988). Los ADNs satélites son los elementos repetidos con números de copia más altos, alcanzando habitualmente el orden del millón, por ejemplo 6 millones en algunas especies de *Ctenomys* (esta tesis) y 10

millones (Nabeyama et al. 2000). Es por ello que comúnmente se refiere al ADN satélite como ADN altamente repetido.

Una familia de satélites se reconoce por presentar cierta similitud de secuencia y longitud. A pesar de que todos los eucariotas contienen, en mayor o menor medida, bloques de heterocromatina, las secuencias que los componen no están en absoluto conservadas. Una familia de satélite en particular está presente en un rango taxonómico más bien estrecho, siendo muchas veces especie-específicos, sugiriendo que los ADN satélites de los eucariotas se originaron a partir de diferentes secuencias.

Existen numerosos patrones de distribución de las familias de ADN satélites, tanto al nivel de un genoma como interespecífico. Como se mencionó, existen familias que se conocen en una sola especie, aunque muchas veces esto se debe a que las técnicas que se emplearon originalmente no eran capaces de detectar variantes que estaban presentes en bajo número de copias y que sí lo fueron al utilizar métodos más sensibles, como la PCR (King et al. 1995). Se ha encontrado además, que diferentes familias de ADN satélites coexisten en un mismo genoma. En algunos casos, dichas familias están claramente relacionadas evolutivamente entre sí, pudiendo a veces reconstruirse la evolución de la familia dentro del linaje de los organismos portadores (Nijman and Lenstra 2001).

1.6.1. Origen y amplificación del ADN satélite

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el origen, mantenimiento y amplificación de las secuencias repetidas, aunque las fuerzas que gobiernan la dinámica del ADN satélite son todavía poco comprendidas, principalmente porque el gran tamaño de los bloques de ADN satélite dificulta el análisis experimental directo. Se piensa que el proceso que conduce a la generación de los ADN satélites, minisatélites y microsatélites comienza con la aparición de pequeñas repeticiones que exhiben eficientes propiedades replicativas "egoístas", es decir, independientes del efecto que su replicación pueda tener sobre el portador, obedeciendo luego a mecanismos auto-organizativos que desarrollan periodicidades mayores, no restringidas por la selección (Hancock 1996).

El mecanismo de deslizamiento de la replicación (*replication slippage*) consiste en la generación de repeticiones por deslizamiento de las hebras complementarias del ADN durante la replicación (Levinson and Gutman 1987). Este mecanismo parece ser importante para la formación inicial de pequeñas repeticiones, que podrían ser luego un sustrato para otros mecanismos capaces de producir repeticiones mayores (Charlesworth et al. 1994). Una vez que se ha alcanzado un cierto grado de repetición, el deslizamiento puede ocurrir incluso entre unidades ubicadas en distintas moléculas de ADN, seguidos por un intercambio mediado por recombinación. Cuando esto ocurre en el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis se habla de entrecruzamiento desigual (*unequal crossing-over*), pero algo similar puede ocurrir durante la mitosis, donde se habla de entrecruzamiento desigual entre cromátidas hermanas, aunque esto último se observa con menor frecuencia (Petes et al. 1991).

Se ha señalado que los procesos de deslizamiento en la replicación y entrecruzamiento desigual tienden tanto a remover repeticiones en tándem como a incrementar el número de copias, de tal forma que estos mecanismos no podrían explicar la dinámica de cambio de número de copias de un ADN repetido en una particular localización genómica (Walsh 1987). La conspicua existencia de grandes bloques localizados de ADN satélite ha llevado a postular la amplificación de ADN, concepto que se refiere a cualquier mecanismo que produzca un gran aumento en el contenido de ADN de un organismo (Li 1997). Uno de los métodos de amplificación que más posiblemente actúen en la formación del ADN satélite es el de replicación por círculo rodante (Walsh 1987). Este modelo 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 (Figura 12). Estas estructuras se integrarían luego por recombinación en sitios homólogos o, eventualmente, con menor probabilidad en sitios no homólogos. El ADN satélite de los roedores tuco-tucos representa un ejemplo donde el mecanismo preponderante de amplificación ha sido el de círculo rodante (Rossi et al. 1990). Este modelo puede también explicar la ocurrencia de rápidas

disminuciones en el número de copias en el caso en que la integración de los arreglos no ocurra, o lo haga en baja proporción. Este modo de amplificación, si bien no tiene por el momento corroboración experimental directa, está soportado por algunas evidencias indirectas, como patrones de corte por enzimas de restricción respecto de la variabilidad general de secuencia (Rossi et al. 1990). Además, se ha observado la formación de ADN circular extracromosomal en células eucariotas en cultivo (Gaubatz 1990). En algunos casos, los elementos estaban formados por copias de ADN satélites, como el ADN alfoide humano Sau3A (Okumura et al. 1987; Kiyama et al. 1989).

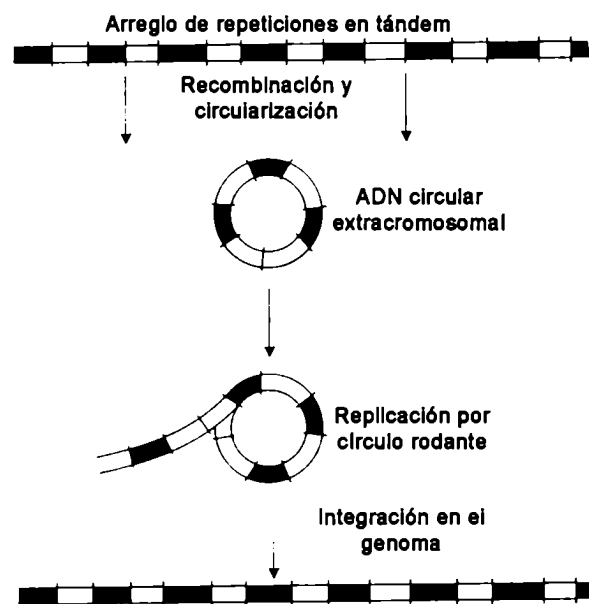


Figura 12: Modelo de amplificación de ADN repetido por círculo rodante. Modificado de Bostock (1986) y Li (1997).

Debido a la dificultad de estudiar experimentalmente los procesos y mecanismos de generación de ADN repetidos, gran parte de lo que conocemos acerca de los modos más probables de amplificación y los factores que afectan al proceso proviene de simulaciones por computadora (Charlesworth et al. 1994). Smith (1976) fue el primero en demostrar que la acción conjunta de la mutación y el entrecruzamiento desigual es capaz de generar estructuras repetidas en tándem. Modelos más elaborados (Charlesworth et al. 1986; Stephan 1986; 1987; 1989; Walsh 1987) confirmaron estos resultados y propusieron también otros mecanismos de amplificación tales como el deslizamiento de hebras en la replicación y la amplificación por círculo rodante.

Estos trabajos mostraron que es posible producir estructuras repetidas aunque existan tasas de recombinación muy diferentes. Las simulaciones de Stephan and Cho (1994) introdujeron la selección natural como un parámetro adicional en la evolución del número de copias. Cuando la longitud total de los arreglos está por debajo de un valor umbral, la selección es nula o muy débil, pero cuando los mecanismos de amplificación llevan al tamaño de los arreglos por encima del umbral, el *fitness* cae a cero.

Los estudios de simulación mencionados coinciden en predecir que los ADN's repetidos en tándem más largos, como los ADN satélites, tenderán a acumularse en regiones de baja recombinación. Esta predicción es concordante con los patrones observados de heterocromatina en posiciones teloméricas y centroméricas (Charlesworth et al. 1994). Si la variabilidad entre repeticiones es alta, la frecuencia de entrecruzamientos se reduce, lo que conducirá a la acumulación de copias del satélite, esperándose una correlación entre variabilidad entre monómeros del arreglo y número de copias.

Las predicciones generadas por estos modelos han comenzado a ser evaluadas con datos empíricos a través del estudio de las secuencias nucleotídicas en ADN satélites. Por ejemplo, Bachmann y col. (1996) obtuvieron las secuencias de varios clones del monómero de dos familias de ADN satélite en grillos del género *Dolichopoda*. El análisis conjunto de la variabilidad nucleotídica y el número de copias mostró que el número de copias se incrementa con la variabilidad de secuencias, lo cual concuerda con las predicciones de Stephan y Cho (1994). Al mismo tiempo, encontraron que la longitud de las repeticiones disminuye con el número de copias, en contradicción con el citado modelo, por lo cual sugieren que las simulaciones incorporen parámetros como la composición de bases y el grado de complejidad de las unidades repetidas.

1.6.2. ADN satélite y evolución cromosómica

Estudios en numerosos grupos taxonómicos hicieron evidente que el ADN satélite es, además, un componente muy dinámico de los genomas, constituyéndose en un potencial factor causal de la plasticidad genómica. La naturaleza dinámica del ADN satélite puede apreciarse en algunos ejemplos: el

satélite MSAT-160 presente en los roedores del género *Microtus* presenta gran heterogeneidad interespecífica en número de copias, organización y localización genómica de los arreglos (Modi 1993a, 1993b, 1993c), encontrándose notables diferencias aún entre subespecies. Los mamíferos artiodáctilos presentan numerosas familias de ADN satélite, cada una con diferentes distribuciones taxonómicas, edades y variabilidad en el número de copias (Jobse et al. 1995; Modi et al. 1996; Nijman and Lenstra 2001). En los agnatos de la familia Eptatretidae, el satélite EEEo2 representa entre un 0,03% y un 35% del genoma, evidenciando una intensa dinámica del satélite en cuanto al número de copias. Además, este satélite muestra un peculiar comportamiento a nivel ontogenético: durante el desarrollo, el satélite es eliminado en toda la línea somática, permaneciendo solamente en tejidos germinales (Nabeyama et al. 2000). Este proceso se conoce como "eliminación de cromatina", y ocurre además en algunos ciliados, nematodos, crustáceos e insectos (Tobler 1986). Los experimentos de hibridación *in situ* revelan que, además de diferir en número de copias, en muchos casos existen también importantes diferencias interespecíficas en la localización cromosómica de los bloques de satélite (Hamilton et al. 1990; Bradley and Wichman 1994).

En diferentes grupos taxonómicos se observó que, en muchos, casos la variabilidad cariotípica ocurría en genomas con cantidades igualmente variables de heterocromatina. Esto indujo a varios autores a sugerir que el ADN satélite juega un rol importante en el origen de los cambios cromosómicos (Wichman et al. 1991; Bradley and Wichman 1994; Rossi et al. 1995c; Garagna et al. 1997). Sin embargo, la existencia de diferentes patrones en la relación entre heterocromatina y variabilidad cariotípica indica que el rol de los ADN satélites no es el mismo en todos los casos. Por ejemplo, algunos grupos cariotípicamente conservativos poseen a su vez importantes cantidades de heterocromatina (Hatch et al. 1976; Barros and Patton 1985). En este caso, los ADN satélites que la componen no estarían promoviendo la variabilidad cromosómica. Wichman y col. (1991) postularon que familias de ADN satélites que evolucionan rápidamente promueven rearrreglos cromosómicos, como consecuencia de movimientos intragenómicos tanto entre cromosomas no homólogos como entre diferentes regiones de un cromosoma. Estos

investigadores señalan que dichos rearrreglos tendrían poco efecto sobre el genoma eucromático, ya que los segmentos sinténicos se mantendrían intactos, dado que las rupturas afectarían sólo a los bloques de ADN satélite. Este modelo predice que linajes cromosómicamente variables poseerán familias de ADN satélite en un estado evolutivamente dinámico (en activo proceso de amplificación, contracción y movimiento intragenómico), mientras que un linaje cromosómicamente conservativo contendrá su ADN satélite localizado en determinadas regiones cromosómicas, invariantes entre las especies del grupo. Estas hipótesis derivan de estudios en équidos (Wichman et al. 1991), en el roedor *Peromyscus* (Hamilton et al. 1992) y en el género de murciélagos *Macrotus* (Bradley and Wichman 1994). Los dos primeros son cariotípicamente variables y poseen numerosas familias de ADN satélite de evolución rápida, mientras que el último es un linaje de cariotipo conservado y presenta secuencias satélites poco dinámicas.

Otros géneros caracterizados por la gran variabilidad cariotípica y con ADN satélites que muestran mucha plasticidad son los roedores *Reithrodontomys* (Hamilton et al. 1990), *Proechimys* (Garagna et al. 1997) y *Ctenomys* (Reig et al. 1990; Rossi et al. 1990; Rossi et al. 1995c) y los cérvidos *Muntjacus*.

1.6.3. Evolución de la secuencia nucleotídica de los ADN satélites

Como el resto del ADN, las secuencias satélites están sujetas a la mutación. A pesar de que la tasa intrínseca de mutación es relativamente constante para cualquier región del genoma, la velocidad con que las mutaciones se fijan o se extinguen en una especie dependerá, en gran parte, de la selección natural en el caso de variantes ventajosas o desventajosas y del tamaño efectivo de la población (N_e) en la que la variante se produzca, en el caso de las variantes neutras. Una mutación que provoque un reemplazo aminoacídico o un cambio regulatorio desfavorable tendrá una probabilidad de fijarse mucho menor que una mutación neutra que pase desapercibida para la selección natural. Así, las secuencias sin restricciones funcionales evolucionarán a una velocidad máxima, determinada por la tasa de mutación, como resulta de los postulados de la teoría neutralista de la evolución

molecular (Kimura 1983), como ocurre con pseudogenes, intrones y gran parte de los sitios cuatro veces degenerados (Li 1997), (ver ítem 1.4.2). Los ADN satélites no parecen poseer funciones que dependan de la conservación de su secuencia, aunque en algunos casos, cortas subsecuencias parecen ser importantes para ciertas funciones como la centromérica, en la unión de proteínas específicas (Csink and Henikoff 1998). Sin embargo, la extrema diferenciación interespecífica de secuencias satélites observada en muchos grupos parece reflejar la ausencia de presiones selectivas en resguardo de una secuencia en particular (Ohta and Dover 1984; Bachmann and Sperlich 1993; Charlesworth et al. 1994; Elder and Turner 1994).

De la misma manera, de acuerdo con la teoría neutralista, cabría esperar que las unidades que componen el satélite en una especie evolucionen independientemente unas de otras, alcanzando rápidamente altos niveles de variabilidad entre ellas. Sin embargo, una característica notable de los ADN repetidos es la de exhibir mayor similitud de secuencia intraespecífica que cuando se compara entre especies, contrariamente a lo esperado por una evolución neutral e independiente de las unidades que forman los arreglos. Este fenómeno de conservación, como se explicitó más arriba, tampoco se debe a selección natural (Elder and Turner 1995).

El fenómeno de similitud intraespecífica versus diferenciación interespecífica ha sido observado desde muy temprano, mediante técnicas de análisis de la reasociación de ADN desnaturalizado. Edelman and Gally (1970) llaman la atención sobre el hecho de que los miembros de una familia de secuencias en una especie coevolucionan, manteniendo la similitud entre ellos mientras divergen de los miembros en otras especies. En todos los tipos de ADN repetidos que se conocen se ha observado este fenómeno (Elder and Turner 1995), tanto en secuencias codificantes como no codificantes. Los primeros análisis detallados se hicieron sobre los genes de ARN ribosomal en *Xenopus*. Los genes que especifican los ARNs ribosomales 18S y 28S en vertebrados están presentes en uno o unos pocos arreglos continuos de cientos de repeticiones. Cada repetición contiene una región espaciadora llamada IGS (*intergenic spacer*). Las regiones IGS en el ADN ribosomal de *X. laevis* son altamente homogéneas pero son muy diferentes de las de *X.*

Borealis (Brown et al. 1972). La gran diferenciación interespecífica indica que las regiones IGS acumularon mutaciones independientemente desde la divergencia de las dos especies. Por lo tanto, la alta homogeneidad intraespecífica no es mantenida por restricciones selectivas, o selección purificadora, sino por ciertos mecanismos que “difunden” horizontalmente la mutación producida en una repetición a todas las restantes repeticiones de la familia (Brown et al. 1972). El término evolución concertada había sido originalmente propuesto por Zimmer y col. (1980) y es comúnmente utilizado para referir al citado fenómeno. Dover (1982) definió a la evolución concertada como la evolución no independiente de secuencias de ADN repetido que resulta en una similitud mayor entre las unidades repetidas dentro de una misma especie que entre especies. Se considera que la evolución concertada es resultado de una serie de mecanismos relacionados con la reparación y replicación del ADN, tales como el entrecruzamiento desigual, transposición replicativa, amplificación génica y conversión génica. Todos estos mecanismos, que en conjunción con procesos genético-poblacionales resultan en la amplificación sesgada o aleatoria de secuencias repetidas de ADN, han sido colocados dentro de una categoría general de procesos conocida como conducción molecular (*molecular drive*), (Dover et al. 1982). Al participar mecanismos de amplificación “egoísta” sumamente eficientes, los procesos de conducción molecular pueden sobrellevar los efectos de una selección negativa moderada. La conducción molecular habitualmente no es considerada por la genética de poblaciones clásica. Sin embargo constituye un proceso que, junto con la deriva y selección, es capaz de causar la fijación de ciertas variantes de una secuencia repetida en los genomas. Estos mecanismos operan tanto en secuencias repetidas codificantes como no codificantes, y pueden potencialmente afectar la evolución de los organismos en formas decididamente no mendelianas y no darwinianas (Dover 1982; Elder and Turner 1995).

La conversión génica es un proceso recombinacional en el cual dos secuencias interactúan de tal manera que una es convertida en la otra. La interacción puede ser intracromosomal si ocurre entre alelos de un locus o entre distintos *loci* de un cromosoma. Si ocurre entre *loci* ubicados en

cromosomas diferentes, es intercromosomal (Petes and Hill, 1988; Nagylaki 1990). La conversión génica es más frecuente y ha sido más estudiada en levaduras (Petes and Hill 1988), aunque ha sido observada también en otros hongos, *Drosophila* y maíz (Nelson 1975; Hilliker and Chovnick 1981; Nagylaki 1983).

El entrecruzamiento desigual, a diferencia de la conversión génica, es un proceso recombinacional recíproco, ya que produce cambios en ambas cadenas intervinientes. Una de las cadenas sufre una duplicación, mientras que la otra pierde unidades. La homogeneización a través de este mecanismo puede ocurrir entre cromátidas o entre homólogos en la meiosis (Szostak et al. 1983). A pesar de estar formalmente definida en términos de la diferenciación entre especies, la evolución concertada (y la conducción molecular en general) son fenómenos que operan al nivel de poblaciones naturales (Elder and Turner 1995). Elder y Turner (1994) analizaron la evolución concertada de un ADN satélite en poblaciones del pez *Cyprinodon variegatus* de diferentes localidades de la costa atlántica estadounidense. A partir de los datos obtenidos, concluyen que este satélite de 2 millones de copias por genoma haploide, está sufriendo evolución concertada al nivel de poblaciones locales. El análisis mostró que la divergencia de ADN satélite entre poblaciones puede proveer información a nivel de secuencia sobre el grado de aislamiento entre ellas, y por lo tanto, de la ocurrencia de procesos de divergencia alopátrica.

Los mecanismos que producen súbitas amplificaciones de ADNs repetidos pueden ser vistos también como mecanismos que causan evolución concertada. El efecto homogeneizador de la amplificación por círculo rodante se debe al rápido incremento en el número de copias de una variante en particular, en un tiempo tal que la mutación no llega a actuar y a reducir la identidad de secuencia (Walsh 1987; Rossi et al. 1990; Nijman and Lenstra 2001). Luego de la amplificación, la homogeneidad puede mantenerse por acción de suficientes niveles de conversión génica y entrecruzamiento desigual.

Los enfoques experimentales para estudiar las propiedades y la evolución de los satélites al nivel nucleotídico se basan principalmente en técnicas de *Southern*, utilizando sondas construidas con la secuencia o parte

de la secuencia repetida (Southern 1975). De esta manera se puede estimar el grado de similitud general que existe entre la sonda y el satélite presente en la muestra. Aunque, debido a la utilidad de la información que proporciona, la técnica de *Southern* continúa en uso en estudios de ADN satélite, la evaluación de la evolución concertada se ha venido realizando en los últimos años mediante el clonado al azar y secuenciación de unidades repetidas (Dover et al. 1993). Usualmente se obtiene una secuencia consenso y a continuación se calculan los parámetros que miden la variabilidad entre las secuencias obtenidas, ya sea entre todos los pares posibles o contra la secuencia consenso (Dover et al. 1993; ver ejemplos en Bachmann and Sperlich 1993; Bachmann et al. 1996; Pons et al. 1997; Mravinac et al. 2002). En la misma línea de investigación, Strachan y col. (1985) estudiaron secuencias satélite en especies de *Drosophila*. La comparación de las secuencias mostró en este caso que, en la mayoría de las especies, la diversidad nucleotídica interespecífica era generalmente de un orden de magnitud mayor que la diversidad intraespecífica. No obstante, la misma medida de divergencia entre las especies más cercanamente relacionadas (*D. simulans* y *D. mauritiana*) no reveló diferencias entre y dentro de las especies. Para detectar evolución concertada en tal caso es necesario abandonar el procedimiento de utilizar diferencias globales de similitud entre las secuencias y los consensos y examinar directamente todas las secuencias disponibles. Al hacer esto, los mismos autores, Strachan y col. (1985), pudieron identificar varios nucleótidos diagnósticos de especie, e incluso pudieron diferenciar etapas en el proceso de homogeneización.

Otra metodología alternativa que brinda mucha información consiste en la secuenciación directa de las unidades repetidas del satélite a partir de ADN genómico. El fundamento consiste en obtener una "mezcla" de las secuencias presentes en el satélite. Al contabilizar las posiciones que presentan ambigüedades puede obtenerse una estimación de la variabilidad interna del satélite. Al mismo tiempo, puede obtenerse una secuencia consenso para ser comparada con las de otras especies. Dicho enfoque fue utilizado por Elder y Turner (1994) al estudiar evolución concertada al nivel poblacional. Los autores compararon la secuencia obtenida a partir de un monómero clonado, con la

obtenida a partir de ADN genómico, utilizando cebadores específicos del satélite. La conclusión fue que el método resultó adecuado para obtener una secuencia consenso representativa del conjunto de las repeticiones.

Muchmore y col. (1998) secuenciaron el ADN satélite en cinco especies de gasterópodos marinos de California a partir de ADN genómico, con el objetivo de evaluar su utilidad como marcador taxonómico. El procedimiento permitió en este caso detectar sitios con variantes, que en todos los casos fueron solamente dos, evidenciando un elevado grado de homogeneización en el grupo analizado. Con un objetivo similar, Picariello y col. (2002) secuenciaron el satélite S1 en anuros del género *Rana*, aunque en este caso se amplificó la unidad repetida por PCR a partir del ADN genómico y el producto se utilizó como sustrato para la secuenciación. Los autores elaboraron criterios de interpretación de la lectura de la secuenciación para discriminar entre señal de fondo y bases minoritarias: presencia de la base en ambas cadenas y señales de mayor intensidad que determinado umbral. Finalmente, la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante o DGGE (Lessa 1998) fue utilizada para analizar la homogeneización de secuencias en arreglos de ARN ribosomal en el parásito nematodo *Haemonchus contortus* (Gasser et al. 1998). Esta técnica, alternativa al clonado y secuenciación, consiste en amplificar por PCR un segmento de ADN (en este caso se amplificó la región ITS-2 de los genes ribosomales) y someter al producto a una electroforesis en gel de poliacrilamida con un agente desnaturizante en gradiente. El producto de PCR se siembra desnaturizado, y en caso de existir diferentes variantes de la secuencia, se formarán cadenas híbridas que producirán diferentes patrones de corrida. El estudio detectó 13 variantes de ITS-2 en individuos pertenecientes a 9 poblaciones, es decir, permitió relevar gran parte de la variabilidad.

1.6.4. ADN satélite de los tuco-tucos

Como inicio de la línea de investigación en la que se encuadra esta tesis, Rossi (1990) caracterizó al principal ADN satélite presente en el genoma de *Ctenomys porteusi*, una de las especies de los roedores tuco-tucos. El satélite fue nombrado RPCS (del inglés *Repetitive PvuII Ctenomys Sequence*),

(Rossi et al. 1990) ya que pudo ser detectado en virtud de poseer un único sitio de corte para la enzima de restricción *Pvu* II, y a través de análisis de *Southern* y *dot blot* se determinó que está presente también en otras 9 especies del género: *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. talarum* y *C. latro* en alto número de copias, *C. perrensi*, *C. tuconax* y *C. occultus* en bajo número de copias, mientras que en *C. opimus* fue indetectable (Rossi 1990). Se determinó también que los octodontinos *Octodontomys gliroides* y *Octodon degus* poseen secuencias homólogas a la RPCS. El ADN genómico de estas especies produce señal positiva al ser hibridado con una sonda del monómero de RPCS solamente en condiciones de baja rigurosidad (6X SSC, 60°C), en las cuales pueden hibridar secuencias que difieren hasta en un 60% (Rossi 1990). La especie *Proechimys guairae*, por otro lado, no produjo señal en ninguna condición de hibridación. *C. opimus* también produjo señal en un *Southern* utilizando la enzima *Pvu*II en condiciones de baja rigurosidad se secuenció, aunque con menor intensidad y con un patrón de bandas anómalo comparado con los típicos patrones en escalera (A ó B), presente en las especies estudiadas (Rossi 1990).

La localización cromosómica del satélite RPCS fue estudiada mediante hibridación *in situ* (Rossi et al. 1995b). Se observó una buena correlación entre la señal de hibridación con la sonda RPCS y el grado de amplificación de la secuencia, medido en los ensayos de *dot blot* como número de copias por genoma. Las especies con alto número de copias presentan localización de RPCS principalmente pericentromérica y en muchos casos, en brazos cortos enteros. Las especies con número bajo de copias (*C. latro* y *C. occultus*) mostraron tener RPCS en regiones pericentroméricas de algunos cromosomas y también bandas intersticiales. La segunda especie presenta, sin embargo, algunas bandas C que no contienen RPCS. En las condiciones de la hibridación *in situ* no se detectaron secuencias RPCS en *C. opimus*, aunque esta especie contiene conspicuos bloques de heterocromatina evidenciados por bandas C, tanto pericentroméricas como en bloques de brazos cortos enteros (Reig et al. 1992), en concordancia con los ensayos de *Southern*. Estos resultados indican que el satélite RPCS constituye la mayor parte de la porción heterocromática del genoma de las especies con alto número de copias, y que

probablemente exista otro tipo de satélite en las especies con bajo contenido de RPCS *C. occultus* y *C. opimus* (Rossi et al. 1995b). El análisis conjunto de los ensayos de número de copias (*dot blot*), patrones de restricción de los arreglos (*Southern*) y distribución cromosómica (hibridación *in situ*) de RPCS en las especies de *Ctenomys*, mostraban que este satélite se habría amplificado en forma diferencial, tanto cuantitativamente como cualitativamente en los distintos linajes (Rossi et al. 1990; Rossi et al. 1995a; Rossi et al. 1995b). Este dinámico proceso, evidenciado por una variación amplia en el número de copias y en las diferentes localizaciones en los cromosomas de *Ctenomys*, abrió el interrogante acerca del rol de esta secuencia en la evolución cromosómica en el género.

A pesar de compartir las características usuales de los ADN satélites como la disposición en tándem, el patrón de restricción en escalera (Rossi et al. 1990), el alto número de copias (Rossi et al. 1993b), y la localización heterocromática (Rossi et al. 1995b), el satélite RPCS presenta una característica inusual: su secuencia nucleotídica de 348 pares de bases muestra una importante identidad con la región U3 del LTR del Virus del Sarcoma de Rous, incluyendo promotor y *enhancers*, lo que caracteriza a la maquinaria de transcripción de los retrovirus (Rossi et al. 1993). Se determinó además que algunas regiones de la RPCS son capaces de unir factores de transcripción (Pesce et al. 1994), lo que sugiere que la secuencia podría, potencialmente, modificar los patrones de expresión de genes vecinos a su sitio de integración (Rossi et al. 1995a). A raíz de estos hallazgos, se postuló que en el genoma de un ancestro del género se insertó un retrovirus que sufrió luego una delección importante de su genoma, posiblemente por recombinación entre ambos LTR. Mecanismos como el entrecruzamiento desigual generaron luego un arreglo de varias repeticiones, que fue luego sustrato para la amplificación por círculo rodante (Rossi et al. 1990).

La evidencia obtenida por Rossi (1990) permitió esbozar un esquema de la evolución del satélite RPCS, aunque sin el apoyo de un marco filogenético adecuado de la evolución de las especies del género, para ese entonces inexistente. A través de dicho esquema se postuló que, luego de la divergencia entre equimidos y octodóntidos, se produjo la inserción retroviral y posteriores

rearreglos, que originaron la unidad repetitiva del satélite RPCS. Luego ocurrió una amplificación moderada y a continuación la divergencia entre octodontinos y ctenominos. Dentro ya del linaje que conduce a las especies actuales de *Ctenomys*, primero habrían divergido las especies con escaso grado de amplificación del satélite. Finalmente, una gran amplificación de RPCS habría ocurrido en el ancestro de las especies del grupo mendocinus y *C. talarum*, todas con elevado número de copias del satélite.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Especímenes examinados

Se estudiaron 68 individuos pertenecientes a 25 especies nominales y 4 formas no determinadas de *Ctenomys* y representantes de los géneros *Octodon*, *Octodontomys*, *Spalacopus*, *Tympanoctomys*, *Octomys*, *Galea*, *Microcavia*, *Myocastor*.

La mayoría de los ejemplares provienen de la colección del GIBE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (código I) y del Museo de Historia Natural "Noel Kempf Mercado", Santa Cruz, Bolivia (código NK). Otras muestras provienen del Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay (código CA), de los Dres. Milton Gallardo y D. Reize (MHG, DR), Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile (IEEUACH), del Dr. Angel Spotorno (AS), del Dr. Carlos Quintana (CQ), de la Dra. M. Susana Rossi (MSR), del Museum of Vertebrate Zoology, Berkeley, University of California (MVZ), del Field Museum of Natural History, Chicago (FMNH) y de la Dra. Marta Lizarralde (CT). Todas las localidades, excepto aquellas donde se indica, están en Argentina. Se indican los códigos de acceso a Genbank para las secuencias que fueron previamente publicadas por Lessa y Cook (1998), los códigos comienzan con "AF". Las secuencias de citocromo b que fueron obtenidas en esta tesis fueron depositadas en la base de datos Genbank bajo los números de acceso AF370680 a AF 370706.

Ctenomys porteousi (N=3), Bonifacio, Buenos Aires (I539, I229, I545), *Ctenomys australis* (N=2), Necochea, Buenos Aires (I1036), Claromecó, Buenos Aires (I1054), *Ctenomys mendocinus* (N=2), Tupungato, Mendoza (MSR2, MSR33), *Ctenomys opimus* (N=2), Tres Cruces, Jujuy (I464) and Parinacota, Chile (DR2326), *Ctenomys fulvus* (N=4), San Pedro de Atacama, El Loa, Chile (DR2323), Vegas de Turi, Antofagasta, Chile (DR2324, MHG1042), Salar de Atacama, Región de Antofagasta, Chile (AS872), *Ctenomys talarum* (N=3), Necochea, Buenos Aires (I734, I733, I695), *Ctenomys argentinus* (N=1), Colonia Benítez, Chaco (I702), *Ctenomys latro* (N=3), Tapia, Tucumán (I998, I995, I831), *Ctenomys tucumanus* (N=3), Ticucho, Tucumán (I987, I988, I989),

Ctenomys tuconax (N=3), El Infiernillo, Tucumán (I867, I679, I990), *Ctenomys magellanicus* (N=4), Tres Arroyos, Tierra del Fuego, (I308, I307, CT20, CT50), *Ctenomys haigi* (N=1), 13.5 km E Perito Moreno, Río Negro, (MVZ184885), *Ctenomys pearsoni* (N=1), Rocha, Uruguay, (CA583), (AF119108), *Ctenomys rionegrensis* (N=1), Río Negro, Uruguay, (CA435), (AF119114), *Ctenomys maulinus* (N=3), Río Colorado, Caracutin, Malleco, Chile (MHG1151, MVZ183304); Pelechue, Chile (AS1019), *C. coyhaiquensis* (N=1), Region XI, Chile (FMNH134300), (AF119112), *Octodontomys gliroides*, (N=1) Tilcara, Jujuy (CQ-1), *Octodon degus* (N=1), Región Metropolitana, Chile (I-89A), *Spalacopus cyanus* (N=1), Los Vilos, Chile (IEEUACH 4544), *Aconaemys porteri* (N=1), Puyehue, Chile (IEEUACH 3702), *Aconaemys fuscus* (N=1), Area de protección Vilches, Chile (IEEUACH 602), *Aconaemys sagei* (N=1) Pampa Hui-Hui, Mendoza (IEEUACH 4401), *Octomys mimax* (N=1) Parque Ischigualasto, San Juan (MHG 1487), *Tympanoctomys barrerae* (N=1) Nihuil, Mendoza (MHG 1482), *Galea musteloides* (N=1) Criadero Dr. Burgos, Mendoza (MHG 1534), *Myocastor coypus* (N=1) (MHG 1575), *Microcavia australis* (N=1) Reserva Ñacuñán, Mendoza (MHG 1540). *C. boliviensis* (N=2) Santa Cruz, Bolivia (NK15726, NK15800), (Genbank No. AF007037, AF007038), *C. goodfellowi* (N=2) Santa Cruz, Bolivia (NK13029, NK13030), (AF007050, AF007051), *C. sp.* "ROBO" (N=2) Santa Cruz, Bolivia (NK12437, NK12438), (AF007039, AF007040), *C. steinbachi* (N=2) Santa Cruz, Bolivia (NK12133, NK12134), (AF007043, AF007044), *C. opimus* (N=1) Oruro, Bolivia (NK11516), (AF007042), *C. conoveri* (N=2) Chuquisaca, Bolivia (NK12606, NK12607), (AF007054, AF007055), *C. leucodon* (N=1) La Paz, Bolivia (NK14789), (AF007056), *C. frater* (N=2) Tarija, Bolivia (NK14621, NK14622), (AF007045, AF007046), *C. minutus* (N=2) Santa Cruz, Bolivia (NK12404, NK12406), (AF007052, AF007053), *C. lewisi* (N=1) Chuquisaca, Bolivia (NK14649), (AF007049), *C. sp.* "ITA" (N=1) Tarija, Bolivia (NK21221), (AF007047), *C. sp.* "MONTE" (N=1) Chuquisaca, Bolivia (NK21303), (AF007057), *C. sp.* "LLATHU" (N=1) Cochabamba, Bolivia (NK22840), (AF007048).

2.2. Extracción y purificación de ADN genómico

Para obtener ADN genómico se utilizaron trozos de hígado conservados en etanol al 70%.

2.2.1. Digestión con *Proteinasa K*

Se molieron fragmentos de hígado de alrededor de 0,5cm³ en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez homogeneizado, el hígado se colocó en buffer de digestión en tubos de polipropileno de 15 ml:

Tris HCl 10mM pH 8

5 mM EDTA

0,6% SDS

Proteinasa K 0,5mg por ml de buffer

Se incubó a 55°C con mezcla por inversión cada 15 minutos durante al menos 2 horas, hasta digestión completa.

2.2.2. Purificación con *Fenol – Cloroformo – Isoamílico*

A la digestión se agregó un volumen de una mezcla formada por:

Fenol: 25 partes

Cloroformo: 24 partes

Alcohol Isoamílico: 1 parte

Se mezcló hasta emulsión completa y se centrifugó a 13.000 RPM por 15 minutos. Se descartó cuidadosamente la fase orgánica. Se repitió al menos una vez más, o hasta que no se observó material entre las fases acuosa y orgánica. Se agregó un volumen de Éter etílico saturado en agua, se mezcló hasta emulsión, se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y se descartó la fase orgánica. Se repitió tres veces más.

2.2.3. Precipitación del ADN genómico

Se agregó CH₃COONa hasta 0,3M final y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se colocó 2 horas a -20°C y se centrifugó a 13.000 RPM. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 3 veces con etanol 70%. El precipitado se secó al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada. Finalmente, se agregó RNasa hasta una concentración de 0,1 mg/ml, y se repitió la purificación con fenol-cloroformo-isoamílico.

2.2.4. Cuantificación del ADN

El ADN purificado fue cuantificado en un espectrofotómetro de UV Genequant (Farmacia). Se prepararon diferentes diluciones de la muestra hasta obtener lecturas de absorbancia de entre 0,2 y 1,8.

2.3. Digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron enzimas de la firma Promega y se siguieron las recomendaciones de la misma. Para ADN genómico se utilizaron entre 5 y 6 unidades por microgramo de ADN, y para ADN plasmídico, entre 1 y 2 unidades por microgramo.

2.4. Electroforesis en geles de agarosa

2.4.1. Analítica

Se prepararon los geles con 0,8% a 1,2% de agarosa (BRL) en buffer TBE o TAE. Se agregó bromuro de etidio a la agarosa una vez disuelta hasta una concentración de 0,5 µg/ml. Las corridas se efectuaron a unos 20 Volts por centímetro. La visualización del ADN se realizó a través de un transiluminador UV con sistema de video e impresión FOTODYNE Inc.

2.4.2. Preparativa

Para recuperar ADN a partir de un gel de agarosa se utilizó el sistema con resina de intercambio QIAEX-II (QIAGEN). Se escindió la banda del gel con bisturí y se trató con la resina según el protocolo recomendado por el fabricante.

2.5. Transferencia y fijación del ADN a membranas

2.5.1 Southern

El ADN genómico digerido con enzimas de restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa (18 horas a 2 V/cm). El gel fue luego sometido a incubaciones con las siguientes soluciones :

Solución desnaturizante: NaCl 1,5M; NaOH 0,5N

Solución neutralizante: Tris-HCl 0,5M; NaCl 1,5M; pH8

La primer incubación fue de 30 minutos, y la segunda se repite dos veces, 20 minutos cada una. Luego se transfirió el ADN por capilaridad con SSC 20X según el protocolo de Southern (1975) durante 18 horas a una membrana de nitrocelulosa Hybond N+ (Amersham). Luego de la transferencia, la membrana se colocó a 80°C durante dos horas para fijar el ADN a la misma.

2.5.2. Dot blot

El ADN purificado y cuantificado se adhirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond N+ (Amersham) utilizando una unidad microfiltradora Bio-Dot (BioRad) con una bomba de vacío. Luego de la transferencia, la membrana se colocó a 80°C durante dos horas para fijar el ADN a la misma.

2.6. Marcación de sondas

La marcación radioactiva de las sondas se llevó a cabo con el método de *random priming* utilizando el equipo de la firma New England Biolabs. Las sondas empleadas fueron o bien el inserto liberado de un plásmido, o el producto de PCR con cebadores específicos para SRPC. Se utilizaron entre 10 y 20 microCuries de dCT³²P alfa.

2.7. Hibridación del ADN

Las membranas con ADN fijado se preincubaron a 60°C con una solución acuosa con 6X SSC, 0,5% SDS, solución Denhart 5X y 100 microgramos de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por cada ml de solución. La preincubación, la hibridación y los lavados se hicieron en tubos de vidrio Hybritube (BRL) colocados en un horno rotatorio WTB Binder. Luego de dos horas, se agregó la sonda desnaturalizada por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. La hibridación continuó por 18 horas. Se hicieron cuatro lavados de 20 minutos cada uno con diferentes soluciones según el caso: para alta rigurosidad se usó una solución 0,1X SSC y 0,5% SDS a 65°C, y para baja rigurosidad se usó una solución 6X SSC y 0,5% SDS a 60°C. Luego se envolvió la membrana en film de polietileno y se reveló la señal radioactiva de una de las dos siguientes maneras:

1) Exposición de una placa radiográfica: se colocó la membrana en un casete de exposición junto con una placa radiográfica AGFA y una pantalla reflectante. El casete se mantuvo a -80°C entre dos horas y varios días, según el caso.

2) Lectura en un sistema de detección y análisis de imágenes PHOSPHOIMAGER BAS1000 (FUJI). La membrana se colocó en el casete con la pantalla sensible FUJI entre 30 minutos y dos días, y luego se analizó con el dispositivo lector. La imagen fue guardada en un archivo gráfico en computadora.

2.8. Ligaciones

Las reacciones de ligación para el clonado de fragmentos de ADN genómico se hicieron a 20°C durante 26 hs, en 20 µl de buffer de ligación (BRL), en presencia de 500 µM ATP y 1 U de DNA ligasa del fago T4.

2.9. Transformación de bacterias competentes

Cultivos de *E.coli* de las cepas DH5α se procesaron según Hanahan (1983) para obtener bacterias competentes. Para transformar las bacterias competentes se coincubaron a 0°C durante 30 min 50 microlitros de suspensión de bacterias competentes con ADN plasmídico. La mezcla se incubó a 40°C durante 90 seg y se enfrió rápidamente durante 5 min. Luego se agregaron 200 microlitros de medio de cultivo LB y se incubó a 37°C durante una hora con agitación. La mezcla fue luego sembrada en placas de petri con agar LB y con 100 microgramos/ml de ampicilina y/o 40 microgramos/ml de IPTG y 120 microgramos/ml de Xgal, según el caso.

2.10. Preparación de plásmidos en pequeña escala

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979). Si los plásmidos iban a ser utilizados para reacciones de secuenciación, fueron además purificados con fenol-cloroformo-isoamílico.

2.11. Oligonucleótidos

Para las reacciones de amplificación y secuenciación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

SRPC17U: 5' – TTCGCCTATACTTTTCTCTNN – 3'

SRPC325L: 5' – TAGTGCAAAAGAGATACANN – 3'

T7: 5' – GTAATACGACTCACTATAGGGC – 3'

-40 M13: 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC – 3'

M13 reverse: 5' – GGAAACAGCTATGACCATG – 3'

2.12. PCR (polymerase chain reaction)

Las reacciones de PCR se efectuaron con un termociclador MJ Research PTC100. Se utilizó la enzima Taq polimerasa y demás reactivos de Promega en las siguientes concentraciones:

Taq Polimerasa:	2,5 Unidades
desoxinucleótidos trifosfato:	20µM
MgCl:	2,5mM
cebadores:	2µM

Para amplificar el satélite SRPC se incluyó una etapa de desnaturalización inicial (5min, 94°C). Cada ciclo se programó en las siguientes condiciones:

Desnaturalización: 1min, 94°C,

Apareamiento: 1min, 48°C,

Elongación: 30seg, 72°C.

Se finalizó con una elongación final de 5min a 72°C.

2.13. Secuenciación de ADN

Las secuencias nucleotídicas presentadas en esta tesis fueron obtenidas en algunos casos, en el laboratorio por el método de Sanger, o por su modificación con polimerasa termorResistente). En otros casos (la mayor parte de los productos de PCR y clones) las muestras fueron purificadas con fenol-cloroformo-isoamílico hasta obtener una relación de absorbancias de 260 a 320

superior a 1.8 y enviadas a servicios de secuenciación automática. Las secuencias de citocromo b fueron realizadas con secuenciador automático por el laboratorio del Dr. Joseph Cook, de la Universidad de Alaska.

2.13.1. Método de Sanger

Para secuenciar por el método de Sanger se empleó el equipo Sequenase 2.0 (USB). Los detalles del protocolo pueden consultarse en la literatura técnica del fabricante. Para secuenciar el clon SRPO7 se utilizaron los oligonucleótidos –40 M13 y M13 reverse.

2.13.2. Secuenciación por PCR

Este método es una versión modificada del procedimiento de Sanger. El mismo utiliza una ADN polimerasa termorresistente (Taq) y un termociclador. Se utilizó el equipo femtoMol (fmol) de la firma Promega. El método permite utilizar dos tipos de marcación radioactiva del ADN. El primero consiste en marcar el oligonucleótido cebador con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y el segundo en marcar el ADN sintetizado incorporando uno de los nucleótidos trifosfato marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ó $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{ATP}$. El primer método de marcación resultó más efectivo en la secuenciación de productos de PCR, mientras que el segundo lo fue para los clones en ADN plasmídico. Para secuenciar ambas cadenas en los productos de PCR de SRPC se utilizaron los oligonucleótidos SRPC17U y SRPC325L. En el caso de los clones, ya que la calidad de la secuenciación de los mismos fue lo suficientemente buena como para obtener una lectura sin dudas, se secuenció una sola cadena, utilizando el oligonucleótido T7 a fin de obtener la mayor cantidad posible de secuencias.

Para secuenciar productos de PCR y los clones se utilizó el siguiente esquema de temperaturas y tiempos, el cual representa una ligera modificación del recomendado por el fabricante: se programó una desnaturalización inicial de 3min a 95°C, y a continuación 35 ciclos de la siguiente manera:

desnaturalización: 45seg a 95°C,

apareamiento: 45seg a 42°C,

elongación: 1min a 72°C.

2.13.3. Lectura de las secuenciaciones:

Las muestras provenientes de las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de 8% acrilamida y 7M urea, en geles planos de 0,4mm de espesor, en buffer TBE. Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 100°C por 5 min y enfriamiento rápido. Se sembraron 3µl de mezcla de reacción en cada calle. La electroforesis se desarrolló a potencia constante de 60 Watts durante 4 a 6 horas, repitiéndose las siembras en calles diferentes cada dos horas para mejorar el rango de lectura. Luego de la corrida, los geles fueron secados en una secadora de geles BioRad por una hora y expuestos ante una placa radiográfica AGFA durante 1 a 2 días para la marcación con [α -³²P] y 3 a 6 días para la marcación con [α -³⁵S].

2.14. Análisis de secuencias y filogenéticos

En todos los casos las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX (Thompson et al. 1997). El manejo de las alineaciones para su presentación e impresión se llevó a cabo con el programa GENEDOC (Nicholas et al. 1997). Las distancias genéticas entre secuencias y la composición de bases se calcularon con el programa PAUP 4.0beta10 (Swofford 1998), lo mismo que el estadístico g1 para señal filogenética. La construcción de los árboles filogenéticos fue realizada con PAUP 4.0. La visualización e impresión de los árboles filogenéticos se realizó con el programa TREEVIEW 1.6.6 (Page 1996).

Para MP se hicieron 20 réplicas con orden de adición de secuencias aleatorio utilizando un esquema de pesos *a priori* para primera, segunda y tercera posición de los tripletes de 2, 5 y 1, respectivamente. Se definió también una matriz de sustituciones dando una relación de transiciones a transversiones de 6 a 1. Se utilizó también un esquema de pesado *a posteriori*, utilizando la opción en el programa, donde se indicó que se pesen los caracteres según el índice de consistencia (CI). El soporte de cada clado fue evaluado mediante un análisis de *bootstrap* con 500 pseudoréplicas, cada una con un orden distinto y aleatorio de adición de secuencias.

Los árboles de MV se construyeron siguiendo el modelo GTR de evolución nucleotídica, cuyos parámetros fueron estimados con el programa Modeltest (Posada and Crandall 1998). Se llevaron a cabo 10 corridas con órdenes aleatorios de adición de secuencias.

Se construyeron árboles de distancias con el algoritmo NJ, utilizando los modelos GTR con los parámetros calculados por Modeltest (Posada and Crandall 1998), y el modelo Kimura 2 parámetros. El análisis de soporte por *bootstrap* se realizó con 1.000 pseudoréplicas.

2.15. Estimación del número de copias ancestral de SRPC

La condición ancestral del número de copias de SRPC fue reconstruida en los nodos internos del árbol de MV (el de mayor verosimilitud) utilizando el programa ANCML (Schluter et al. 1997). El programa se alimentó con la topología del árbol y los valores de número de copias de SRPC medidos por *dot blot*. La salida del programa contiene los valores estimados para los nodos internos y el error estándar de los mismos.

2.16. Tiempos de divergencia

Para estimar el tiempo de divergencia en *Ctenomys* se utilizó el conjunto de programas LINTRE (Takezaki et al. 1995). El procedimiento consiste en generar un árbol de distancias, para el cual se utiliza el programa NJBOOT del paquete LINTRE (Takezaki et al. 1995), indicando el modelo de evolución Tajima-Nei (el más similar a GTR dentro de las posibilidades ofrecidas por el programa). Se utilizaron las secuencias de citocromo b de 49 taxones. A continuación se efectuó la prueba de dos grupos (*two cluster test*) corriendo el programa TPCV de LINTRE. La salida de este programa informa la significación estadística de la diferencia entre las ramas que parten de cada nodo. Aquellas ramas cuya longitud difiere significativamente del promedio (CP > 95%) son excluidas. A continuación se corrió nuevamente TPCV, esta vez excluyendo las secuencias con tasa de evolución significativamente diferente y se obtuvo un árbol linealizado, con ramas proporcionales al tiempo.

3. RESULTADOS

3.1. Filogenia molecular de *Ctenomys*

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de la historia evolutiva de las especies de *Ctenomys*, y al mismo tiempo referir al marco filogenético la evolución del ADN satélite SRPC, se resolvió encarar el estudio de las relaciones evolutivas entre las especies del género, utilizando las secuencias de gen mitocondrial citocromo b.

3.1.1. Variabilidad a nivel nucleotídico del gen citocromo b

El estudio incluye secuencias previamente publicadas por Lessa y Cook (1998), Cook y Lessa (1998) y D'Elía y col. (1999), y secuencias originales obtenidas a partir de tejidos conservados en etanol. En total se obtuvieron 27 nuevas secuencias completas de citocromo b. Todas las secuencias tienen una longitud de 1140 pares de bases que codifican 379 aminoácidos y un triplete STOP (ver ítem 6.1), idéntica a la encontrada en otros roedores caviomorfos (Lara et al. 1996).

Las secuencias exhiben un notable sesgo en la composición de bases, característico del citocromo b de mamíferos (Irwin et al. 1991). Existe una deficiencia general de Gs en la hebra codificante (12,4%), que se acentúa al considerar sólo la tercera posición de los tripletes, donde la G aparece con una frecuencia de 0,03, mientras que en la primera posición la frecuencia es 0,2.

La matriz de caracteres, producto de la alineación de todas las secuencias, contiene 461 sitios variables, que representan el 40% del total. De ellos, el 26,3% pertenece a primera posición de tripletes, el 19,9% a segunda y el 53,7% a tercera posición.

Para evaluar los niveles de variabilidad interespecífica respecto de la intraespecífica se construyó una matriz de porcentajes de diferencias (distancia p) entre todos los pares de secuencias (ver ítem 6.2). Los valores más altos de divergencia intraespecífica fueron encontrados en *C. mendocinus* (0,7% - 2,8%; n=3), *C. talarum* (0,9% - 2,1%; n=3), *C. maulinus* (1,8%; n=2), *C. opimus* (1,1% - 1,8%; n=4), *C. porteوسي* (1,6%; n=2) y *C. fulvus* (0,1% - 1,6%; n=4).

Las comparaciones interespecíficas mostraron que los pares de especies menos divergentes tienen niveles de divergencia comparables a algunos valores de diferenciación intraespecífica: *C. argentinus* y *C. latro* difieren en 1,2% – 1,4%, *C. porteousi* y *C. australis* difieren en 1,2% mientras que la divergencia entre *C. opimus* y *C. fulvus* va de 1,2% a 2,2%. El par de especies más divergente fue *C. conoveri* y *C. leucodon* con 12,5% de diferencias.

Se utilizó el método de Hillis y Huelsenbeck (1992) para evaluar si la matriz de datos contiene señal filogenética o si, por el contrario, los caracteres se distribuyen en forma aleatoria (ver ítem 1.4.9). El estadístico g_1 se calculó a partir de 10.000 árboles aleatorios y arrojó un valor de $-2,887$, resultando altamente significativo ($P > 0,01$) e indicando que la matriz contiene fuerte señal filogenética (Hillis and Huelsenbeck 1992).

3.1.2. Análisis filogenéticos

Como un reflejo de la complejidad que presenta el estudio de la evolución de los tuco-tucos, los distintos métodos empleados produjeron topologías coincidentes para muchos grupos de especies, pero diferentes para otros. Dado que existen controversias acerca de la validez y robustez de los diferentes métodos de reconstrucción filogenética, consideraremos como hipótesis filogenéticas más confiables a aquellas que estén soportadas por la mayor cantidad de enfoques posibles, mientras que aquellas relaciones que surjan de sólo alguna combinación particular de parámetros serán tomadas con cautela.

3.1.2.1. Máxima parsimonia

Los análisis filogenéticos de máxima parsimonia (MP) se realizaron con el programa PAUP 4.0 (Swofford 1998) y se empleó la totalidad de las secuencias disponibles. Del total de posiciones que presentan variación entre secuencias, 411 son informativas según el criterio de parsimonia: cada variante está representada en al menos 2 secuencias (Felsenstein 1993), mientras que 75 de las posiciones variables no son informativas para parsimonia. Como se desprende del análisis de la distribución de la variabilidad respecto de la

posición en los tripletes, la tercera posición, al ser más variable, es más propensa a presentar homoplasias producidas por múltiples sustituciones. Los cambios ocurridos en la segunda y tercera posición, por el contrario, resultarán con mayor probabilidad altamente informativos de las relaciones de parentesco entre las especies, ya que acumulan cambios más lentamente.

Para acomodar estos sesgos en el análisis de MP, se utilizaron dos esquemas de pesado de los caracteres, *a priori* y *a posteriori*. El pesado *a priori* asignó un peso relativo de 2, 5 y 1 a primera, segunda y tercera posición de los tripletes, respectivamente, de acuerdo a las frecuencias relativas de las sustituciones en cada posición, calculadas a partir de las secuencias obtenidas en esta tesis (ver ítem 3.1.1), y de las publicadas por otros autores (Lessa and Cook 1998). El pesado *a posteriori* o pesado dinámico (Williams y Fitch 1989) asigna pesos en base al análisis de las tasas de sustitución de los caracteres distribuidos en un árbol. El método procede construyendo un árbol de MP sin asignación de pesos. A partir del árbol obtenido, el programa calcula algún índice de consistencia para cada uno de los caracteres y luego se repite el análisis, esta vez asignando a cada carácter un valor de peso proporcional al índice calculado. En este caso se utilizó el índice de consistencia (CI, ver ítem 1.4.8 en la Introducción) (Maddison and Maddison 1997), calculado para cada sitio. De esta manera se busca dar un peso de acuerdo al grado de homoplasia que presentó cada sitio en la corrida inicial.

Con el mismo criterio de evitar que las homoplasias originadas por eventos de sustituciones múltiples distorsionen el análisis, se realizó una estimación de la proporción de transversiones respecto de las transiciones mediante el programa McClade 3.07 (Maddison and Maddison 1997) y se encontró que las últimas superan en 6 veces a las primeras. Se incorporó, entonces, a los análisis de MP una matriz que especifica pesos diferenciales a las transiciones respecto de las transversiones, de tal forma que una transversión represente 6 pasos mientras, que una transición represente 1.

Dado el gran número de secuencias, es decir, de OTUs que integran el análisis, resulta imposible utilizar para la búsqueda del árbol más parsimonioso un método exacto, es decir, que evalúa la totalidad de las topologías posibles. Por lo tanto se empleó un algoritmo heurístico implementado en PAUP 4.0. (ver

ítem 1.4.8). Dado que estas metodologías pueden producir resultados que dependen del orden en que se adicionan las secuencias al análisis (Hillis et al. 1996), se hicieron 20 búsquedas, en cada una alterando al azar el orden de incorporación de las secuencias.

3.1.2.1.1. Árbol de MP con pesado a posteriori

El procedimiento de pesado *a posteriori* es capaz de detectar y cuantificar el nivel de homoplasia que lleva cada sitio. Esto representaría una opción más realista que el pesado *a priori*. Por ello analizaremos en más detalle los árboles resultantes del pesado *a posteriori*, respecto de los resultantes del pesado *a priori*. La figura 13 muestra el consenso estricto de los 6 árboles de MP obtenidos con el esquema de pesado *a posteriori* y una relación de pesos de 6 a 1 para transiciones a transversiones.

En este caso, la congruencia entre los 6 árboles obtenidos es grande, ya que en el consenso estricto (figura 13) sólo se observan politomías en nodos que relacionan especies muy cercanas. Las especies del grupo externo están claramente separadas, indicando la monofilia de *Ctenomys*. Entre éstas, *Tympanoctomys* es la que aparece más cerca de los tuco-tucos, seguida por *Octodontomys* y *Spalacopus*.

Para facilitar la comparación de las topologías resultantes de los diferentes métodos, se asignó un nombre a aquellos grupos de especies que mostraron estar estrechamente relacionados en los tres tipos de análisis (MP, MV y NJ). El nombre refleja, en algunos casos, su distribución geográfica, y en otros toma el nombre de alguna de las especies que lo componen (tabla 3).

Se reconoce en el árbol de la figura 13 un clado del llamado grupo "boliviensis", el cual se asocia con el grupo "boliviano-paraguayo" (tabla 3). A este último se asocian, además, *C. minutus* y las formas ITA y MONTE. Otro clado que se asocia más profundamente a los grupos mencionados contiene otras dos agrupaciones que muestran gran consistencia: el grupo "sur", formado por las especies de la Patagonia, y el grupo "tucumanus". La especie de Bolivia, *C. steinbachi*, se asocia a estos dos grupos en este árbol. El clado denominado grupo "altiplano" aparece asociado a la especie del centro de Chile y Neuquén, *C. maulinus*, y a su vez se relaciona con el grupo "central" (tabla 3).

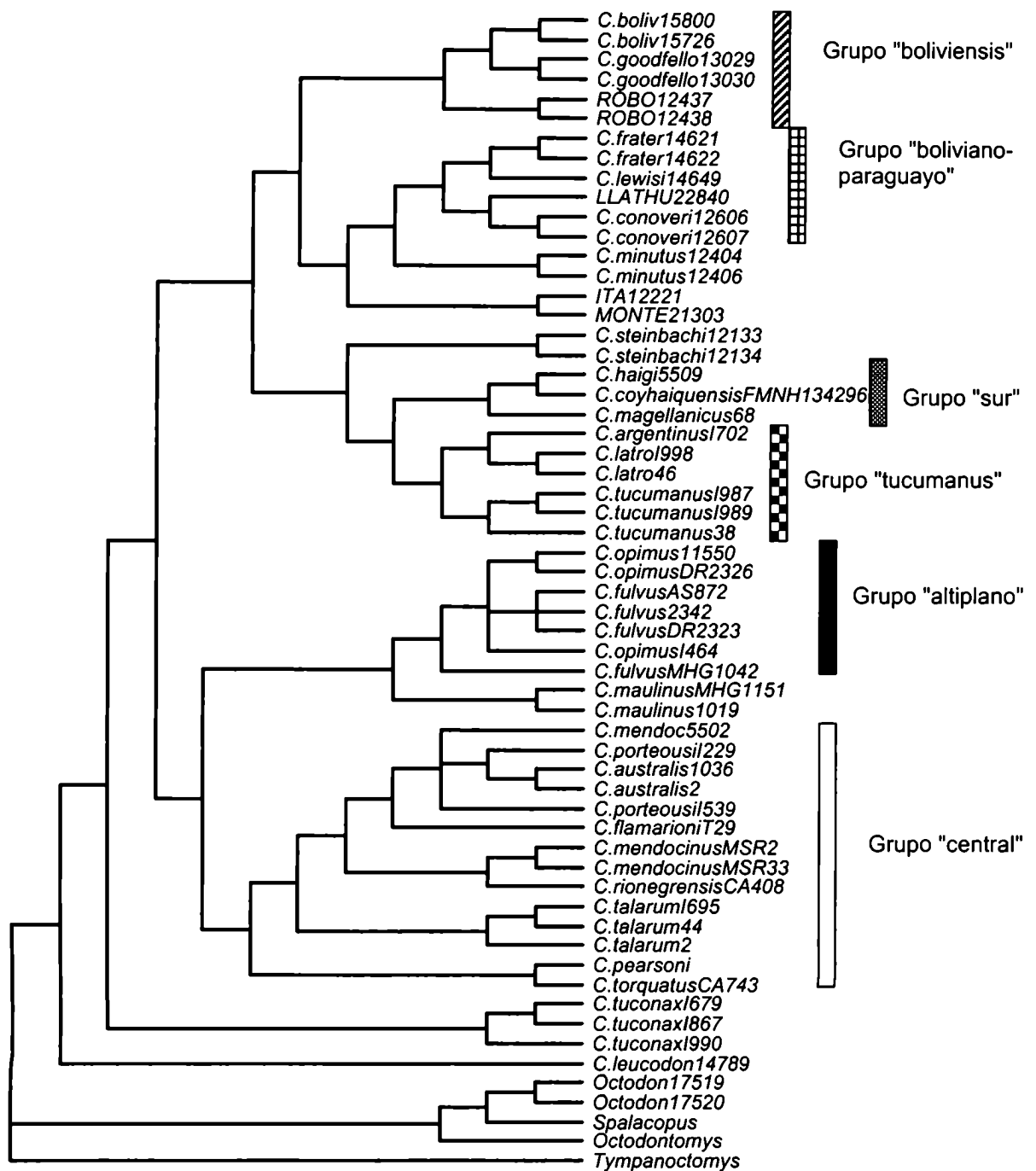


Figura 13: Consenso estricto de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos al utilizar el esquema de pesado *a posteriori* según el índice de consistencia.

Finalmente, *C. tuconax* y *C. leucodon* ocupan las posiciones más basales entre las especies de *Ctenomys*.

Grupo	Especies integrantes
“boliviensis”	<i>C. boliviensis</i> – <i>C. goodfellowi</i> – ROBO
“boliviano-paraguayo”	<i>C. frater</i> – <i>C. lewisi</i> – <i>C. conoveri</i> – LLATHU
“altiplano”	<i>C. opimus</i> – <i>C. fulvus</i>
“sur”	<i>C. haigi</i> – <i>C. coyhaiquensis</i> – <i>C. magellanicus</i>
“tucumanus”	<i>C. argentinus</i> – <i>C. latro</i> – <i>C. tucumanus</i>
“central”	<i>C. porteousi</i> – <i>C. australis</i> – <i>C. mendocinus</i> – <i>C. rionegrensis</i> – <i>C. flamarioni</i> – <i>C. talarum</i> – <i>C. pearsoni</i> – <i>C. torquatus</i>

Tabla 3: Agrupamientos de especies consistentemente recuperados en los análisis.

3.1.2.1.2. Árbol de MP con pesado *a priori*

Este esquema de pesado, que asigna peso a los caracteres de acuerdo a su posición en un codón, produjo 42 árboles de MP. El consenso estricto de los mismos se muestra en la figura 14. Los agrupamientos mencionados en el punto anterior se mantienen en este resultado, aunque en la mayoría de los casos cambia la relación entre ellos. El grupo “boliviano-paraguayo”, que continúa asociado a *C. minutus*, se agrupa ahora con el grupo “altiplano” y, a su vez, con el grupo “boliviensis”. Los grupos “sur” y “tucumanus” continúan relacionados entre sí. La politomía que se aprecia en este consenso estricto indica que, entre las 42 topologías producidas, existen diferencias en el orden de divergencia de varios linajes principales. Igual que en el caso anterior, *C. tuconax* y *C. leucodon* son los linajes que divergen primero.

Las similitudes y diferencias entre los árboles generados con pesado *a priori* y *a posteriori* están dando idea de la estabilidad en los nodos que relacionan a los grupos mencionados en la tabla 3, y de la inestabilidad de los nodos que relacionan a estos grupos entre sí.

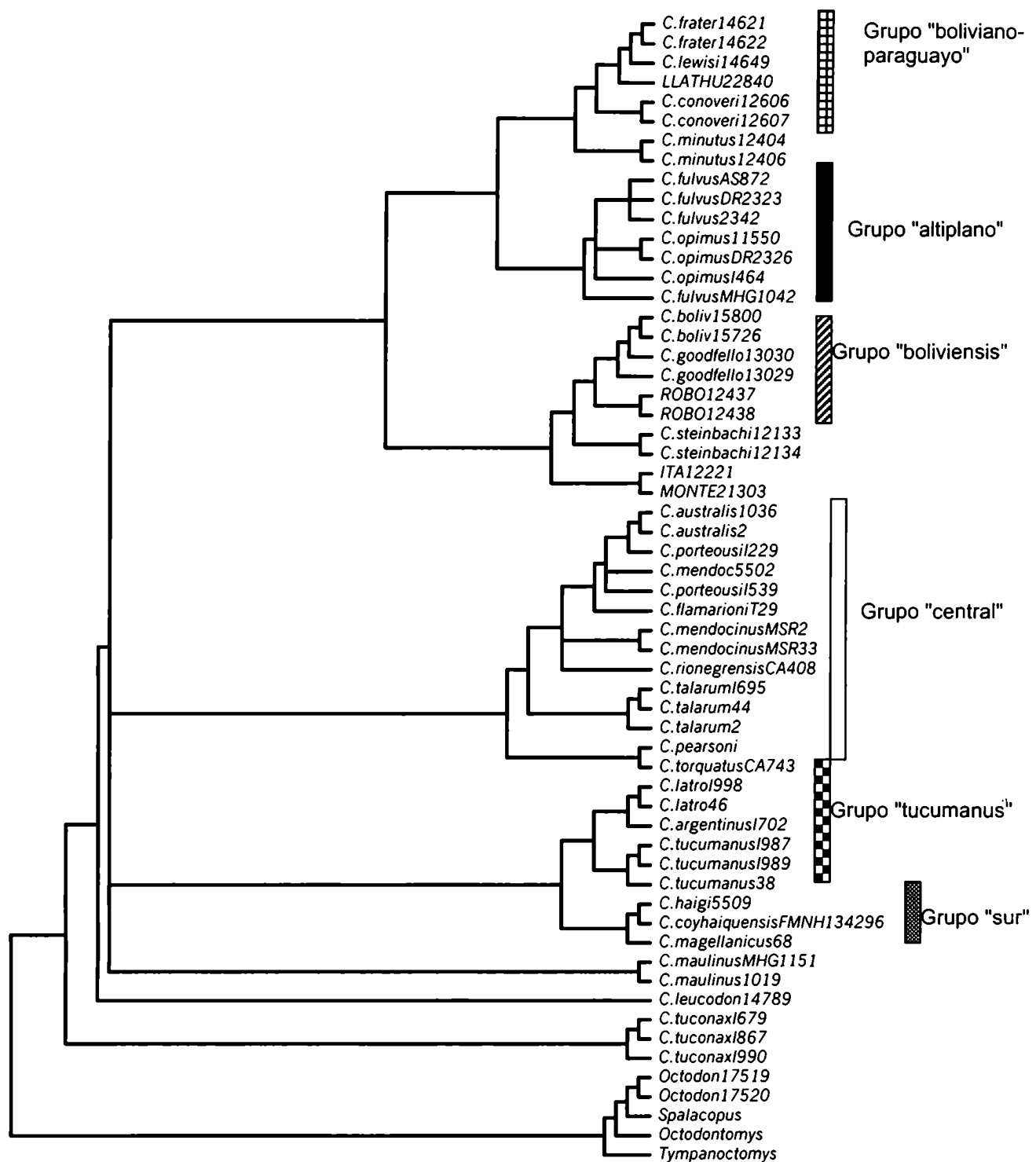


Figura 14: Consenso estricto de los 42 árboles más parsimoniosos utilizando el esquema de pesado *a priori* según posición en el triplete (2:5:1) y una relación de transiciones a transversiones de 6 a 1.

3.1.2.1.3. Análisis de bootstrap en MP

Para determinar el grado de soporte que brindan los datos a cada uno de los clados que surgen del análisis de MP, se realizaron análisis de *bootstrap* (ver ítem 1.4.9 en la Introducción) con 500 pseudoréplicas, utilizando los mismos esquemas de pesos que se mencionaron.

La figura 15 muestra el árbol de *bootstrap* con el esquema de pesado *a posteriori*. Otra vez, los agrupamientos mencionados en la tabla 3 mantienen su integridad y, excepto los grupos “sur” y “tucumanus”, los demás grupos surgen de una gran politomía. Los grupos “boliviensis”, “boliviano-paraguayo”, “altiplano”, “sur” y “tucumanus” recibieron un soporte de *bootstrap* mayor al 80%; el grupo “central” recibió un soporte moderado, del 68%. *C. leucodon* y *C. tuconax* conservan la posición basal, aunque con soportes moderados a bajos, del 67% y del 59%.

El *bootstrap* con el esquema de pesado *a priori* (figura 16) generó un árbol menos resuelto que el obtenido con pesado *a posteriori* (figura 15). Sólo permanecen intactos los grupos “boliviano-paraguayo”, “altiplano” y “sur”, este último con un soporte moderado, del 68%. Además, la mayoría de los nodos internos del árbol han colapsado en una politomía ubicada en la base.

3.1.2.2. Máxima verosimilitud

Dado que el análisis de MV es sumamente intensivo en cuanto a los requerimientos computacionales, se seleccionó de un total de 58 secuencias, un subconjunto de 40 secuencias, manteniendo un representante de cada especie o forma, excepto para aquellos taxones con valores de divergencia intraespecífica superior al 1,5%.

Para determinar cuál es el modelo de evolución que mejor representa a los datos, se utilizó el programa Modeltest 3.06 (Posada and Crandall 1998).

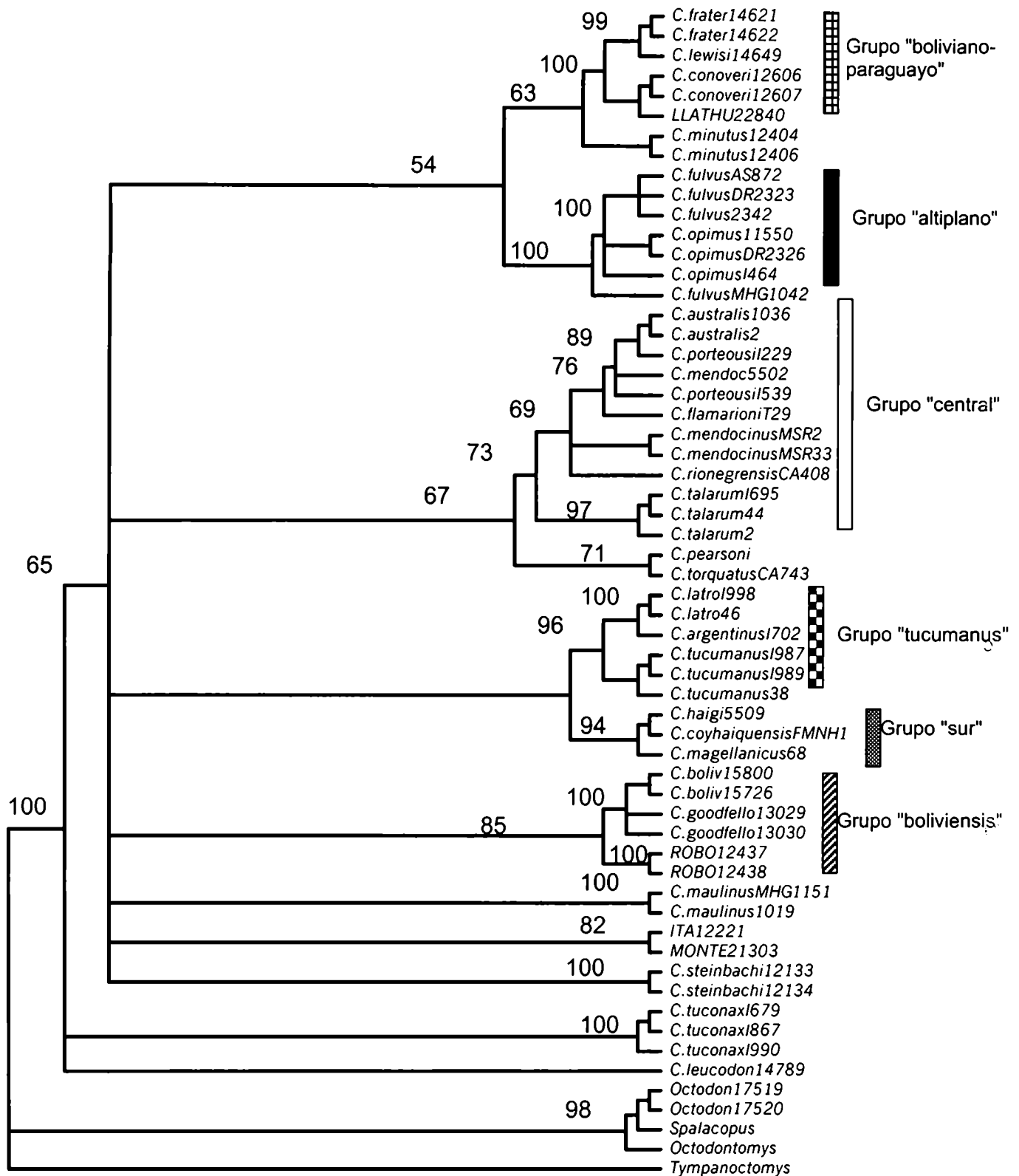


Figura 15: Bootstrap de 500 pseudoréplicas utilizando el esquema de pesado *a posteriori*. Los números en las ramas indican el porcentaje de soporte de los nodos. Los nodos con soporte menor al 50% colapsan formando politomías.

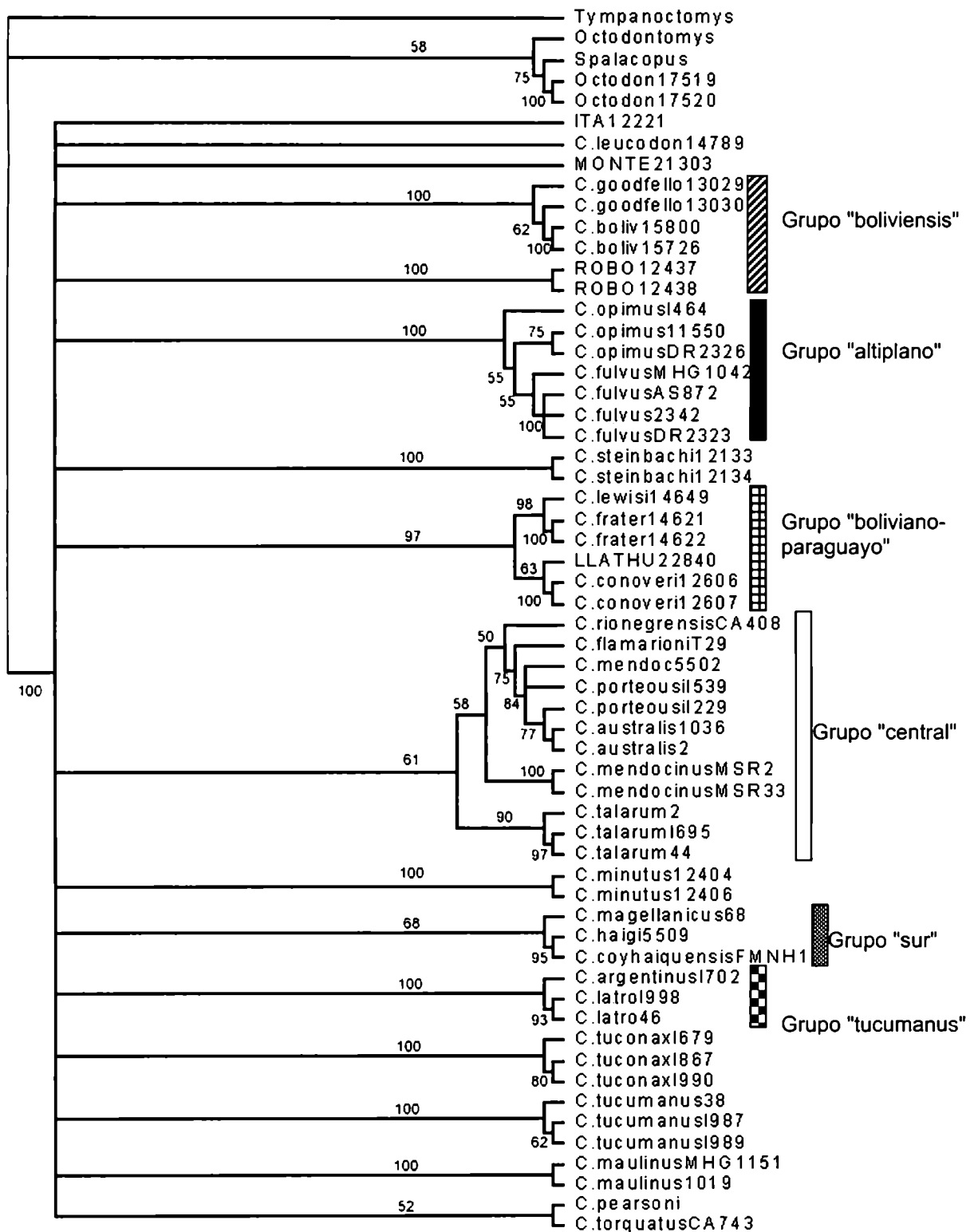


Figura 16: Consenso de 500 pseudoréplicas del *bootstrap* construido por el método de MP. Los números indican el porcentaje de *bootstrap*. Se utilizó una relación de transiciones a transversiones de 6 a 1, y pesos relativos de 2, 5 y 1 para las posiciones de los tripletes. El círculo () indica que el grupo no está completo.

Este programa estima el estadístico:

$$\delta = -2 \log \Lambda,$$

siendo:

$$\Lambda = \frac{\max[L_0(\text{modelo nulo})]}{\text{Max}[L_1(\text{modelo alternativo})]}$$

L_0 es la verosimilitud bajo la hipótesis nula (el modelo más simple), y L_1 es la verosimilitud bajo la hipótesis alternativa (el modelo más complejo). El estadístico δ sigue una distribución χ^2 con grados de libertad iguales a la diferencia en el número de parámetros libres entre los dos modelos. El programa calcula el L (verosimilitud) para una sucesión de modelos cada vez más complejos y propone el modelo que mejor se ajusta a los datos, con el mínimo número posible de parámetros (Posada and Crandall 1998). Como se ha mencionado en la Introducción (ítem 1.4.8), el método de MV permite incorporar modelos explícitos que describen el proceso de evolución molecular. Por lo tanto, la selección adecuada de un modelo de evolución nucleotídica es muy importante para aprovechar la ventaja de este método en cuanto a lograr un análisis más realista, teniendo en cuenta la combinación de parámetros que mejor describen la evolución del marcador que se utiliza.

El modelo seleccionado por el programa Modeltest fue el **GTR + G + I**, *general time reversible* con gamma y proporción de sitios invariantes (ver ítem 1.4.3). Los valores estimados de los parámetros fueron:

Proporción asumida de sitios invariantes (I)= 0,5

Parámetro α de la distribución **G** = 1,3

Matriz de sustituciones:

	A	C	G	T
A	-	7,36	55,75	6,65
C			4,63	70,5
G				1,0

El análisis de MV se llevó a cabo empleando el programa PAUP 4.0 especificando el modelo y los valores propuestos por Modeltest (Posada and Crandall 1998). La frecuencia de cada nucleótido fue calculada a partir de los datos. La técnica de *bootstrap* no fue utilizada con este método ya que resulta imposible debido a los enormes tiempos requeridos. Por ejemplo, 10 corridas realizadas con esta matriz de datos requirieron más de dos semanas de cómputo ininterrumpido.

Para lograr una búsqueda heurística confiable, se llevaron a cabo 10 corridas con diferentes órdenes de incorporación de secuencias, produciéndose como resultado dos árboles que no difieren significativamente en su valor de In Likelihood ($P > 0,05$) según el test de Kishino-Hasegawa (Kishino and Hasegawa 1989), que consiste en evaluar la significación estadística de la diferencia entre los valores de InL de dos topologías.

A continuación se muestra parte de la salida del programa:

```
Heuristic search completed
Total number of rearrangements tried = 1082570
Score of best tree(s) found = 8151.48740
Number of trees retained = 2
Time used = 390:43:49.5
```

Tree-island profile:

Island	Size	First tree	Last tree	Score	First replicate	Times hit
1	1	1	1	8151.48740	1	8

```

2          1          2          2  8151.57900          3          2

```

```
-ln L (unconstrained) = 4465.60944
```

```
Kishino-Hasegawa test results:
```

Tree	-ln L	Diff	-ln L	s.d. (diff)	T	P*
1	8151.48740		(best)			
2	8151.57900	0.09160		7.26321	0.0126	0.9899

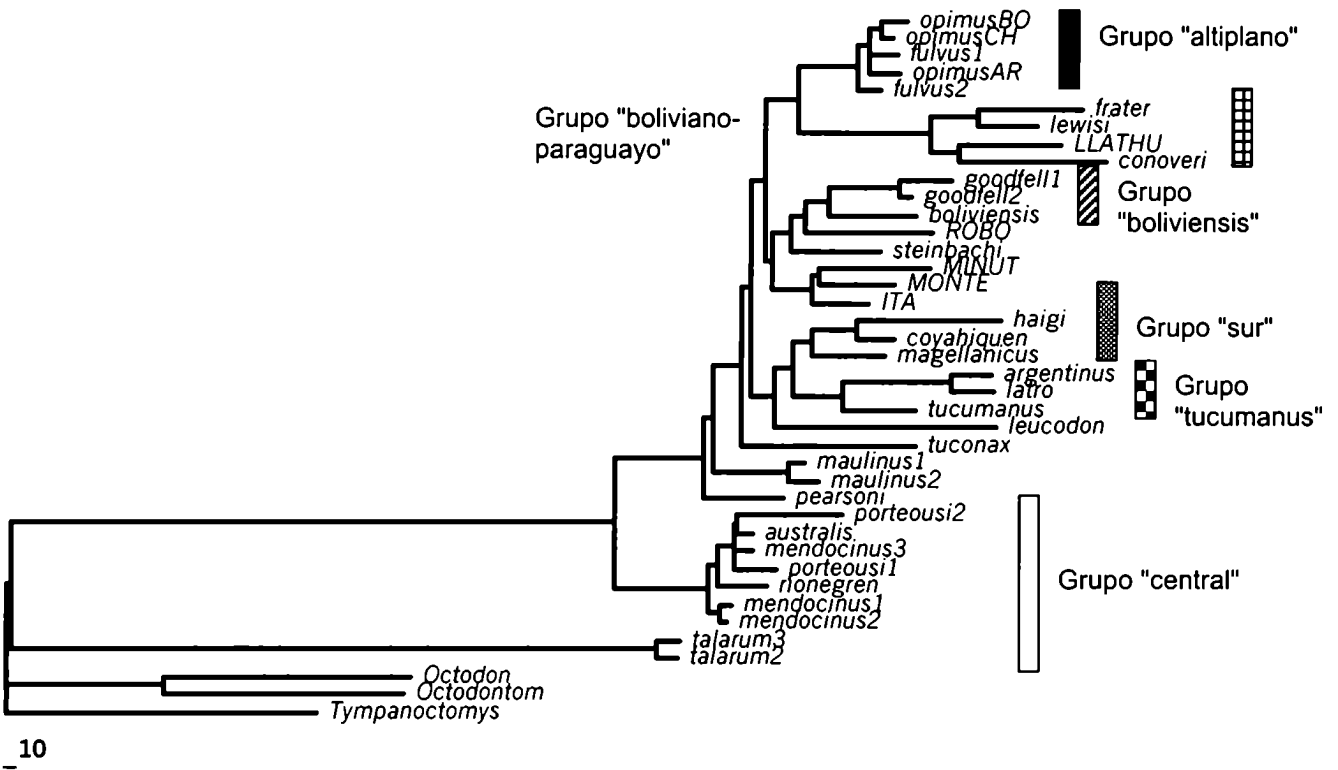
```
* Probability of getting a more extreme T-value under the null
hypothesis of no difference between the two trees (two-tailed test)
```

En la figura 17 se muestran los dos árboles obtenidos por el método de MV. Los 6 grupos mencionados en la tabla 3 aparecen representados en ambas topologías, cambiando sólo la relación entre los grupos "altiplano", "boliviensis" y "boliviano-paraguayo". Como en los árboles de MP, los grupos "sur" y "tucumanus" aparecen unidos. El grupo "central", en cambio, queda reducido a las especies del grupo mendocinus (tener en cuenta que, de acuerdo a lo mencionado, algunas especies de este grupo no han sido incluidas en este análisis). La ubicación basal de *C. talarum*, una de las especies de este grupo, sin embargo, no aparece en los árboles resultantes de los otros métodos filogenéticos, así como tampoco la disociación de *C. pearsoni* del grupo "central".

La cercana relación de los grupos "boliviensis" con el "boliviano-paraguayo" se mantiene, tanto en los árboles de MV (figura 17) como en los de MP (figuras 13 a 15). Las especies *C. leucodon* y *C. tuconax* no aparecen en la base del género, como lo hacían en los árboles de MP; más aún, su posición es diferente en los dos árboles obtenidos por ML.

Los métodos de MV generan árboles cuyas ramas son proporcionales a los cambios ocurridos. En la figura 17 puede verse que las ramas más basales del género, que definen a los principales linajes o grupos, son muy cortas. Es decir, las sustituciones ocurridas entre estas divergencias son pocas. Esto

PAUP_1



PAUP_2

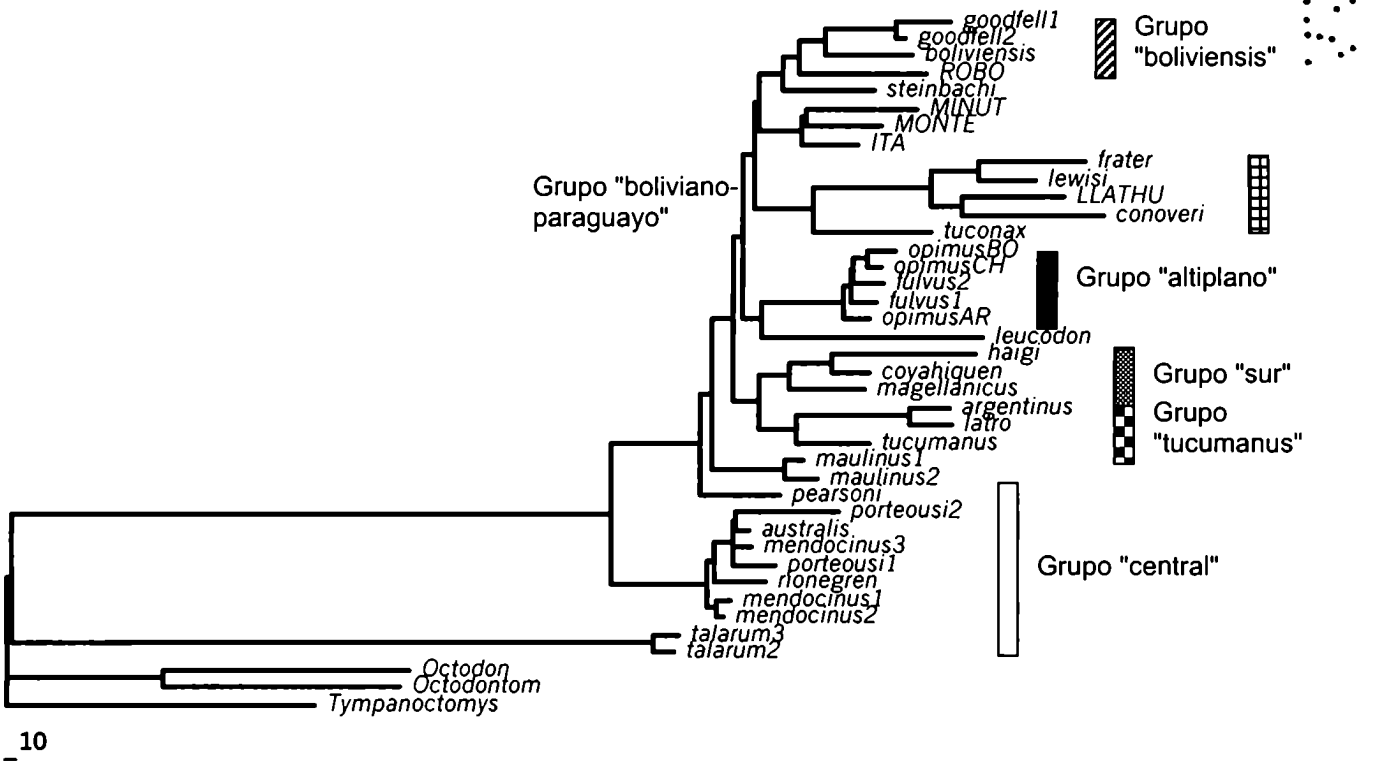


Figura 17: Los dos mejores árboles obtenidos con el método de Máxima Verosimilitud.

explica, en parte, la dificultad de obtener en forma consistente la resolución de las relaciones entre estos linajes basales del género.

3.1.2.3. Método de distancia

Para generar la matriz de distancias a emplearse en la construcción de un árbol de distancias, se utilizaron los parámetros y el modelo de evolución obtenidos mediante el programa Modeltest (Posada and Crandall 1998). Como se mostró en el ítem 3.1.2.2, el modelo de evolución seleccionado fue **GTR + G + I**. El algoritmo NJ de construcción de árboles fue utilizado porque no asume que las tasas de evolución sean constantes, como lo hacen, por ejemplo, otros algoritmos de distancia como UPGMA, que supone constancia en las tasas de evolución de las secuencias en todas las ramas del árbol (Hillis et al. 1996). El algoritmo NJ considera, en cambio, posibles diferencias en las tasas de evolución (Saitou y Nei 1987).

El árbol obtenido bajo los parámetros mencionados se muestra en la figura 18. Nuevamente, los grupos definidos en la tabla 3 mantienen su integridad en este caso. *C. tuconax* ocupa la posición basal respecto del resto de los géneros, como en MP (figuras 13 a 15). Como en el árbol de MP pesado *a priori* (figura 14), el grupo "boliviensis" está asociado al grupo "altiplano", aunque separados del grupo "boliviano-paraguayo", el cual ocupa una posición ancestral que no mostró en los otros análisis. Los grupos "sur" y "tucumanus", que habían permanecido unidos tanto en MP (figuras 13 a 15) como en MV (figura 17), están ahora separados. Al igual que en los árboles de MV, es interesante notar que las ramas que unen los nodos a partir de los cuales surgen los grupos mencionados son muy cortas, es decir, la cantidad de cambio acumulado entre la divergencia de los primeros linajes de tuco-tucos es muy baja.

Respecto de las relaciones dentro de los grupos, las ramas que relacionan las especies que componen los grupos "altiplano" y "central" son cortas. Esto puede ser atribuido a una divergencia reciente entre los miembros, o bien a bajas tasas de evolución del citocromo b en estos linajes. En contraposición, los integrantes de los grupos "boliviano-paraguayo" y "sur" se

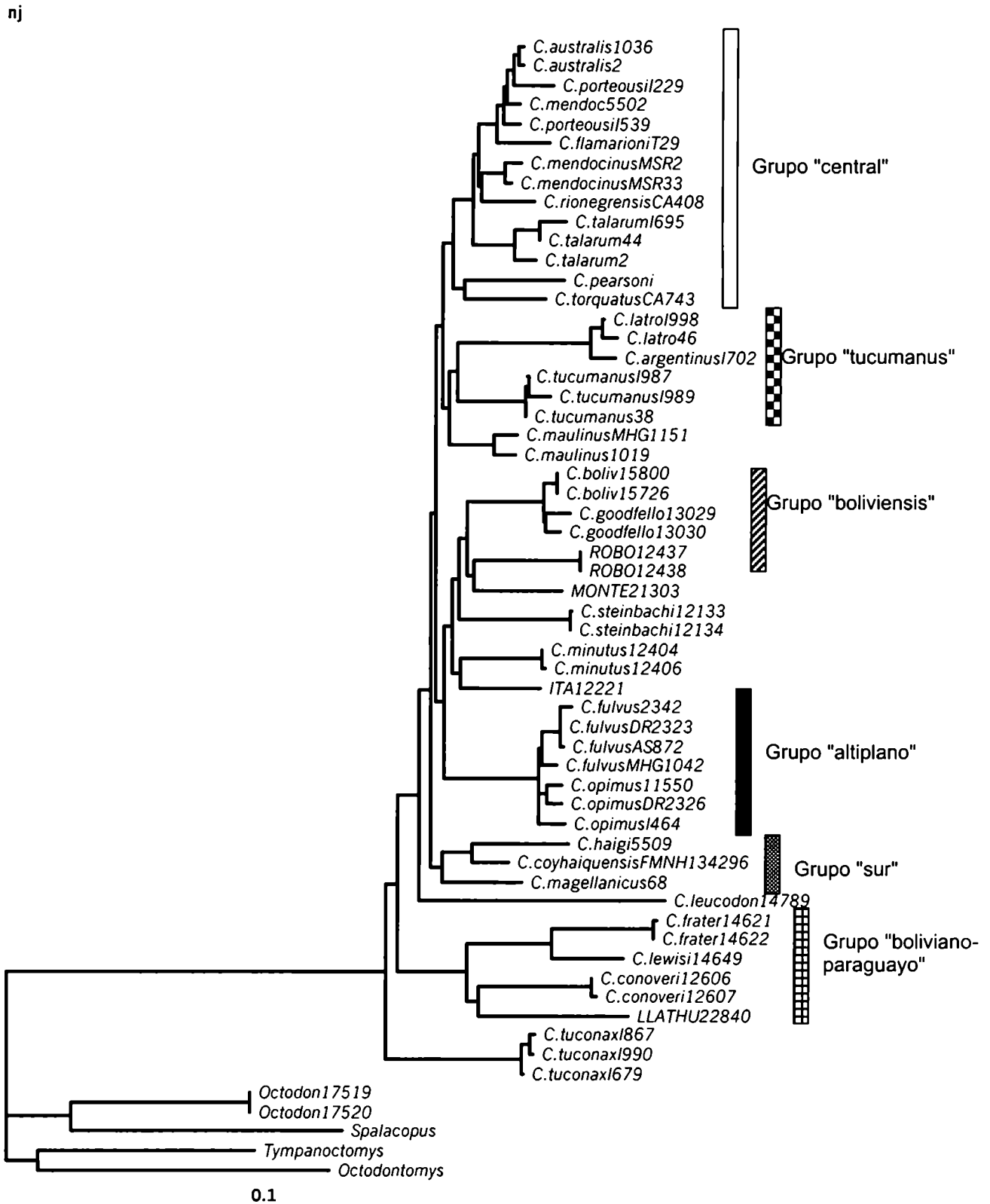


Figura 18: Arbol obtenido por el algoritmo Neighbor-joining a partir de una matriz de distancias utilizando el modelo de evolución GTR gamma.

relacionan entre sí con ramas largas, dando cuenta de una mayor antigüedad, o bien de una aceleración en las tasas de evolución.

Se construyó también un árbol utilizando un modelo de evolución más sencillo, el de Kimura (K2P) (Kimura 1980) considerando, además, diferentes tasas de evolución entre sitios (γ) y proporción de sitios invariantes (I) (ver ítem 1.4.3). El árbol obtenido resultó idéntico en topología, y sus longitudes de ramas fueron muy similares al obtenido bajo modelos más complejos. Un árbol construido con el algoritmo UPGMA (no mostrado) produjo una topología diferente, sugiriendo que existen ramas con tasas de evolución distinta.

El análisis de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) realizado con el algoritmo NJ, provocó el colapso de la mayoría de los nodos en una gran politomía en la base del árbol (figura 19). *C. tuconax* y el grupo "boliviano-paraguayo" ocupan la posición ancestral aunque con bajo soporte, del 62%. El nodo que reúne al grupo "central" permanece con un soporte muy bajo, 54%, pero la asociación del grupo mendocinus más *C. talarum* obtuvo un soporte del 89%. Otros grupos bien soportados son "altiplano" y "boliviano-paraguayo". Sin embargo, los grupos "boliviensis" y "tucumanus" aparecen incompletos.

3.2. Tiempos de divergencia en *ctenominos*

A pesar de que las velocidades de evolución molecular pueden variar sustancialmente entre taxones, en general una molécula dada evoluciona de manera constante dentro de un grupo de especies estrechamente relacionadas. Esto es así porque las velocidades a las que se acumulan mutaciones dependen de factores, como tiempo generacional y fidelidad de copia de las enzimas replicadoras, que habitualmente no varían entre linajes evolutivamente cercanos (Kishino et al. 2001). Estos factores que afectan las tasas de mutación, y que dependerán de características intrínsecas de cada tipo de organismo, con independencia de factores selectivos o de historia poblacional, se llaman "efectos de linaje" (Page and Holmes 1999). Bajo este supuesto, se ha utilizado en muchos grupos de organismos el concepto del reloj molecular para estimar tiempos de divergencia, tomando como referencia datos externos fósiles o biogeográficos (Kishino et al. 2001).

PAUP_1

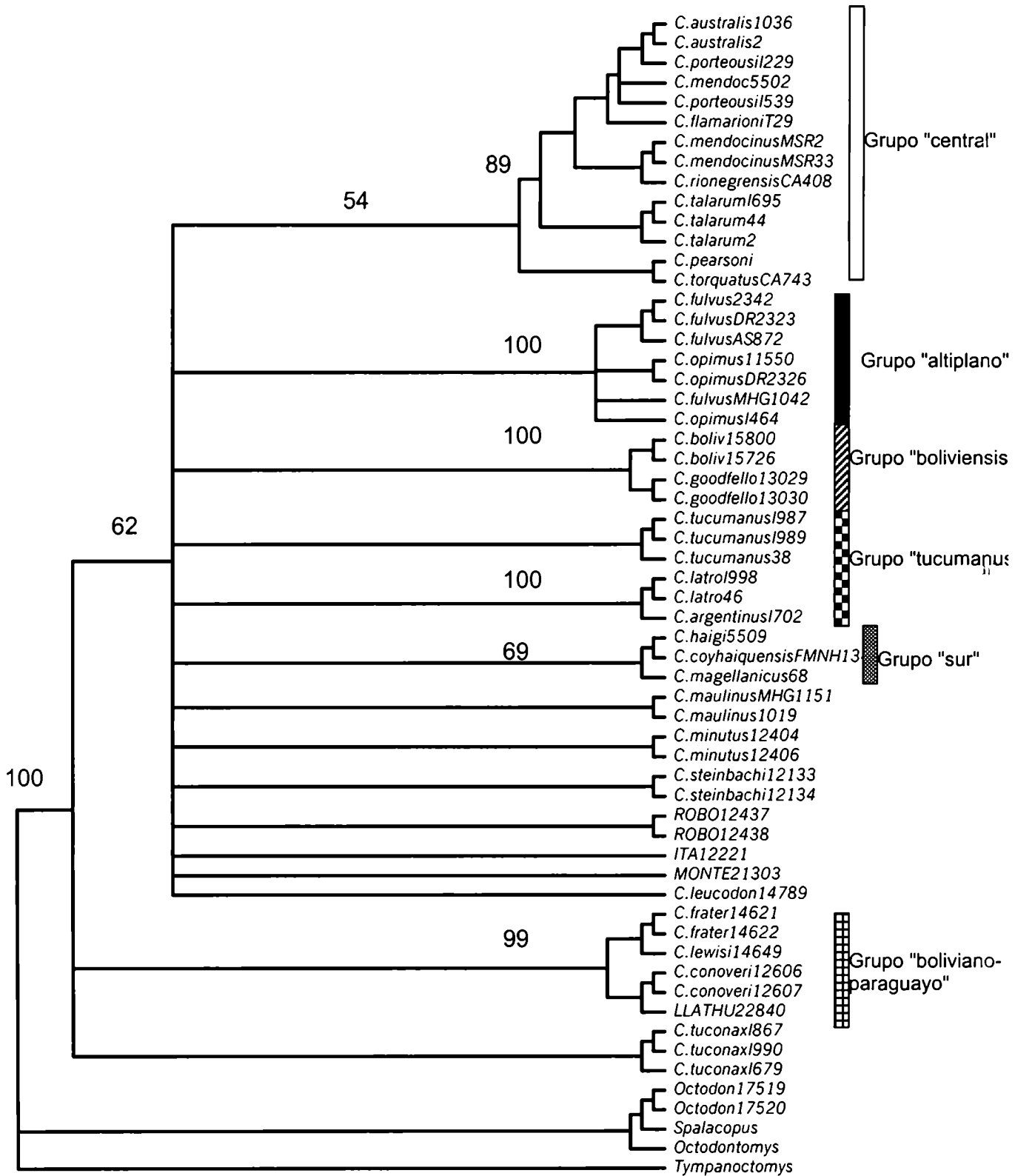


Figura 19: Bootstrap de 1000 pseudoréplicas a partir del algoritmo de distancias neighbor-joining utilizando el modelo de evolución GTR gamma.

Sin embargo, en el caso de los tuco-tucos, la incongruencia entre los árboles obtenidos por los algoritmos UPGMA y NJ, y la presencia de ramas de distinta longitud en los árboles de distancia y MV, llevan a pensar que es posible que existan desviaciones de la constancia de tasa de evolución del citocromo b en algunos linajes, constituyendo una potencial fuente importante de error a la hora de estimar tiempos de divergencia. A fin de identificar ramas que hayan acumulado cambios a una tasa significativamente diferente que el promedio general, se utilizó el método de Takezaki y col. (1995) llamado "prueba de 2 grupos" (*two cluster test*). El método construye un árbol cuyos largos de ramas han sido recalculados de tal forma que resulten proporcionales al tiempo de divergencia (Russo et al. 1995, Takezaki et al. 1995).

Se utilizó en este caso una matriz de secuencias, en la cual se mantuvo sólo un representante de cada especie, excepto donde la variación intraespecífica fue mayor al 0,3%, quedando 49 secuencias. El programa llamado Lintre (Takezaki et al. 1995) genera un árbol con el algoritmo de NJ utilizando el modelo de Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984). La tabla 4 muestra la diferencia (δ) en longitud de las dos ramas que surgen de todos los nodos. Este valor resulta significativamente diferente al promedio general cuando el valor de CP (ver tabla 4) es mayor a 95%. De acuerdo a este criterio, para construir el árbol linealizado se excluyeron del análisis a las especies *C. haigi*, *C. leucodon* y la rama de *C. argentinus* y *C. latro*, ya que muestran sustancial variación en tasa de evolución de la secuencia del citocromo b. Takezaki y col. (1995) señalaron que la presencia de algunas ramas de longitud significativamente distinta al promedio no produce, en la práctica, efectos notables en el árbol linealizado y por lo tanto tampoco afectan al cálculo del tiempo de divergencia. Sin embargo, el árbol linealizado construido sin eliminar las especies que presentaban ramas largas presentó algunas diferencias, principalmente en la profundidad relativa de algunos nodos. Por esta razón se prefirió mantener fuera del árbol las ramas divergentes.

La figura 20 muestra el árbol linealizado obtenido con el programa Lintre. La escala que se presenta debajo del mismo ha sido construida considerando 10 MA para la divergencia entre las dos subfamilias de octodóntidos (Quintana 1994; Verzi 1999). El primer dato importante que surge de este análisis es la

nodo	delta	s.e.	Z	CP
57	0.005101	0.007018	0.726880	52.84%
54	0.002058	0.006179	0.333119	25.86%
61	0.004809	0.006535	0.735958	53.46%
53	0.001300	0.001800	0.722120	52.84%
75	0.013807	0.005083	2.716066	99.34%
87	0.002235	0.005022	0.444996	34.00%
69	0.001033	0.002993	0.345099	26.62%
62	0.000844	0.000885	0.954120	65.78%
63	0.001182	0.001296	0.911633	63.72%
64	0.000045	0.002192	0.020489	1.60%
65	0.002041	0.002574	0.792988	57.04%
66	0.000493	0.002576	0.191226	15.06%
67	0.000375	0.002464	0.152154	11.92%
92	0.007112	0.005081	1.399721	83.54%
81	0.002250	0.005380	0.418268	31.82%
68	0.005203	0.002691	1.933284	94.64%
70	0.001675	0.002265	0.739651	53.46%
78	0.003249	0.003747	0.867017	61.02%
71	0.001191	0.001986	0.599969	44.48%
72	0.002914	0.003277	0.889216	62.12%
73	0.004065	0.002578	1.576535	88.36%
74	0.000910	0.002616	0.347914	26.62%
77	0.004252	0.003339	1.273379	79.60%
79	0.003223	0.002816	1.144587	74.58%
80	0.002674	0.004026	0.664213	49.08%
88	0.000929	0.003853	0.241118	18.96%
58	0.004470	0.002043	2.188650	97.08%
55	0.001143	0.001960	0.582925	43.80%
56	0.001211	0.003020	0.400931	31.08%
83	0.017229	0.006098	2.825605	99.52%
96	0.012400	0.004537	2.732984	99.36%
95	0.001523	0.003900	0.390523	30.34%
84	0.003234	0.005638	0.573670	43.14%
86	0.000809	0.005184	0.156101	11.92%
59	0.001461	0.002935	0.497846	37.58%
60	0.001988	0.002187	0.909351	63.18%
85	0.001911	0.005727	0.333649	25.86%
90	0.001481	0.005700	0.259844	19.74%
91	0.001883	0.003921	0.480105	36.88%
94	0.001565	0.003060	0.511335	39.00%
93	0.002777	0.003266	0.850231	60.46%
89	0.015915	0.006176	2.576845	98.98%
82	0.000232	0.005037	0.046048	3.20%
76	0.010234	0.005895	1.735982	91.64%

Tabla 4: Salida del programa Lintre (Takezaki et al. 1995). La primer columna (nodo) indica los nodos de un árbol de distancias generado por el programa. Delta es la diferencia en las longitudes de las ramas que parten de cada nodo. S.E. es la desviación standard, Z es Delta/s.e. y CP la probabilidad de confianza. Para valores de CP mayores a 95%, la diferencia en las longitudes de ramas es significativa al 5%. Se resaltan los nodos que corresponden a *C. leucodon*, *C. haigi*, *C. argentinus* y *C. latro*, cuyos valores de CP son mayores a 95%.

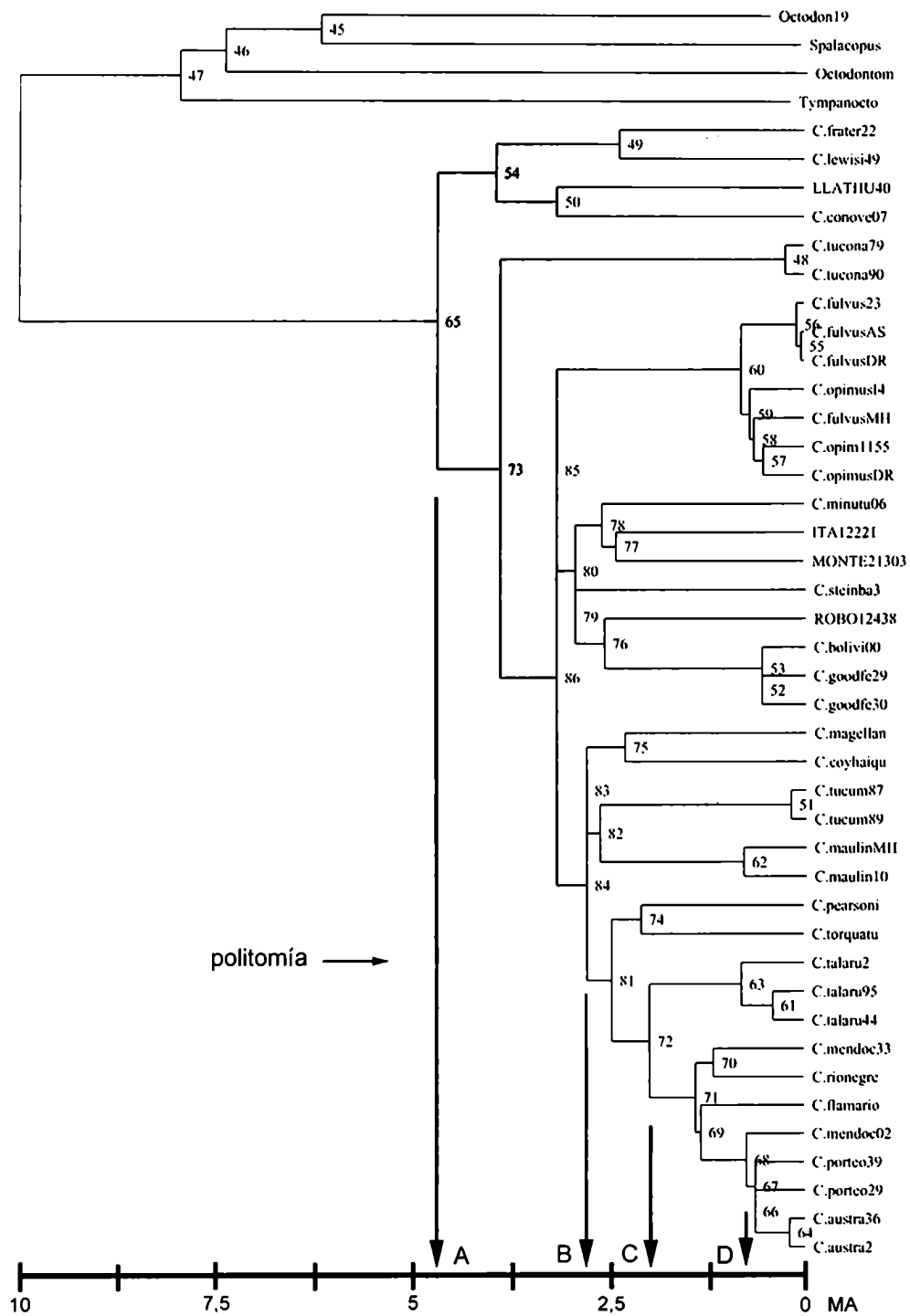


Figura 20: Árbol linealizado construido con el programa Lintre. La escala de tiempo indica millones de años (MA) desde el presente y está calibrada con la fecha de la divergencia entre octodontinos y ctenominos (10 MA).

edad del género *Ctenomys*: casi 5 millones de años (figura 20, nodo 65, flecha A), cuando se inicia la extensa cladogénesis que da origen a la mayoría de los linajes representados en este estudio. Este tiempo es bastante anterior a los 1,8 – 2 millones de años previamente sugeridos (Reig 1989; Reig et al. 1990).

En el otro extremo de la escala temporal, alrededor de 600.000 años atrás, es decir en tiempos muy recientes, se habría producido la divergencia *C. boliviensis* – *C. goodfellowi* (nodos 52 y 53 en la figura 20, flecha D). Hay otros dos nodos que divergen hacia la misma fecha: el nodo *C. opimus* – *C. fulvus* (nodo 60 en la figura 20), y el que reúne al grupo mendocinus *sensu* Massarini y col (1991) (nodo 71). Curiosamente, en todos estos casos, está en discusión si estos taxones son especies plenas o si se trata de formas diferentes de una misma especie (Gallardo 1979; Massarini et al. 1991; Cook and Yates 1994). *C. maulinus* y *C. talarum*, dos especies claramente diferenciadas y establecidas, presentan una divergencia intraespecífica en los mismos niveles de antigüedad que los clados mencionados, por lo que lo reciente de la fecha de diversificación no debería ser un argumento en contra de su condición de especies plenas. Si se considera que *C. opimus* y *C. fulvus* constituyen, en realidad, una única especie, del mismo modo que los integrantes del grupo mendocinus, la divergencia de las especies actuales de *Ctenomys* se habría producido entre los 1,75 (nodo 72, flecha C) y los 5 millones de años (nodo 65, flecha A), es decir, en un lapso de unos 3,25 millones de años. Si, por el contrario, se considera tanto a *C. opimus*, *C. fulvus*, *C. goodfellowi* y *C. boliviensis* y a los miembros del grupo mendocinus como especies plenas, la diversificación de los tuco-tucos habría abarcado unos 4,4 millones de años. Por otro lado, el tiempo comprendido entre el comienzo de la diversificación del género (flecha A en la figura 20) y el origen del primero de los clados que no caen en la politomía basal (nodo 84, flecha B en la figura 20), puede estimarse en unos 2 millones de años (ver figura 20, barra gris). Durante este intervalo se habría producido la radiación inicial que generó los principales linajes del género, aunque no es posible decidir si esta primera cladogénesis ocupó todo el intervalo o si tuvo lugar durante un período más restringido.

3.3. Evolución del número de copias de SRPC

3.3.1. Número de copias de SRPC

Para comprender los procesos implicados en la evolución del satélite SRPC en los tuco-tucos, es importante medir el grado de amplificación del satélite. Se llevó a cabo la cuantificación del número de copias de satélite presentes en los genomas de las especies que forman parte de esta tesis, extendiendo las mediciones iniciales de Rossi y col. (1993b) hasta un total de 32 especies y formas, incluyendo a *Octodon*, *Octodontomys* y *Tympanoctomys*.

La tabla 5 resume los resultados obtenidos con la técnica de *dot blot* realizado en condiciones de baja rigurosidad (6X SSC, 60°C). El número de copias de SRPC en cada especie se estimó por comparación con la intensidad de señal obtenida, al hibridar la sonda SRPC con una masa conocida de plásmidos que llevan como inserto un clon de un único monómero de SRPC de *C. porteusi* (Rossi et al. 1990), y teniendo en cuenta que el contenido de ADN por genoma haploide de los tuco-tucos oscila alrededor de los 7 pg (Ruedas et al. 1993). Las manchas circulares corresponden al revelado de la señal radioactiva provocada por la hibridación de la sonda a 1µg, 100ng y 10ng de ADN genómico, respectivamente.

Los valores de número de copias van desde $6,6 \times 10^6$ copias en *C. haigi* a 2.000 copias en *C. opimus*, *C. fulvus* y *C. tucumanus*, es decir que el satélite exhibe un rango de varios órdenes de magnitud en la variación en el número de copias. Esta enorme variación en el número de copias de SRPC refleja una dinámica muy importante de este satélite en el genoma de los tuco-tucos.

Los resultados pueden ser considerados, sencillamente, como el valor que alcanzó el satélite, tanto como producto de una o unas pocas amplificaciones importantes, o bien como el de una sucesión de amplificaciones de pequeña magnitud. Una hipótesis más compleja podría interpretar la distribución actual en el número de copias como el resultado neto de amplificaciones y también de deleciones, producidas tanto en los linajes actuales como en los ancestrales.

especie	señal	Nro. de copias	especie	señal	Nro. De copias
<i>C. haigi</i>		6.665.000	MONTE		410.000
<i>C. porteousi</i>		4.690.000	ITA		327.000
<i>C. australis</i>		4.362.000	<i>Octodon</i>		250.000
<i>C. leucodon</i>		3.596.000	<i>C. tuconax</i>		244.000
<i>C. talarum</i>		3.456.000	<i>C. latro</i>		229.000
<i>C. frater</i>		3.390.000	<i>C. coyhaiquensis</i>		150.000
<i>C. rionegrensis</i>		3.229.000	<i>C. maulinus</i>		22.000
<i>C. mendocinus</i>		3.217.000	MINUT		21.000
<i>C. pearsoni</i>		2.806.000	<i>C. steinbachi</i>		20.000
<i>C. conoveri</i>		2.331.000	<i>C. magellanicus</i>		19.000
<i>C. lewisi</i>		1.974.000	<i>Tympancotomys</i>		18.000
<i>C. goodfellowi</i>		1.854.000	<i>Octodontomys</i>		16.000
<i>C. boliviensis</i>		1.205.000	<i>C. opimus</i> (Bolivia)		2.000
LLATHU		969.000	<i>C. opimus</i> (Arg.)		2.000
ROBO		660.000	<i>C. fulvus</i>		2.000
<i>C. argentinus</i>		586.000	<i>C. tucumanus</i>		2.000

Tabla 5: Cuantificación del número de copias de SRPC en especies de *Ctenomys* y los octodontinos *Tympanoctomys*, *Octodon* y *Octodontomys*. Las tres manchas corresponden a la señal radioactiva emitida por la sonda SRPC al hibridar con 1 microgramo, 100 y 10 nanogramos de ADN genómico respectivamente.

3.3.2. Estimación del número de copias de SRPC en nodos ancestrales de la filogenia

El modo de evolución de los procesos de amplificación y/o reducción del número de copias en *Ctenomys* podría interpretarse exclusivamente a partir de la distribución del carácter número de copias en las especies actuales en el marco de las relaciones filogenéticas de las mismas. Sin embargo, se considera que resultaría muy ventajoso estimar el contenido de SRPC en los ancestros hipotéticos de los tuco-tucos, porque estos datos permitirían explicar la evolución del satélite SRPC y no sólo describir su estado actual. Se introdujo este enfoque, que combina datos moleculares y técnicas filogenéticas, e integra las fluctuaciones en el número de copias del satélite SRPC con los patrones de evolución cromosómica (ver Discusión).

Existen dos metodologías para estimar estados ancestrales de caracteres sobre una filogenia. El enfoque usual ha sido reconstruir estados ancestrales por el criterio de MP (Maddison and Maddison 1997). Sin embargo, este método no es capaz de estimar el error, lo cual es importante para evaluar la utilidad y precisión de la estimación, particularmente en el caso de caracteres continuos, como es el caso del número de copias del satélite SRPC (Schluter et al. 1997). El otro método, desarrollado por Schluter y col. (1997) permite inferir estados ancestrales de caracteres continuos basándose en algoritmos de MV, y tiene la ventaja de cuantificar la precisión de la estimación. El modelo de cambio evolutivo sobre el que se realiza la inferencia se inspira en un proceso de movimiento browniano, cuyos supuestos son que la probabilidad de cambio en un punto no depende de los estados previos y que las transformaciones a lo largo de cada rama son independientes de los cambios en cualquier otro lugar del árbol, y que la tasa de cambio del carácter es constante en el tiempo (Felsenstein 1985b). Este último supuesto, empero, podría ser visto como una limitación, dado que puede ser violado por las discontinuidades en el proceso de amplificación y delección de SRPC. Sin embargo, la estimación mostró ser robusta e informativa, dado que los errores en los valores estimados en los nodos son inferiores al rango de variación de los valores en los nodos terminales (especies existentes). Se utilizó el programa ANCML (Schluter et al. 1997) para inferir el número de copias del satélite SRPC, considerándolo como

un carácter continuo. El programa se alimentó con la topología obtenida por el método de MV, en base a las secuencias del gen citocromo b por un lado, y los datos de número de copias de SRPC, por el otro (tabla 5). Aprovechando la flexibilidad del programa, que acepta diferentes formatos de archivos de árboles, se tomó la decisión de utilizar el árbol de MV teniendo en cuenta que al incorporar un modelo explícito de evolución de secuencias, el cómputo de las longitudes de ramas sería más realista. De los dos árboles de MV mostrados en la figura 17 se utilizó el de mayor valor de verosimilitud (figura 17, parte superior).

La figura 21 muestra el árbol de MV con los valores de número de copias de SRPC en los nodos inferidos por ANCML, junto con el error de la estimación. Se muestran sólo los valores que difieren en más del 25% respecto de sus vecinos. Para una mejor interpretación de la evolución de los números de copias de SRPC se agregaron los valores de las especies actuales (ver ítem 3.3.1).

El resultado sugiere que el SRPC permaneció relativamente estable en alrededor de $1,5 \times 10^3$ copias a lo largo de las ramas basales del género. A pesar de que esta es un área de poca resolución filogenética, parece haber habido poca variación en estas ramas. Subsecuentemente, sustanciales incrementos en el número de copias han ocurrido en la rama que conduce al grupo mendocinus, seguido por valores relativamente constantes en las ramas terminales de este clado. Dado que *C. talarum* está estrechamente relacionado al grupo mendocinus (ambos taxones pertenecen al grupo que aquí denominamos "central", ítem 3.1.3), probablemente las dos amplificaciones señaladas por flechas en la figura 21 correspondan, en realidad, a una única amplificación.

También han ocurrido importantes deleciones a lo largo de ramas internas del árbol. Por ejemplo, el ancestro del grupo "altiplano" ha experimentado una reducción de 17 veces en el número de copias de SRPC, conservándose los bajos valores a lo largo de las ramas terminales de dicho clado.

En contraste, varios grupos bien definidos muestran sustancial variación interna en el número de copias, implicando cambios relativamente recientes y

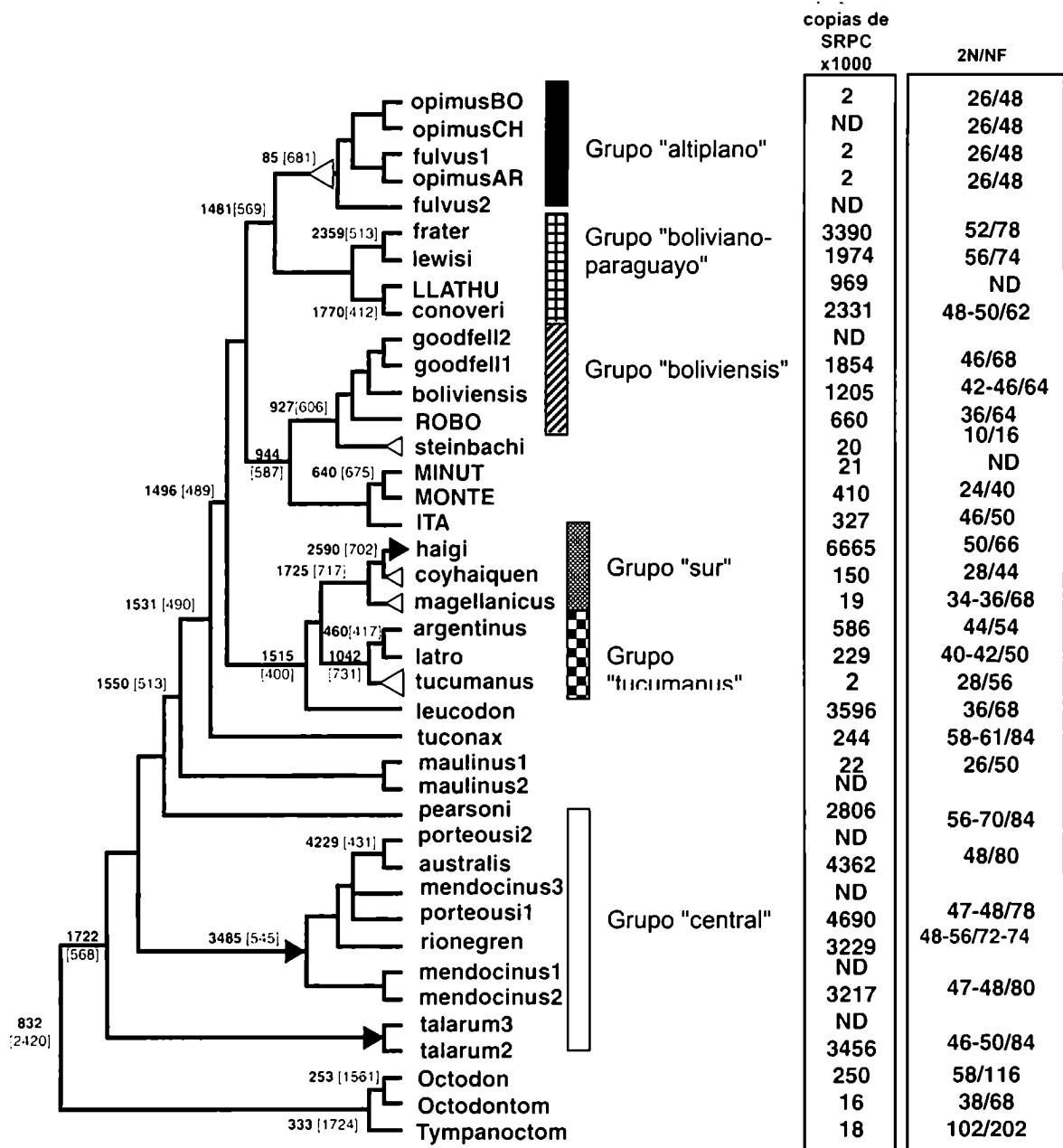


Figura 21: Evolución del número de copias de SRPC en las especies de Ctenomys y octodontinos. La topología corresponde al MV. La primera columna muestra los números de copias de SRPC en las especies actuales y los números en el árbol representan los valores inferidos para los ancestros. Entre corchetes se expresa el error de la estimación. Se muestran sólo los valores que difieren en más de un 25% respecto de los valores en los nodos vecinos. La segunda columna muestra los números cromosómicos (2N) y fundamental (NF). Los triángulos negros señalan ramas donde ocurrieron amplificaciones importantes, y los triángulos blancos señalan deleciones.

rápidos. Por ejemplo, hay una reducción en el número de copias en la rama que conduce a *C. steinbachi*, en contraste con los otros miembros del grupo "boliviensis", los cuales cuentan con valores relativamente altos de SRPC. Dentro del grupo denominado "sur", *C. haigi* habría sufrido una amplificación importante, en contraste a una reducción en *C. magellanicus* y, aún más drástica, en *C. coyhaiquensis*. Dentro del grupo "tucumanus", ocurrió una reducción en el número de copias en el linaje que conduce a *C. tucumanus*, cuyos taxones hermanos, *C. latro* y *C. argentinus*, presentan número de copias mayores, aunque reducidos respecto del nodo ancestral para ese grupo.

De acuerdo al análisis de la evolución del número de copias de SRPC (figura 21), la misma involucró tanto procesos de amplificación continua a lo largo de los distintos linajes, como así también grandes amplificaciones (triángulos blancos en la figura 21) y deleciones (triángulos negros en la figura 21), que afectaron a ciertas especies en particular o a los descendientes de un linaje cuando el evento se produjo en el ancestro.

3.4. Patrones de restricción del satélite SRPC en especies de *Ctenomys*

Rossi (1990) estudió los patrones de restricción con la enzima PvuII en 11 especies de tuco-tucos, mayoritariamente argentinas. Todas las especies ensayadas, excepto *C. opimus*, produjeron un patrón de restricción en escalera del tipo A (mayor intensidad en el monómero e intensidad decreciente hacia múltiplos de mayor tamaño). *C. opimus* no produjo señal en condiciones de alta rigurosidad de hibridación, pero mostró un patrón anómalo, distinto del A y el B en hibridaciones con condiciones de baja rigurosidad (Rossi 1990).

Para ampliar el análisis, se realizaron experimentos de *Southern* incluyendo especies bolivianas y uruguayas, mediante la digestión de ADN genómico de distintas especies con la enzima PvuII e hibridando con la sonda SRPC (Rossi 1990) en condiciones de alta (0,5X SSC, 65°C) y baja rigurosidad (6X SSC, 60°C). Las especies muestran un patrón tipo A y la señal es abundante tanto en condiciones de alta (figura 22) como de baja exigencia de identidad (no mostrado). *C. steinbachi*, *C. opimus* y *C. minutus* presentan señal muy escasa (visible sólo con exposiciones largas), o en la hibridación con baja rigurosidad.

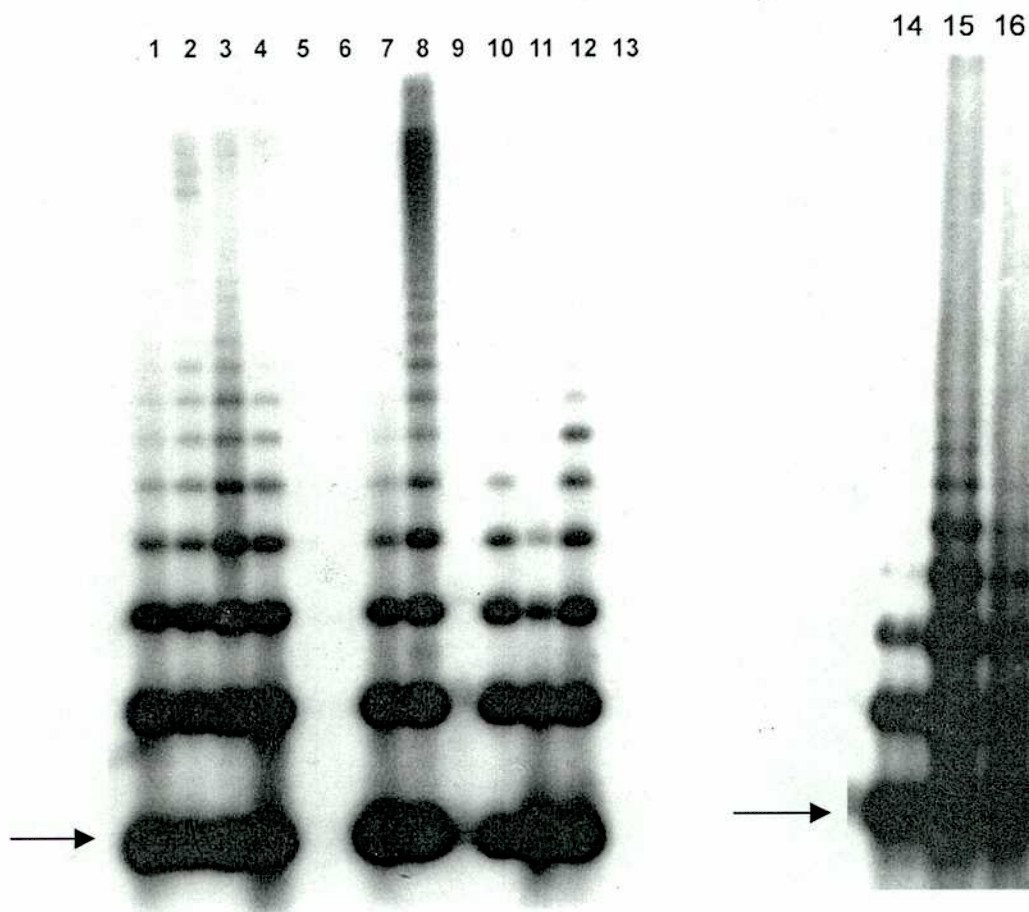


Figura 22: Patrones de restricción de ADN genómico de especies bolivianas y uruguayas digeridas con PvuII e hibridadas en condiciones de lavado rigurosas (65 grados, 0,1X SSC, 0,5% SDS). La sonda utilizada es SRPC. La flecha indica la posición del monómero. Referencias: 1 y 2: *C. boliviensis*; 3: *C. goodfellowi*; 4: ROBO; 5: *C. steinbachi*; 6: *C. opimus*; 7: *C. frater*; 8: *C. conoveri*; 9: *C. minutus*; 10: ITA; 11: MONTE; 12: *C. leucodon*; 13: *C. opimus* (Argentina). 14: *C. pearsoni*; 15 y 16: *C. rionegrensis*

A fin de visualizar en detalle los patrones de restricción de las especies con muy bajo número de copias, se realizaron ensayos de *Southern* en condiciones de baja exigencia de identidad (figura 23). *C. steinbachi* presenta un patrón de bandas heterogéneo en cuanto a la intensidad de las bandas; los multímeros de 2, 4 y 7 unidades son claramente más abundantes. Este patrón anómalo es diferente, tanto del patrón típico tipo A como del patrón B (inverso al patrón A). *C. opimus* y *C. fulvus* presentan también un patrón anómalo, donde las 4 ó 5 bandas de menor tamaño presentan similares intensidades (figura 23). En el individuo de *C. opimus* de la provincia de Jujuy, el multímero de 5 unidades es particularmente intenso. *C. maulinus* y *C. magellanicus* produjeron una señal muy débil porque la calidad del ADN genómico extraído de ellas es muy pobre, pero puede apreciarse la presencia de bandas correspondientes a fragmentos de una y dos unidades. *C. coyahiquensis* fue también incluido en este ensayo pero no se obtuvo un resultado satisfactorio.

3.5. El satélite homólogo a SRPC presente en los octodontinos

Rossi (1990) encontró que los géneros de octodontinos *Octodon* y *Octodontomys* poseen en su genoma secuencias relacionadas a la SRPC, cuya presencia se evidenció a través de hibridación en condiciones de baja rigurosidad, no detectándose en condiciones de alta rigurosidad. El equímido *Proechimys guirae* dio resultado negativo en los mismos experimentos, indicando que no existen en esta especie secuencias homólogas a la SRPC (Rossi 1990).

Con el propósito clonar secuencias homólogas a SRPC en octodontinos, se digirió el ADN genómico de una de las especies de la subfamilia, *Octodontomys gliroides* con la enzima de restricción PvuII. El producto de la digestión se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, que mostró el típico patrón A. Se recuperó la fracción que corresponde a dímeros, es decir, de alrededor de 700 pares de bases. Los fragmentos fueron purificados, ligados y clonados al vector plasmídico pBluescript II. Se utilizó el método de IPTG-Xgal para la detección de colonias transformantes. Se realizó una hibridación en colonias utilizando como sonda ADN la fracción de 350 pares de bases de la digestión de ADN genómico de *C. talarum* con PvuII, es decir

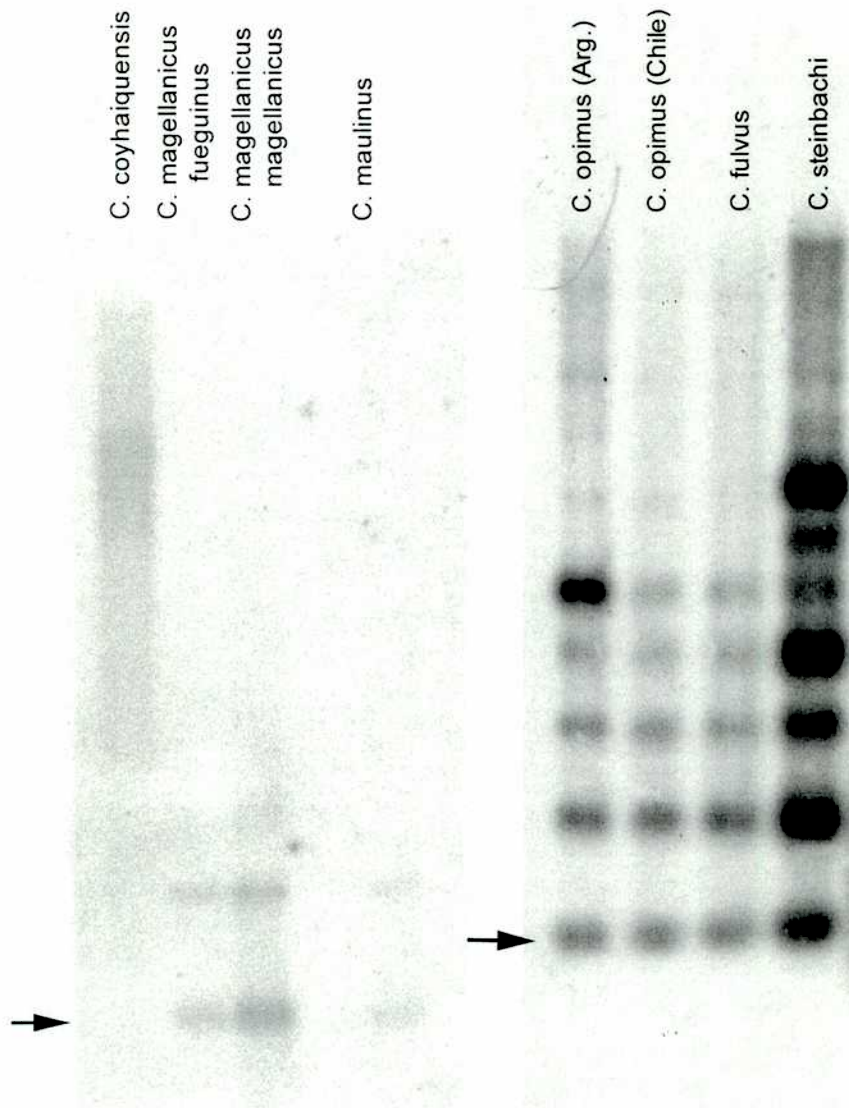


Figura 23: Patrones de restricción de ADN genómico de especies con bajo contenido de SRPC digeridas con PvuII e hibridadas en condiciones de lavado no rigurosas (60 grados, 6X SSC, 0,5% SDS). La sonda utilizada es SRPC. La flecha indica la posición del monómero.

correspondiente a la mezcla de monómeros de SRPC. De las colonias blancas que produjeron señal radioactiva positiva, se seleccionaron 16. Se extrajeron los plásmidos de dichas colonias y se liberaron los insertos por digestión con las enzimas Eco RI y HindIII. Los productos de digestión fueron analizados en un experimento de *Southern*, en el que se utilizó como sonda una mezcla de fragmentos genómicos correspondientes al monómero de SRPC de *C. talarum* (figura 24a). Se obtuvo señal positiva en 15 de los 16 clones analizados (figura 24b). En adelante se trabajó con el clon número 7, al que se denominó pSRPO7 (plásmido que contiene la secuencia repetida Pvull de *Octodontomys*).

Para confirmar el clonado de la secuencia buscada, se utilizó el pSRPO7 como sonda en un experimento de *Southern*, donde se analizó el ADN de *O. gliroides* digerido con Pvull e hibridado en condiciones de alta rigurosidad. El ADN de *C. talarum* fue incluido como control positivo, en cantidad comparable. Como se esperaba, se obtuvo abundante señal en la calle correspondiente a *O. gliroides*, con un patrón de bandas tipo A, mientras que en la calle correspondiente a *C. talarum* aparece una señal muy débil (figura 25). Las especies *Tympanoctomys* y *Octomys*, dos géneros muy relacionados entre sí y con los tuco-tucos (Gallardo et al. 1999) también presentaron patrón del tipo A cuando se las ensayó en condiciones de baja rigurosidad (no mostrado). Esta diferencia en las señales de hibridación estaría reflejando la diferencia a nivel nucleotídico del satélite en ambos linajes

Los géneros *Octodon* y *Spalacopus* contienen también secuencias homólogas a SRPO7, aunque con menor proporción de sitios blanco para Pvull respecto de *Octodontomys* (figura 26). En *Southern*s realizados en condiciones de baja rigurosidad la señal obtenida fue similar, indicando que la secuencia de SRPO7 es representativa de la mayor parte del satélite presente en los genomas de octodontinos. Por el contrario, las especies de tuco-tucos produjeron señales abundantes en condiciones de baja rigurosidad pero nulas o muy escasas en condiciones de alta rigurosidad (figura 27). Estos resultados muestran que sólo una pequeña proporción de las secuencias SRPC presentes en las especies de *Ctenomys* son similares a la SRPO7 y confirman la divergencia entre ambos satélites.

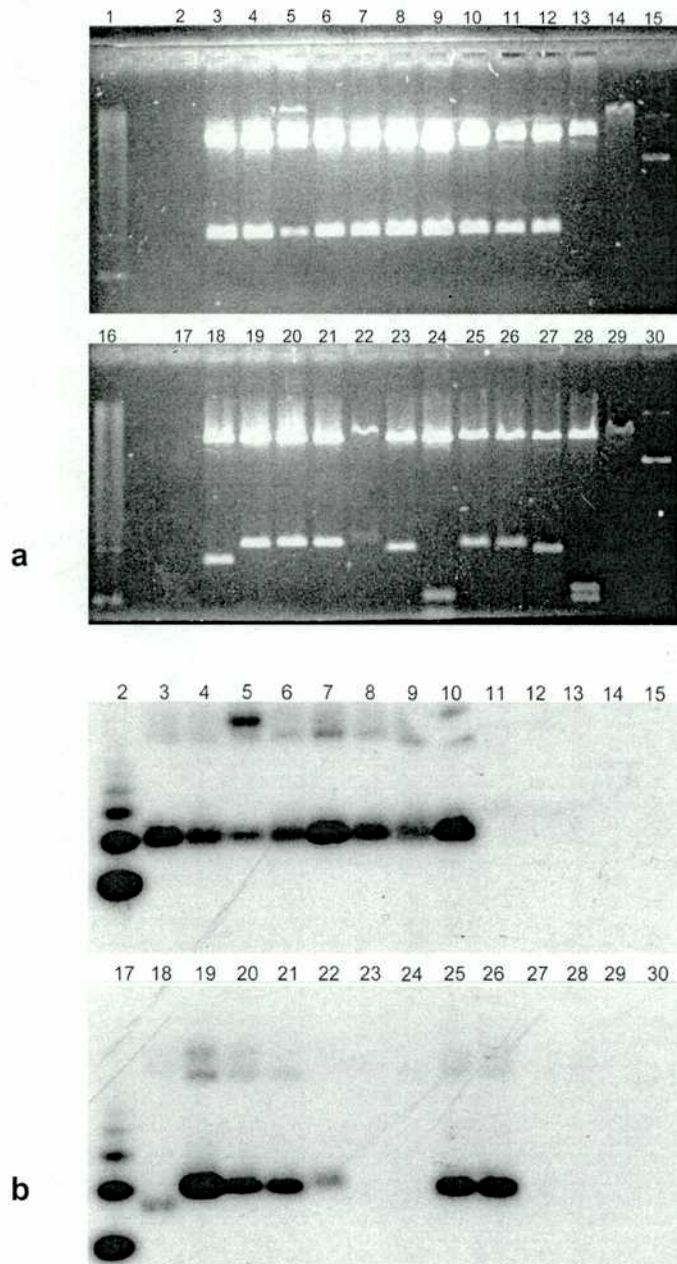


Figura 24: Clonado de la secuencia repetida en *Octodontomys gliroides*. a: gel de agarosa donde se corrieron los productos de digestión de los plásmidos recombinantes luego del escrutinio de las colonias. b: Southern blot del mismo gel. La sonda utilizada fue ADN de 350 pares de bases obtenido por digestión de ADN de *C. talarum* con PvuII. Referencias: 1 y 16: 400ng de ADN de *C. talarum* digerido con PvuII (control para el gel de agarosa); 2 y 17: 25 ng de ADN de *C. talarum* digerido con PvuII; 3-10 y 18-26: plásmidos de colonias blancas que dieron positivo en el escrutinio de colonias; 11, 12, 27 y 28: plásmidos de colonias blancas que no dieron señal; 13: plásmido de colonia azul, sin señal; 14 y 29: plásmido Bluescript cortado con EcoRI y HindIII; 15 y 30: plásmido Bluescript sin cortar.

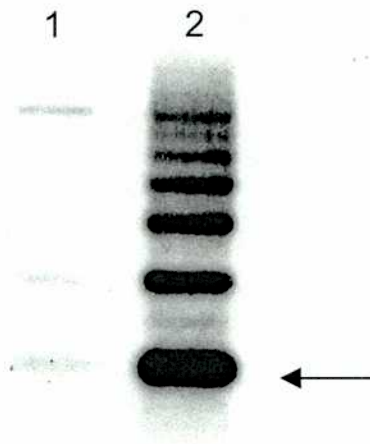


Figura 25: *Southern* de ADN genómico cortado con PvuII de *C. talarum* (1) y *O. gliroides* (2) hibridado en condiciones de alta rigurosidad (0,1X SSC; 65°C) con el fragmento escindido del clon 7. La flecha indica la posición del monómero.

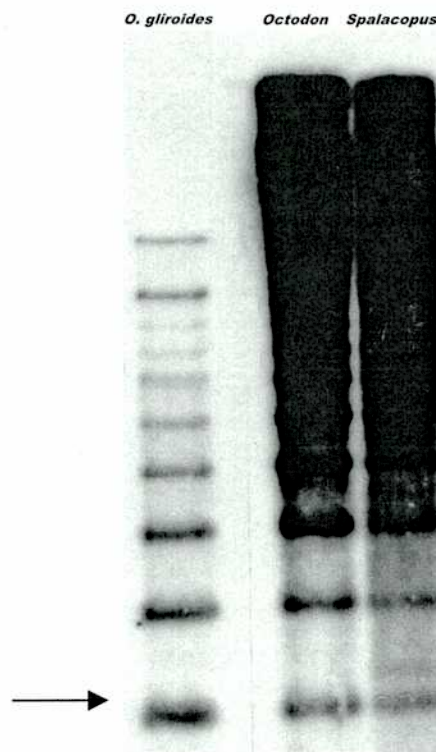


Figura 26: *Southern* de ADN genómico cortado con PvuII de *Octodontomys gliroides*, *Octodon degus* y *Spalacopus cyanus* hibridados en condiciones de alta rigurosidad (0,1X SSC; 65°C) con el fragmento escindido del clon 7. La flecha indica la posición del monómero.

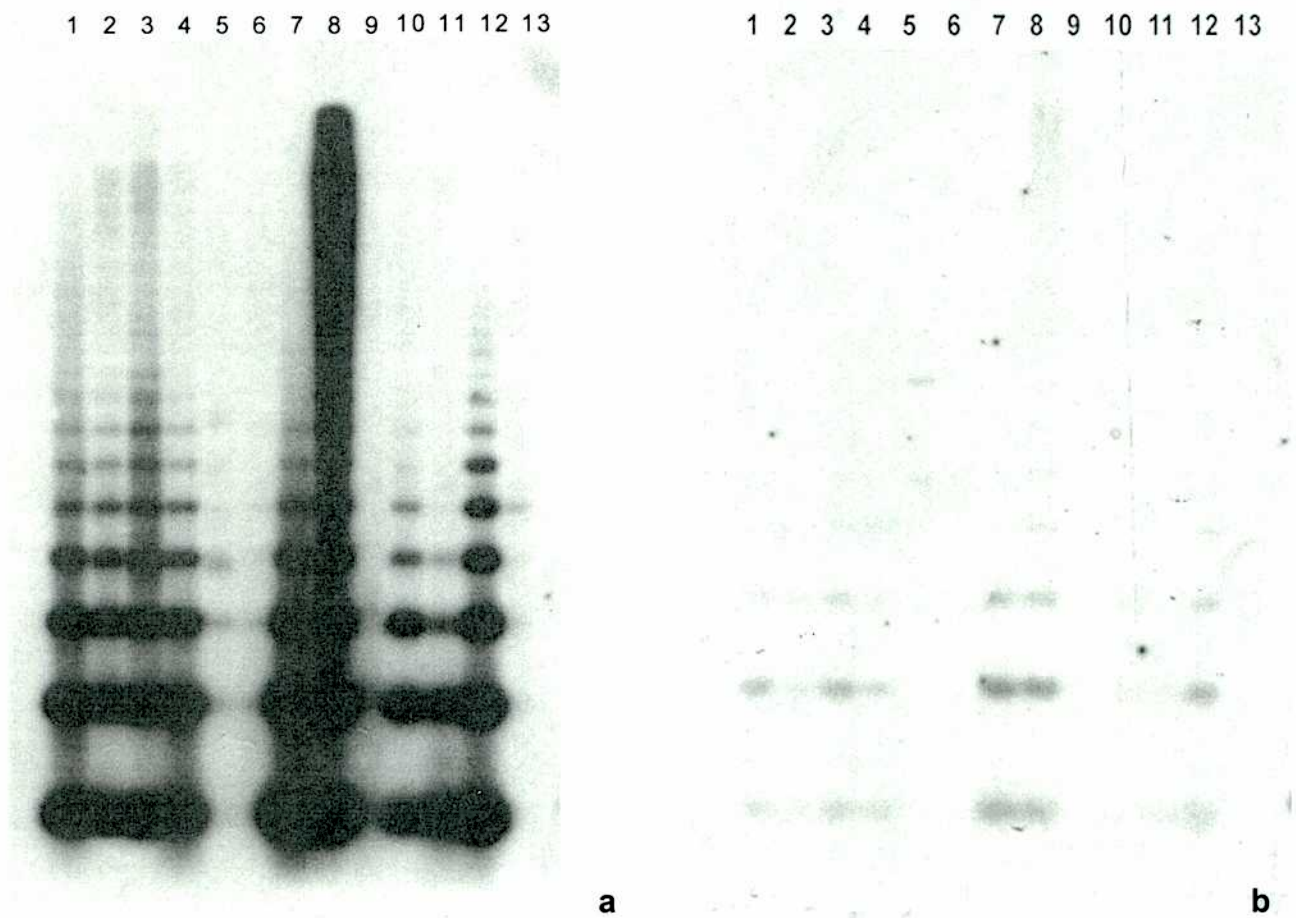


Figura 27: Southern blots de ADN genómico cortado con PvuII de especies de *Ctenomys* hibridado en condiciones de baja (a) y alta (b) rigurosidad. La sonda utilizada es SRPO7. Referencias: 1 y 2: *C. boliviensis*; 3: *C. goodfellowi*; 4: ROBO; 5: *C. steinbachi*; 6: *C. opimus*; 7: *C. frater*; 8: *C. conoveri*; 9: *C. minutus*; 10: ITA; 11: MONTE; 12: *C. leucodon*; 13: *C. opimus* (Argentina).

3.5.1. Secuencia nucleotídica de SRPO7

Para determinar la secuencia del inserto presente en el plásmido pSRPO7 se utilizó el sistema SEQUENASE. Se emplearon oligonucleótidos cebadores que se ubican a ambos lados del inserto, que corresponde a un dímero del satélite de *O. gliroides*, a fin de secuenciar las dos cadenas. La comparación de la secuencia nucleotídica del inserto presente en el plásmido pSRPO7 con la secuencia de SRPC (Rossi et al. 1990) arrojó una similitud del 63% (figura 28). Este nivel de similitud es compatible con resultados previos (Rossi 1990; Rossi et al. 1990), donde la hibridación en condiciones de alta rigurosidad (identidad mayor a 90%) de SRPC con ADN de *Octodontomys* producía una señal muy escasa, mientras que la hibridación en condiciones de baja rigurosidad (identidad mayor a 60%) generaba señal apreciable.

La mayor parte de las diferencias entre las dos secuencias se deben a mutaciones puntuales aleatoriamente distribuidas, algunas de las cuales son inserciones y deleciones. Se compararon las secuencias de los dos monómeros que componen el dímero de SRPO7, junto con la de SRPC (figura 29). Ambos monómeros tienen una similitud del 88%. La similitud de SRPO7a y SRPO7b con SRPC es del 60 y 66%, respectivamente. Se observan tanto sustituciones, como inserciones y deleciones (de hasta 5 bases), compartidas tanto entre los monómeros de SRPO7 como entre SRPC y cada uno de ellos.

3.6. Variabilidad nucleotídica de la SRPC en las especies de *Ctenomys*

3.6.1. Amplificación por PCR de las secuencias homólogas a SRPC en otras especies de *Ctenomys*

Dado que el análisis de la variabilidad a nivel nucleotídico del satélite SRPC en las especies de tuco-tucos permitirá extender el panorama de la evolución de este ADN satélite, el propósito de los experimentos que se describen a continuación fue obtener las secuencias representativas de monómeros de SRPC en especies de los principales linajes de *Ctenomys*. La secuencia SRPC es representativa del satélite presente en *C. porteousi*. Con el propósito de obtener las secuencias nucleotídicas homólogas en las restantes especies, se diseñaron experimentos de PCR.

```

SRPO7      CTGGCTCTTCTGCAATCAGAAGTCACACTTAGAAACACAAGTCATGCAGTAGAAACAAGC
SRPCdim    CTGGCTGTTCTCTATTTCAGAACTCAGTCGTAGAAACAAACATGATGGAGCACAAAGAAATT
*****   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      AGCTCTCCTCAGGGCACGGAAGTCTAGAAACGTTTCTGAC-TCTGTCCCTCTCGGAATGT
SRPCdim    CCATCTTGAACTACCTGCATACATACCAGGGGAAATAACCTCAGTTCCTTAGGAATGA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      ATGTGAGAGAGAGAACAATCATCTGCTGTATCTCTGAACCTCCAAGTGGAC--TCACGAA
SRPCdim    AAG--GGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCCTAAGAAGTGGAAAGCCACCAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      CTCT--CGGTGCTT-CTCTAGAGCGATGATTCCAGT-----CTTTCACGAAGCCGCAA--
SRPCdim    CTTGCGCTATACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAAACCTGCACAC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      CAGTGAAGTACTTTAGGTACAAAAGTGATGTGTTTGC-AAACTTCAGTATTCTTCTCTAT
SRPCdim    TTCTGAATTGGTTTGGAAACCAATGTGACACATTAGCCAAAATGCTGTATTTGCTATAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      ACAGAATCAGGAATTGGAGTGCCCTGCCCTACCAAAGAAGCTGGAGATTAGCTGGCTCTTC
SRPCdim    GAGGAAACAGGCATTGCAGTTCCTGCTTCCCAATGAATTGGAGCTCAGCTGGCTGTTC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      TGCAATCAGAACTCACACTTAGAAACAAAAGTCATGCAGTAGAATCAACCAGCTCTCCTC
SRPCdim    TCTATTCAGAACTCAGTCGTAGAAACAAACATGATGGAGCACAAAGAAATT--CCATCTTG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      AGGGACCTGGAATTTAGGTACGTGTTTCTGAC-TCTTTCCCATAGGAATGAATGTGAGA
SRPCdim    AACTACCTGCATACATACCAGGGGAAATAACCTCAGTTCCTTAGGAATGAAAGGGAGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      GAGAAAACCTTCTGCAGTATCTTTGAACCTCCAGCTGGAAAGTCACAACTTCTCTGGT
SRPCdim    GAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCCTAAGAAGTGGAAAGCCACCAACTTCGCCTAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      GCTTTCTCTTAGGAGACTGAATGATTTCCAGTCTTTTACGAAGCCGAACAGTGAAGTA
SRPCdim    ACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAAACCTGCACACTTCTGAATTG
*****   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      CTTTTGGTACAAAAGTGATGTGTTTGC-AAACTTCAGTATTCTTCTGTATACAGAAAAG
SRPCdim    GTTTGGAAACCAATGTGACACATTAGCCAAAATGCTGTATTTGCTATATGAGGAAACAG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SRPO7      GCATTGGA-CTGCCTGCTTCCCAAAGAAGCTGGAGCTTAG
SRPCdim    GCATTGCAGTTCCTGCTTCCCAATGAATTGGAGCTCAG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 28: Alineación de la secuencia del clon SRPO7 de *Octodontomys gliroides* y la secuencia de SRPC de *C. porteousi* (Rossi 1990). La última ha sido duplicada ya que la primera corresponde a un dímero. Los asteriscos indican similitud.

```

SRP07a   CTGGCTCTTCTGCAATCAGAAGTCACACTTAGAAACACAAGTCATGCAGTAGAAACAAGC
SRP07b   CTGGCTCTTCTGCAATCAGAACTCACACTTAGAAACAAAAGTCATGCAGTAGAATCAACC
SRPC     CTGGCTGTTCTTATTTCAGAACTCAGTCGTAGAAACAACATGATGGAGCACAAAGAAATT
          *****
SRP07a   AGCTCTCCTCAGGGCACGGAAGTCTAGAAACGT--TTCTGAC-TCTGTCCCTCTCGGAAT
SRP07b   AGCTCTCCTCAGGGACCTGGAATTTAGGTACGTGTTTCTGAC-TCTTTTCCCATAGGAAT
SRPC     --CCATCTTGAACTACCCTGCATACATACCAGGGGAAATAACCTCAGTTCCTTAGGAAT
          * * * * *
SRP07a   GTATGTGAGAGAGAGAACAATCATCTGCTGTATCTCTGAACCTCCAACCTGGAC--TCACG
SRP07b   GAATGTGAGAGAGAAAA--ACCTTCTGCAGTATCTTTGAACCTCCAGCTGGAAAGTCACA
SRPC     GAAAGGGAGAGAAAAACA--TGTGCCTGTATCTCTTTGCACTAAGAAGCTGAAAGCCACC
          * * * * *
SRP07a   AACTCTC--GGTGCTT-CTCTAGAGCGA----TGATT--CCAGTCTTT-CACGAAGCCG
SRP07b   AACTTCTCTGGTGCTTTCTCTTAGGAGACTGAATGATTCCCAGTCTTTCACGAAGCCG
SRPC     AACTTCGCCTATACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAAACCCTGC-A
          *****
SRP07a   CAACAGTGAAGTACTTTAGGTACAAAAGTGATGTGTTTGC-AACTTCAGTATTCTTCTC
SRP07b   -AACAGTGAAGTACTTTTGGTACAAAAGTGATGTGTTTGC-AACTTCAGTATTCTTCTG
SRPC     CACTTCTGAATTGGTTTGGAAACCAATGTGACACATTAGCCAAAATGCTGTATTTTGCTA
          * * * * *
SRP07a   TATACAGAATCAGGAATTGGAGTGCCCTGCCTACCAAAGAAGCTGGAGATTAG
SRP07b   TATACAGAAAAAGGCATTGGACTGCC-TGCTTCCCAAAGAAGCTGGAGCTTAG
SRPC     TATGAGGAAACAGGCATTGCAGTCCCTGCTTCCAATGAATTTGGAGCTCAG
          *** * * * *

```

Figura 29: Alineación de los dos monómeros que forman el clon SRP07 y la secuencia de SRPC (Rossi 1990). Los asteriscos indican similitud entre las tres secuencias.

La técnica de PCR podría ser de gran utilidad para estudiar la secuencia del ADN satélite, ya que se dispondría de una forma rápida de obtener una secuencia consenso de los miles o millones de copias de un ADN satélite. Esta técnica en particular, sería útil para estudiar el grado de variabilidad entre repeticiones dentro de un mismo genoma, proporcionando importante información sobre la intensidad de los procesos de evolución concertada (ver ítem 1.6.3 en la Introducción).

Sobre la base de la alineación entre las secuencias SRPC y SRPO7, se diseñó un par de oligonucleótidos cebadores para amplificar, mediante la técnica de PCR, una parte de la unidad repetida de la secuencia SRPC.

El oligonucleótido SRPC17U abarca las posiciones 181 a 200 y el SRPC325L desde 140 a 159 en el monómero orientado según los sitios PvuII (figura 30).

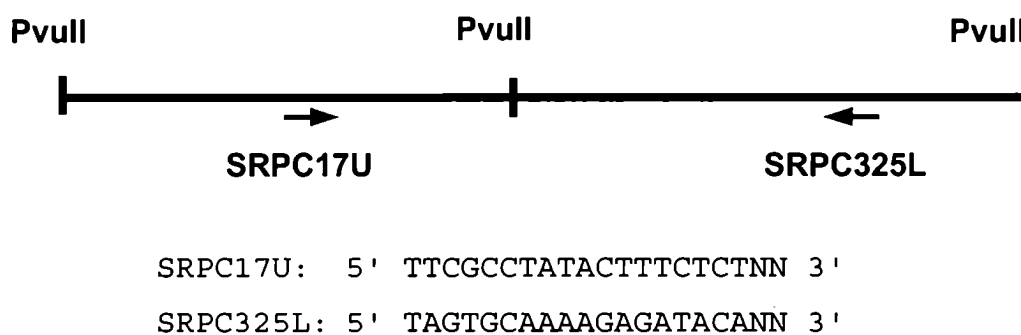


Figura 30: Localización de las regiones de hibridación y secuencias de los cebadores SRPC17U y SRPC 325L, utilizados en los experimentos de PCR.

Se ensayaron numerosas combinaciones de las condiciones de la PCR hasta lograr la mezcla de reacción que mejor funcionó con los cebadores diseñados y el ADN genómico de *C. talarum* (ver ítem 2.12 en Materiales y Métodos). En la mayoría de los casos la temperatura de la etapa de apareamiento entre cebadores y ADN molde fue de 48 grados, aunque en algunas especies, como es el caso de *C. opimus* y *C. steinbachi*, la temperatura que se utilizó fue de 42 grados.

Los productos de la PCR estaban formados principalmente por ADNs de unos 320 pares de bases, y en menor proporción por ADNs de unos 700 pares

de bases (figura 31). En algunos casos se obtuvo una pequeña fracción de moléculas de mayor tamaño, que corresponden a arreglos de tres repeticiones.

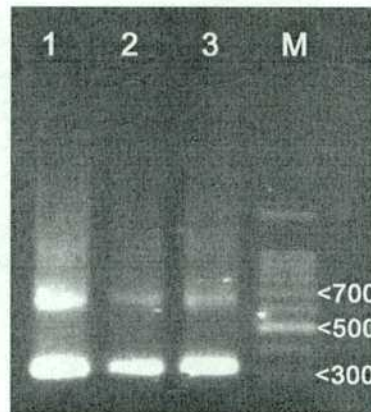


Figura 31: Gel de agarosa con el producto de la PCR preparada con ADN genómico de *C. minutus* (calle 1; 250 ng) y *C. tucumanus* (calles 2; 250 ng y 3; 400 ng) y los cebadores específicos para el satélite SRPC17U y SRPC325L. M: Marcador de tamaño; se muestran los tamaños en pares de bases de algunas bandas.

3.6.2. Similitud intra e interespecífica de la SRPC a nivel de secuencia

El producto de PCR correspondiente al monómero es una mezcla de secuencias que se espera que representen la variabilidad del conjunto del satélite. La secuenciación de estos productos se realizó por PCR (ver ítem 2.13.2) con los mismos cebadores que se utilizaron para amplificar los monómeros de SRPC inicialmente. El resultado fue una secuencia consenso del producto. Para discriminar entre posiciones variables (aquellas en las cuales difieren entre sí algunos monómeros) y ambigüedades producidas por errores o defectos metodológicos, se adoptó como criterio que las variantes deberían aparecer en las dos cadenas, aunque no necesariamente en la misma proporción. La figura 32 muestra dos ejemplos de posiciones con y sin variaciones en los dos tipos de secuenciación.

En todos los casos se secuenciaron ambas cadenas. La figura 33 muestra la alineación de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de los monómeros amplificados por PCR. La región comprendida entre las posiciones 140 y 200 aproximadamente, no tiene datos, ya que corresponde a la región del monómero que queda por fuera de los cebadores en la PCR.

La alineación de las secuencias muestra un alto grado de conservación interespecífica del satélite (figura 33). En algunos casos, cuando un sitio

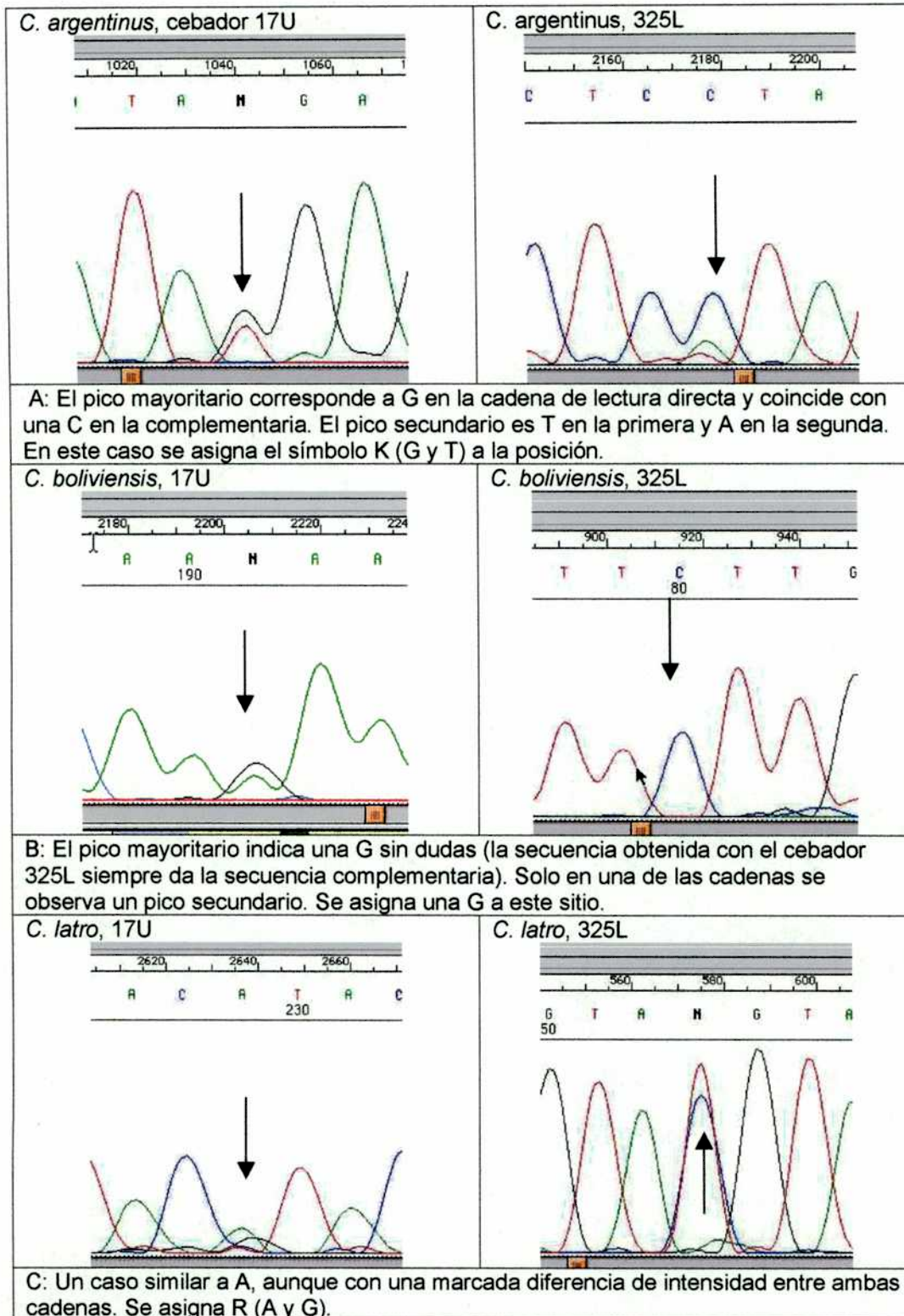


Figura 32: Interpretación de las posiciones ambiguas en los electroferogramas proporcionados por el equipo de secuenciación automática. Se muestran los picos correspondientes a la misma posición en ambas cadenas.

	20	40	60	
magellanicM.-	64
porteousi	64
boliviensi	64
haigi	64
tucumanus	64
monteGG	64
minut	64
goodfellow	64
robo	64
ita	64
monte	64
talarum	64
latro	64
mendo	64
pearsoni	64
australis	64
maulinus	64
argentinus	64
leucodon	64
opiB	64
fulvus	64
opiA	64
llathuC.....	64
steinbachiC.....	64
conoveriC.....	64
fraterC.....	64
lewisiC.....	64
tuconaxC.....	64
consenso_cC.....	65
CTGGCTGTTCTCTATTCAGAACTCAGTCTTAGAAACAACATGCATGGAGCACAAGAAATTACAT				
	* 80	* 100	* 120	*
magellanic	Y.....M.....W.....	: 128
porteousiM.....	: 128
boliviensi	: 128
haigi	: 128
tucumanus	: 128
monteGG	: 128
minut	: 128
goodfellow	: 128
robo	: 128
ita	: 128
monte	: 128
talarum	: 128
latro	: 128
mendo	: 128
pearsoni	: 128
australis	: 128
maulinus	: 128
argentinus	: 128
leucodon	: 128
opiBSA.....	: 128
fulvusSA.....	: 128
opiASW.....	: 128
llathuTA.G.....AA.....	: 128
steinbachiGA.M.....T.....	: 128
conoveriKA.RY.....T.....	: 128
fraterTA.G.....MA.....	: 128
lewisiKA.GY.....R.....AA.....	: 128
tuconaxTA.S.....M.....M.....	: 128
consenso_c	: 130
CTTGAACTACCCTGCATACATACCCAGGGGAAATAACCTCAGTTCATAGGAATGAATGGGAGA				

Figura 33: Secuencias de los productos de PCR del satélite SRPC en especies de *Ctenomys*. Símbolos IUPAQ para las ambigüedades: R: A/G, Y: T/C, S: C/G, W: A/T, M: A/C, K: G/T, b: C/G/T.

	140	*	160	*	180	*	
magellanic	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 137
porteousi	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 138
boliviensi	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 139
haigi	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 154
tucumanus	:	-----	-----	----- A T A C T C	: 165
monteGG	:	-----	-----	----- A T A C T C	: 165
minut	:	-----	-----	----- A T A C T C	: 166
goodfellow	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 153
robo	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 159
ita	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 135
monte	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 136
talarum	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 137
latro	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 164
mendo	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 153
pearsoni	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 168
australis	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 167
maulinus	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 158
argentinus	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 159
leucodon	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 140
opiB	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 160
fulvus	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 154
opiA	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 160
llathu	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 157
steinbachi	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 155
conoveri	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 131
frater	:	-----	.. S T ..	-----	-----	: 163
lewisi	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 138
tuconax	: G A C ..	-----	-----	-----	-----	: 138
consenso_c	:	-----	-----	----- T . G . C ..	-----	: 195
GAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCCTAAGAAGCCCAACTCCCCTTATACTTT							
	200	*	220	*	240	*	260
magellanic	:	-----	----- M K ..	-----	: 185
porteousi	:	-----	-----	----- K ..	-----	: 192
boliviensi	:	-----	-----	----- K ..	-----	: 194
haigi	:	-----	-----	----- S ..	-----	: 212
tucumanus	: - ..	-----	----- S ..	-----	: 229
monteGG	:	-----	-----	----- S ..	-----	: 230
minut	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 231
goodfellow	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 208
robo	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 224
ita	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 190
monte	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 191
talarum	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 184
latro	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 229
mendo	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 218
pearsoni	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 233
australis	:	-----	-----	-----	-----	-----	: 232
maulinus	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 223
argentinus	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 224
leucodon	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 181
opiB	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 225
fulvus	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 212
opiA	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 225
llathu	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 222
steinbachi	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 220
conoveri	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 170
frater	: G . Y ..	-----	----- G ..	-----	: 228
lewisi	:	-----	-----	----- G .. Y ..	-----	: 185
tuconax	:	-----	-----	----- G ..	-----	: 191
consenso_c	: A ..	-----	----- C ..	-----	: 260
CTCTTGGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAACCCTGCACACTTGTGAATTGGTTTGGAAAC							

Figura 33 (continuación).

	280	300	320	
magellanic	:	: 250
porteousi	:	: 257
boliviensi	:	: 259
haigi	:	: 277
tucumanus	:	: 294
monteGG	:	: 295
minut	:	: 296
goodfellow	:	: 273
robo	:	: 289
ita	:	: 255
monte	:	: 256
talarum	:	: 249
latro	:	: 294
mendo	:	: 283
pearsoni	:	: 298
australis	:	: 297
maulinus	:	: 288
argentinus	:	: 289
leucodon	:	: 246
opiB	:	: 290
fulvus	:	: 277
opiA	:	: 290
llathu	:	: 287
steinbachi	:	: 285
conoveri	:	: 235
frater	:	: 293
lewisi	:	: 250
tuconax	:	: 256
consenso_c	:	: 325

CAAAGTGACACATTAGCCAAATTGCTGATTTTGCTATATGAGGAAACAGGCATTGCAGTGCCCT

	*	340	*	
magellanic	:	: 275
porteousi	:	: 282
boliviensi	:	: 284
haigi	:	: 302
tucumanus	:	: 319
monteGG	:	: 320
minut	:	: 321
goodfellow	:	: 298
robo	:	: 314
ita	:	: 280
monte	:	: 281
talarum	:	: 274
latro	:	: 319
mendo	:	: 308
pearsoni	:	: 323
australis	:	: 322
maulinus	:	: 313
argentinus	:	: 314
leucodon	:	: 271
opiB	:	: 315
fulvus	:	: 302
opiA	:	: 315
llathu	:	: 312
steinbachi	:	: 310
conoveri	:	: 260
frater	:	: 318
lewisi	:	: 275
tuconax	:	: 281
consenso_c	:	: 350

GCTTCCAATGAAGCTGGAGCTCAG

Figura 33 (continuación).

presenta dos o más variantes en una o más especies, la base presente en el resto de las secuencias concuerda con una de estas variantes. Esto ocurre, por ejemplo, en los sitios 2, 26 y 96. En otros casos, ambas variantes están también presentes en las otras especies. Por ejemplo, en el sitio 94, *C. tuconax* y *C. maulinus* presentan K (G y T), mientras que otras 10 especies tienen T y el resto tiene G. Pocas variantes son exclusivas de una sola especie, y en la mayoría de los casos las posiciones variables presentan ambigüedades.

Se calculó el porcentaje de sitios variables (incluyendo ambigüedades) como una medida de la variabilidad intraespecífica evidenciada por la PCR (tabla 6).

Especie	Sitios variables	Especie	Sitios variables
<i>C. australis</i> :	0,0%	<i>C. opimus</i> (Arg):	0,9%
<i>C. talarum</i> :	0,3%	<i>C. opimus</i> (Bol.):	0,9%
<i>C. pearsoni</i> :	0,3%	ITA:	0,9%
<i>C. minutus</i> :	0,3%	<i>C. fulvus</i> :	1,0%
<i>C. argentinus</i> :	0,3%	<i>C. porteousi</i> :	1,7%
<i>C. latro</i> :	0,3%	<i>C. leucodon</i> :	1,8%
<i>C. haigi</i> :	0,3%	<i>C. magellanicus</i> :	2,9%
LLATHU:	0,3%	<i>C. steinbachi</i> :	4,2%
<i>C. maulinus</i>	0,6%	<i>C. frater</i> :	5,0%
<i>C. tucumanus</i> :	0,6%	<i>C. lewisi</i> :	5,8%
<i>C. mendocinus</i> :	0,6%	<i>C. tuconax</i> :	6,4%
ROBO:	0,6%	<i>C. conoveri</i> :	6,5%
<i>C. boliviensis</i> :	0,7%	MONTE:	8,2%
<i>C. goodfellowi</i> :	0,7%		

Tabla 6: Variabilidad intraespecífica del satélite estimada a partir de las secuencias del producto de PCR.

Para estudiar la diferenciación interespecífica en el satélite se construyó una matriz de distancia P con el programa PAUP 4.0 (ítem 6.3). El valor más

alto correspondió a la comparación entre *C. mendocinus* y *C. conoveri* y fue de 7,39%. La divergencia entre *C. haigi* y *C. mendocinus* fue de 1,69%, y entre *C. haigi* y *C. conoveri* fue de 5,74%. Algunas comparaciones produjeron valores de distancia sumamente bajos. Cuando se compararon secuencias que solo difieren en sitios que presentaron variantes, las distancias fueron de 0. Ver, por ejemplo, en el árbol de distancias de la figura 34, el grupo que contiene a *C. talarum*, MONTEGG, y *C. tucumanus*, también el par *C. maulinus* – *C. leucodon*.

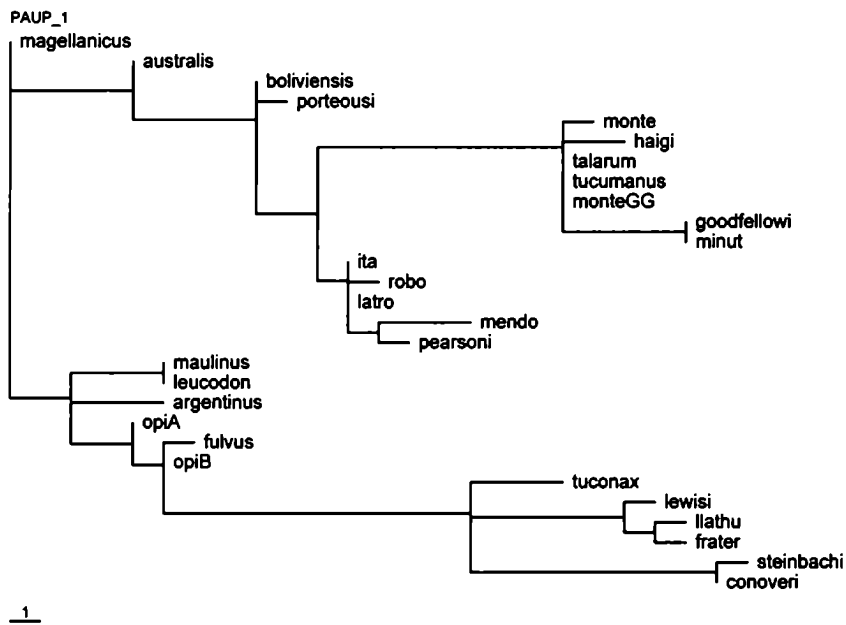
Para estudiar el efecto que pudiera tener la especificidad de los cebadores en la recuperación de la variabilidad global del satélite, se amplificó el monómero a partir de ADN de MONTE, una de las especies que presentaban mayor variabilidad (tabla 6). Se utilizó un juego de cebadores más específico, con extremos 3' con menor grado de ambigüedad:

SRPC17UKG: 5' TTCGCCTATACTTTCTCTKG 3'

SRPC325LGG: 5' TAGTGCAAAGAGATACAGG 3'

El producto fue luego secuenciado (MONTE GG en la figura 33). Se obtuvo en este caso una secuencia con menos ambigüedades que la que contiene la secuencia de MONTE obtenida a partir de los cebadores con los extremos degenerados. El porcentaje de sitios variables, al utilizar estos cebadores más específicos, fue de sólo 0,3. Este resultado indica que los cebadores con extremos 3' degenerados (figura 30) son capaces de recuperar mayor cantidad de variantes de la secuencia repetida. En este caso, MONTE mostró poseer una gran variabilidad entre monómeros al utilizarse el juego de cebadores menos específico (con NN en sus extremos 3') (ver tabla 6), mientras que la utilización de cebadores más específicos resultó en un producto de PCR mucho más homogéneo.

Para visualizar las relaciones de similitud entre las secuencias consenso obtenidas por PCR, se construyó un árbol con el método de NJ. El árbol (figura 34) distribuye las secuencias en cuatro *clusters* diferenciados. Uno de ellos corresponde al grupo "boliviano-paraguayo" (tabla 3), uno de los grupos filogenéticamente bien resueltos (ítem 3.1.3). *C. steinbachi* y *C. tuconax* se



1

Figura 34: Arbol de las secuencias obtenidas a partir del producto de PCR del satélite SRPC construido con el método de NJ.

presentan asociados a este grupo. Los otros *clusters* muestran poca concordancia con lo que se esperaría por el grado de parentesco. Las especies *C. fulvus* y *C. opimus* que conforman el grupo "altiplano", presentan una alta similitud de sus secuencias SRPC.

3.6.3. Clonado de monómeros en tres especies de *Ctenomys*

Para determinar si las secuencias obtenidas a partir de productos de PCR eran representativas de la variabilidad de SRPC, se resolvió clonar y secuenciar monómeros del satélite en algunas especies y comparar cualitativa y cuantitativamente la variación de los clones con la observada en las secuencias de PCR. Se eligieron dos especies (*C. haigi* y *C. mendocinus*) que presentaron productos de PCR con bajo porcentaje de sitios variables y una con valores relativamente altos (*C. conoveri*) (ver tabla 6).

Se digirió ADN genómico de *C. haigi*, *C. mendocinus* y *C. conoveri* con PvuII y se extrajo de geles de agarosa la fracción correspondiente a 350 pares de bases. Dichos fragmentos fueron clonados en plásmidos pBlueScript (Stratagene). En este caso, se omitió la etapa de hibridación de colonias y se escogieron directamente colonias blancas.

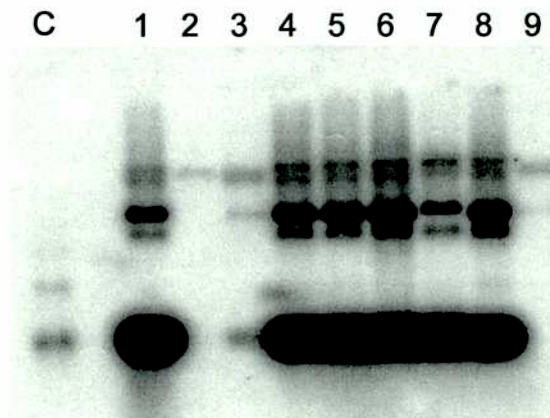


Figura 35: Análisis de los plásmidos que contenían insertos PvuII de *C. haigi*. La señal en los clones 1 y 4 al 8 indica hibridación positiva con la sonda SRPC de *C. magellanicus*. Calle C: Control positivo con ADN de *C. talarum* digerido con PvuII.

El análisis de los clones se realizó por uno de dos procedimientos alternativos: en uno de ellos, se liberó el inserto por digestión con las enzimas

EcoRI y HindIII en un experimento de *Southern*, utilizando como sonda SRPC obtenido por PCR de ADN genómico de *C. magellanicus*. Como ejemplo se muestra, en la figura 35, el análisis de 8 plásmidos recombinantes obtenidos a partir de ADN genómico de *C. haigi*, 6 de los cuales resultaron contener secuencias SRPC.

El otro método de selección se llevó a cabo sometiendo a los plásmidos recombinantes a una reacción de PCR utilizando el cebador T7, el cual tiene su sitio de apareamiento a pocos nucleótidos del sitio de clonado de pBlueScript. Se agregaron, además, los cebadores específicos SRPC17U y SRPC325L con el objeto de lograr la amplificación del inserto, cualquiera sea su orientación respecto del cebador T7. Los plásmidos que tienen secuencias SRPC insertas se evidenciaron por la presencia de producto de PCR (figura 36). En algunos casos, como en el de la calle 12 de la figura 36, se observan fragmentos que tienen el doble de longitud que SRPC, probablemente por la incorporación de dos fragmentos al plásmido durante la ligación. Dado que esta estrategia resultó ser muy específica y además más económica, el análisis de los clones de *C. mendocinus* y algunos de *C. haigi* se realizó por este segundo procedimiento.

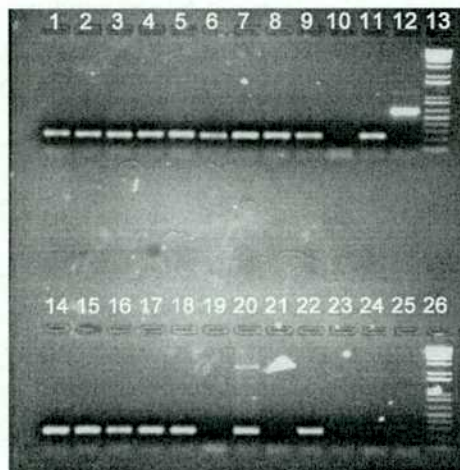


Figura 36: Análisis con PCR de los plásmidos que contenían insertos PvuII de *C. haigi* (calles 1 - 12 y 14 -17) y de *C. mendocinus* (calles 18-25). La presencia de banda indica que el plásmido contenía un monómero de SRPC. Calles 13 y 26: Marcador de tamaños Lambda HindIII.

3.6.4. Variabilidad de los clones

Se obtuvo las secuencias nucleotídicas de 18 clones de *C. conoveri*, de 11 de *C. haigi* y de 6 de *C. mendocinus*. Se analizaron sólo aquellas secuencias que pudieron leerse con claridad y sin posibles errores, con lo que el conjunto final de clones resultó de 13 secuencias de *C. conoveri*, 9 de *C. haigi* y 5 de *C. mendocinus* (figura 37).

Con el propósito de estudiar el grado de homogeneidad entre los monómeros de RPCS a nivel general, se calcularon algunos parámetros de variabilidad utilizando el programa DNASP (Rozas and Rozas 1999), cuyos resultados se resumen en la tabla 7.

	N	L	S	π
<i>C. conoveri</i>	13	350	135	0,091
<i>C. haigi</i>	9	348	69	0,051
<i>C. mendocinus</i>	5	348	23	0,028

Tabla 7: Variabilidad de los clones de SRPC en tres especies de *Ctenomys*. N: número de clones analizados, L: largo de las secuencias, S: número de sitios polimórficos, π (Pi): diversidad nucleotídica.

La variabilidad entre los clones fue evaluada calculando el número de sitios polimórficos (aquellos que presentan variación entre los clones) y π , o diversidad nucleotídica, que estima el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre todos los pares de secuencias (Li 1997).

Los clones de *C. conoveri* presentaron mayor variabilidad, mientras que los de *C. mendocinus* mostraron mayor homogeneidad, aunque debe tenerse en cuenta que en este caso se analizaron sólo 5 secuencias.

A pesar de la gran cantidad de variantes que pueden verse en el conjunto de las secuencias (figura 37), la comparación entre las secuencias consenso de las tres especies indica que a nivel general, la similitud entre los satélites es grande (figura 38). *C. haigi* y *C. mendocinus* difieren en el 1,4% de los sitios, *C. haigi* y *C. conoveri* en el 5,2% y *C. mendocinus* y *C. conoveri* en el 6,6%.


```

*
ME1 : .....-C..... : 88
ME2 : .....-..... : 88
ME3 : .....-..... : 88
ME4 : .....-..... : 88
ME5 : .....-..... : 88
HA1 : .....-..... : 88
HA14 : .....-..... : 88
HA15 : .....-..... : 88
HA16 : .....-..... : 88
HA4 : .....-..... : 88
HA5 : .....-..... : 88
HA6 : .....-..... : 88
HA7 : .....-..... : 88
HA8 : .....T.....C..... : 88
CONH5B : .....C-G.....C.....TA.G.....-AA : 88
CONH6B : .....C-G.....C.C.TA.G.....-AA : 88
CONH14 : .....C-G.....CT.G.AT...AT..AG.-TT : 88
CONH19 : .....T.C-G.....TA.A...CAT...AG : 89
CONH20 : .....C-G.....TA.G.....-AA : 88
CONH23 : .....C-GC.....GA.A.....-T : 88
CONH24 : .....C-G.....TGA.A.....GAG : 89
CONH26B : .....C.....C.....TA.G.....-AA : 88
CONH27 : .....C-G.....C.....TA.G.....-AA : 88
CONH28 : .....C-G.....C.C.TA.G.....-AA : 88
CONH29 : .....C-G.....C.G.....CA.TA.G.....-AA : 88
CONH30 : .....C-G.....GC.....G.C.GA.G.....-AA : 89
CONH34 : .....T.....G.....-C.....C...T.....GA.A.....- : 88
CTGGCTGTTCTATTTCAGAACTCAGTCTTAGAACAACAATGCATGGAGCACAAAGAATCACATCTTGAACCTACCCGTACATACCC

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
ME1 : ..... : 178
ME2 : ..... : 178
ME3 : ..... : 178
ME4 : ..... : 178
ME5 : ..... : 178
HA1 : ..... : 178
HA14 : ..... : 178
HA15 : ..... : 178
HA16 : ..... : 178
HA4 : ..... : 178
HA5 : ..... : 178
HA6 : ..... : 178
HA7 : ..... : 178
HA8 : ..... : 178
CONH5B : ...T...T..C..... : 178
CONH6B : ...T...T..C..... : 178
CONH14 : ...A.C...C...T..T..... : 178
CONH19 : ...T...A.CT..... : 179
CONH20 : ...T...T..C..... : 178
CONH23 : ...T...A.C..... : 178
CONH24 : ...T...A.CT..... : 179
CONH26B : ...T...T..C..... : 178
CONH27 : ...T..G..T..C..... : 178
CONH28 : ...T...T..C..... : 178
CONH29 : ...AT...T..C..... : 178
CONH30 : ...T...T..C...A..... : 179
CONH34 : ...T...T..... : 178
AGGGGAAATAACCTCAGTTCATAGGAATGAATGGGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTCCACTAAGAACTGGAAAAGCCACCAA

```

Figura 37: Secuencias nucleotídicas de los clones de *C. haigi*, *C. mendocinus* y *C. conoveri*.

HE1	:	:	268					
HE2	:	:	268					
HE3	:	:	268					
HE4	:	:	268					
HE5	:	:	268					
HA1	:	:	268					
HA14	:	:	268					
HA15	:	:	268					
HA16	:	:	268					
HA4	:	:	268					
HA5	:	:	268					
HA6	:	:	268					
HA7	:	:	268					
HA8	:	:	268					
CONH5B	:CG.....	:	268					
CONH6B	:CG.....	:	268					
CONH14	:G.CG.....	:	268					
CONH19	:AC.....	:	269					
CONH20	:GGG.....	:	268					
CONH23	:CG.....	:	268					
CONH24	:	...T.A.....	:	268					
CONH26B	:	...T.A.....	:	268					
CONH27	:	...T.A.....	:	268					
CONH28	:	...T.A.....	:	268					
CONH29	:	...T.A.....	:	268					
CONH30	:	...T.A.....	:	269					
CONH34	:	...G.....	:	268					
CTTCGCCTATACTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAAACCTGCACACTTCTGAATTGGTTTGGAAACCAAAGTCACA									
		280	*	300	*	320	*	340	*
HE1	:T.....	:	348					
HE2	:	:	348					
HE3	:	:	348					
HE4	:	:	348					
HE5	:	:	348					
HA1	:	:	348					
HA14	:	:	348					
HA15	:	:	348					
HA16	:	:	348					
HA4	:	:	348					
HA5	:	:	348					
HA6	:	:	348					
HA7	:	:	348					
HA8	:	:	348					
CONH5B	:	:	348					
CONH6B	:	:	348					
CONH14	:	:	348					
CONH19	:	:	349					
CONH20	:	:	348					
CONH23	:	:	348					
CONH24	:	:	348					
CONH26B	:	:	348					
CONH27	:	:	348					
CONH28	:	:	348					
CONH29	:	:	348					
CONH30	:	:	349					
CONH34	:	...G.....A.....	:	348					
CATTAGCCAAATTGCTCTATTTTGGCTATATGAGCAAACAGCCATTGCAGTCCCTGCCTTCCCAATGAAGCTGGAGCTCAG									

Figura 37 (continuación).

La mayoría de las variantes se encuentran distribuidas en forma aleatoria y corresponden a sitios que presentan variantes en una sola secuencia (*singletons*). No se observó ningún sitio que posea una base distintiva en todos los clones de una especie, respecto de las otras. Este tipo

	20	40	60				
haigi				59			
mendo				59			
conoveri				60			
SRPC				59			
	CTGGCTGTTCTCTATTTCAGAACTCAGTCTTAGAAACAAACATGCATGGAGCACAAAGAAAT						
	*	80	*	100	*	120	
haigi							118
mendo							118
conoveri							120
SRPC							118
	TACATCTTGAACCTACCCTGCATACATACCAGGGTAAAATAACCTCAGTTCCCATAGGAAT						
	*	140	*	160	*	180	
haigi							178
mendo							178
conoveri							180
SRPC							178
	GAATGGGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTGCACTAAGAACTGGAAAGCCACCAA						
	*	200	*	220	*	240	
haigi							: 238
mendo							: 238
conoveri							: 240
SRPC							: 238
	CTTCGCCTATACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAACCCTGCACAC						
	*	260	*	280	*	300	
haigi							298
mendo							298
conoveri							300
SRPC							298
	TTCTGAATTGGTTTGGAAACCAAAGTGACACATTAGCCAAATTGCTGTATTTGCTATAT						
	*	320	*	340	*		
haigi							348
mendo							348
conoveri							350
SRPC							348
	GAGGAAACAGGCATTGCAGTGCCCTGCTTCCAATGAAGCTGGAGCTCAG						

Figura 38: Alineación de las secuencias consenso de los clones del satélite de *C. haigi*, *C. mendocinus* y *C. conoveri* y del clon de SRPC de *C. porteousi* (Rossi 1990).

de sitios se denomina sitio diagnóstico, y es una indicación de que los procesos de evolución concertada han homogeneizado completamente ese sitio en una especie. Sin embargo, existen sitios que muestran un patrón de homogeneización parcial. Por ejemplo, el sitio 27 lleva una T en todos los clones excepto en 4 clones de *C. mendocinus*, donde hay una G. Algo similar ocurre en los sitios 74, 215 y 230. Algunos sitios, como el 43 y el 94, contienen

una base común a todos los clones de *C. conoveri* excepto uno, y otra base común a todos los demás clones. Esto evidencia una homogeneización casi completa en estos sitios en *C. conoveri*, si se los compara con los de *C. haigi* y *C. mendocinus*. Los sitios contiguos 243 y 244 parecen estar sujetos, ambos, a los mismos eventos de evolución concertada en forma simultánea. En *C. conoveri* existen las variantes GG (mayoritariamente), AC, GC y GT, mientras que los clones de las otras dos especies tienen CT, excepto un clon de *C. haigi* que tiene GG.

Las similitudes globales entre las distintas variantes analizadas del satélite pueden visualizarse en un árbol obtenido por el método de NJ (figura 39). Todos los clones de *C. conoveri* derivan de un mismo nodo, es decir el parecido es más alto entre ellos que con las secuencias de las otras especies. El otro grupo contiene intercalados a los clones de *C. haigi* y *C. mendocinus*. La secuencia de SRPC de *C. porteousi* (Rossi et al. 1990) fue incluida en el análisis y se agrupó en este último nodo. Los clones de *C. haigi* y *C. mendocinus* no se diferencian claramente en este árbol, a pesar de que estas dos especies no guardan una relación muy estrecha. Los clones de *C. conoveri* tienen ramas comparativamente más largas que los de las otras dos especies, en concordancia con la mayor variabilidad observada en dicha especie.

3.6.5. Comparación de las secuencias de PCR y los clones

Una reacción de PCR que amplifique en forma aleatoria los monómeros de una secuencia repetida, es decir, sin ningún sesgo respecto de la secuencia blanco, debería proporcionar una secuencia representativa de los nucleótidos presentes en cada posición de la mayoría de las unidades que forman el satélite. Para evaluar si esto ocurrió en este caso, se compararon las secuencias de los monómeros amplificadas por PCR a partir de ADN genómico y las secuencias de los clones. La figura 40 a, b y c muestra la alineación de las secuencias de los clones de *C. mendocinus*, *C. haigi* y *C. conoveri*, respectivamente, junto con la secuencia de los productos de PCR para cada especie.

En la mayor parte de los sitios que poseen una variante en sólo una de las secuencias (*singletons*) la base registrada en la secuencia de PCR fue la

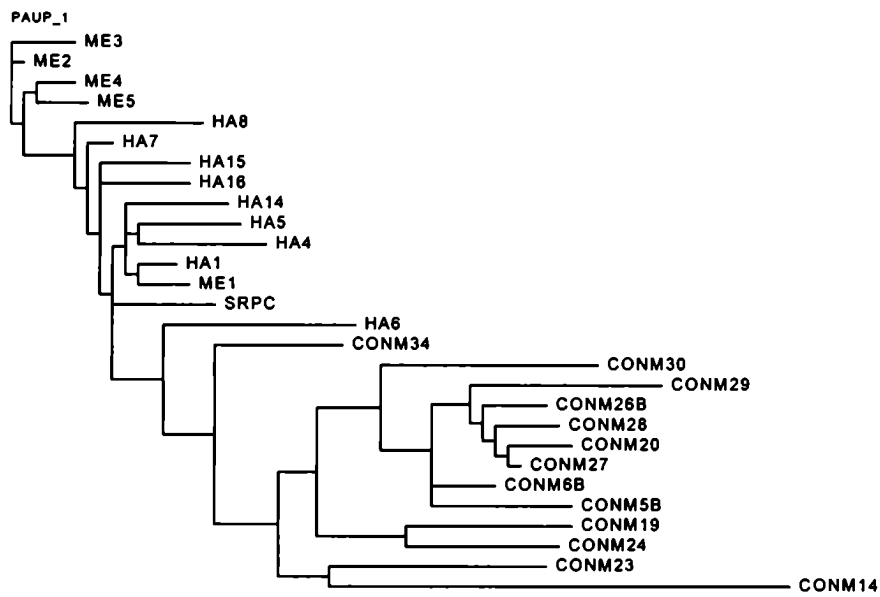


Figura 39: Árbol de los clones de SRPC de *C. haigi*, *C. mendocinus* y *C. conoveri* obtenido por el método de NJ con distancia de Kimura 2 parámetros.

mayoritaria. Por ejemplo, los sitios 5, 9, 27, y 45 en *C. mendocinus*, 7, 19, 30 y 31 en *C. haigi* y 7, 8, 12 y 22 en *C. conoveri*. Lo contrario (la secuencia de PCR registró la base que está presente en sólo una secuencia) ocurrió en la posición 122 de *C. conoveri*. En otros sitios se registró una base minoritaria (posición 15 en *C. conoveri*). La posición 90 en la misma especie tiene A en 8 clones, G en dos, C en uno y T en 2, siendo esta última la base en la secuencia de PCR. Los sitios 101 y 104 presentan también este tipo de situación.

En el caso de las posiciones que registraron más de una base en la secuencia de PCR, existe una buena correlación con las variantes presentes en los clones. Por ejemplo, la posición 60 en *C. haigi* presenta K en la secuencia de PCR (T y G), mientras que 6 clones tienen T y los restantes 3 tienen G. La posición 67 en *C. conoveri* tiene Y en PCR (T y C), mientras que en 7 clones hay C y en los otros 7 hay T. Otros 4 sitios de esta especie muestran también sitios ambiguos en la PCR y ambas variantes presentes en más de un clon. En *C. conoveri* existen 12 posiciones donde la secuencia de PCR tiene ambigüedad y sólo uno de los clones presenta una variante diferente al resto (siempre la ambigüedad representa a las dos variantes observadas en los clones). Llamativamente, en 11 de estos sitios, la variante diferente se encuentra en el clon CONM14.

Por último, existen posiciones variables en los clones donde las variantes están presentes en proporciones significativas pero la secuencia de PCR no registró ambigüedad. Por ejemplo, la posición 11 en *C. conoveri* tiene 8 T, 4 A y una C, y la PCR registra solo T. La posición 268 tiene A en la PCR, aunque 6 clones tienen T. Los sitios 15, 69, 235, 244, 284 y 335 presentan casos similares.

Como puede verse en la figura 33, donde se muestran las secuencias obtenidas a partir los productos de PCR de cada especie, la secuencia consenso de todos los clones (anteúltima línea en la figura) tiene gran similitud con el consenso de las secuencias de PCR y a su vez con cada una de ellas.

	20	40	60	
CONM34	: T . T		G-AC C . . .	59
CONM23	: T		- . C	59
CONM29	:		-AG	59
CONM26B	:		-A	59
CONM28	:		-	59
CONM20	:		-	59
CONM27	:		-	59
CONM6B	:		-	59
CONM5B	:		-	59
CONM30	: CG . T			60
CONM19	: T . A		-	59
CONM24	: T . T		-	59
CONM14	: A C		-	59
conoveriPC	: T S		-	59
	CTGGCTGTTCTCTACTCAGAACTCAGTCTTAGAAACAAACATCCGTGGAGCACAAGAAAT			
	* 80	* 100	* 120	
CONM34	: T . . . G . A	-CC A . T	T	118
CONM23	: T . . . G . A	-CT A . C . T		118
CONM29	: A	-		118
CONM26B	:	-		118
CONM28	:	-		118
CONM20	:	-		118
CONM27	:	-		118
CONM6B	:	-		118
CONM5B	:	-		118
CONM30	: G . T . C . G	-		119
CONM19	: T A CAT G A . CT . T			119
CONM24	: T . . TG . A CA G . G A . CT . T . T . . A			119
CONM14	: T . CT . GT . AT . . . AT . . AG . -TT . . A . C . . . C . T . T . . T			118
conoveriPC	: Y . . . K . RY MG . -CT M . . . C . T . W . . Y			118
	CACATCCTGAATAAGCCTGCATACATACAAAGGTGAAATATCCCCAGTTCATAGGAAT			
	* 140	* 160	* 180	
CONM34	:			: 178
CONM23	:			: 178
CONM29	:			: 178
CONM26B	:			: 178
CONM28	:			: 178
CONM20	:			: 178
CONM27	:			: 178
CONM6B	:			: 178
CONM5B	:			: 178
CONM30	:			: 179
CONM19	:			: 179
CONM24	:		T	: 179
CONM14	: . C C		A	: 178
conoveriPC	: . C . K A			: 131
	GAATGGGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCACCTAAGAAGTGGAAAGCCACCAA			

Figura 40 a: Alineación de las secuencias de los clones junto con la secuencia del producto de PCR de *C. conoveri*.

```

                200                220                240
CONM34 : ..... : 238
CONM23 : ..... : 238
CONM29 : ..... : 238
CONM26B : ..... : 238
CONM28 : ..... : 238
CONM20 : ..... : 238
CONM27 : ..... : 238
CONM6B : ..... : 238
CONM5B : ..... : 238
CONM30 : ..... : 239
CONM19 : ..... : 239
CONM24 : ..... : 239
CONM14 : .C.....G..... : 238
conoveriPC : -----S..... : 150
                CTTTGCATATACTTTCTTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAACTGCACAC

                *      260      *      280      *      300
CONM34 : .....G..... : 298
CONM23 : ..... : 298
CONM29 : .....A..... : 298
CONM26B : ..A..... : 298
CONM28 : .....A..... : 298
CONM20 : ..... : 298
CONM27 : ..... : 298
CONM6B : ..... : 298
CONM5B : ..... : 298
CONM30 : ..... : 299
CONM19 : ..... : 299
CONM24 : ..... : 298
CONM14 : .....AG.G.....C..... : 298
conoveriPC : .....WR.S.....Y..... : 210
                TTGGGAATTGGTTGGAAACCAAAGTGACACATTAGCCAAATTGCTGTATTTGCTATAT

                *      320      *      340      *
CONM34 : .....A.....T..... : 348
CONM23 : .....T..... : 348
CONM29 : ..... : 348
CONM26B : ..... : 348
CONM28 : ..... : 348
CONM20 : ..... : 348
CONM27 : ..... : 348
CONM6B : ..... : 348
CONM5B : ..... : 348
CONM30 : ..... : 349
CONM19 : .....T..... : 349
CONM24 : .....T..... : 348
CONM14 : .CT.G.....A..... : 348
conoveriPC : .M.R.....A..... : 260
                GAGGAAACAGGCATTGCAGTGCCCTGCTTCCCAACGAAGCTGGAGCTCAG

```

Figura 40 a (continuación).


```

                20                40                60
HA14 : .....T.....G : 60
HA1  : .....G : 60
HA5  : .....G : 60
HA8  : .....C..C..... : 60
HA7  : .....A..G..... : 60
HA15 : .....G..... : 60
HA16 : .....A..... : 60
HA4  : .....AT..... : 60
HA6  : ..... : 60
haigiPCR : .....K : 60
          CTGGCTGTTCTCTATT CAGAACTCAGTCTTAGAAACAAACATGATGGAGCACAAGAAATT

                *                80                *                100                *                120
HA14 : .....A..... 120
HA1  : .....T..... 120
HA5  : ..... 120
HA8  : ..... 120
HA7  : ..... 120
HA15 : ..... 120
HA16 : ..... 120
HA4  : .....T..... 120
HA6  : T.....A..T..... 120
haigiPCR : ..... 120
          ACATCTTGAACTACCCTGCATACATACCAGGGGAAATAACCTCAGTTCCCATAGGAATGA

                *                140                *                160                *                180
HA14 : .....C..... : 180
HA1  : ..... : 180
HA5  : ..... : 180
HA8  : ..... : 180
HA7  : ..... : 180
HA15 : ..... : 180
HA16 : ..... : 180
HA4  : ..... : 180
HA6  : .....C..... : 180
haigiPCR : .....N...T----- : 154
          ATGGGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCAC TAAGAACTGGAAAGCCACCAACT

                *                200                *                220                *                240
HA14 : .....A.....C..... : 240
HA1  : ..... : 240
HA5  : .....A..A..... : 240
HA8  : ..... : 240
HA7  : ..... : 240
HA15 : ..... : 240
HA16 : ..... : 240
HA4  : ..... : 240
HA6  : ..... : 240
haigiPCR : -----G..... : 194
          TCGCCTATACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGAGTTGCAACACTCACAACCCTGCACACTT

```

Figura 40 b: Alineación de las secuencias de los clones junto con la secuencia del producto de PCR de *C. haigi*.

```

*           260           280           300
HA14      : .....T.....C..... : 300
HA1       : ..... : 300
HA5       : ..... : 300
HA8       : ..... : 300
HA7       : ..... : 300
HA15      : .....A.....G..... : 300
HA16      : ..... : 300
HA4       : ..... : 300
HA6       : GG..... : 300
haigi PCR : S..... : 254
           CTGAATTGGTTTGGAAACCAAAGTGACACATTAGCCAAATTGCTGTATTTTGCTATATGA

*           320           *           340
HA14      : .....G..... : 348
HA1       : .....T..... : 348
HA5       : ..... : 348
HA8       : ..... : 348
HA7       : ..... : 348
HA15      : ..... : 348
HA16      : .....A.....G.....A : 348
HA4       : .....T..T.....G..... : 348
HA6       : .....G.....G..... : 348
haigi PCR : ..... : 302
           GGAAACAGGCATTGCAGTGCCCTGCTTCCCAATGAAGCTGGAGCTCAG

```

Figura 40 b (continuación)

		20	40	60			
ME3	:			60		
ME2	:			60		
ME4	:			60		
ME5	:			60		
ME1	:			60		
mendo PCR	:			60		
		CTGGCTGTGCTCTATT CAGAACTCAGGCTTAGAAACAAACATGATGGAGCACAAGAAATT					
		*	80	*	100	*	120
ME3	:A.....A..			120		
ME2	:A..			120		
ME4	:			120		
ME5	:			120		
ME1	:AG.....			120		
mendo PCR	:W.....			120		
		ACATCTTGAACCTTCCCTGCATACATACCAGGGGAAATAACCTCAGTTCCCATAGGAATGA					
		*	140	*	160	*	180
ME3	:C.....			: 180		
ME2	:			: 180		
ME4	:			: 180		
ME5	:			: 180		
ME1	:			: 180		
mendo PCR	:			: 148		
		ATGGGAGAGAAAACATGTGCCTGTATCTCTTTTGCCTAAGAACTGGAAAGCCACCAACT					
		*	200	*	220	*	240
ME3	:			: 240		
ME2	:			: 240		
ME4	:			: 240		
ME5	:			: 240		
ME1	:			: 240		
mendo PCR	:G.....			: 200		
		TCGCCTATACTTTCTCTTAGGAGACTGAACGACTTGCAACACTCACAGCCCTGCACACTT					
		*	260	*	280	*	300
ME3	:C.....G..			: 300		
ME2	:			: 300		
ME4	:			: 300		
ME5	:			: 300		
ME1	:			: 300		
mendo PCR	:M.....			: 260		
		CTGAATTGGTTTGGAAACCAAAGTGACACATTAGCCAAATGCTGTATTTTGCTATATGA					
		*	320	*	340		
ME3	:			: 348		
ME2	:			: 348		
ME4	:			: 348		
ME5	:			: 348		
ME1	:			: 348		
mendo PCR	:			: 308		
		GGAAACAGGCATTCAGTGCCCTGCTTCCCAATGAAGCTGGAGCTCAG					

Figura 40c: Alineación de las secuencias de los clones junto con la secuencia del producto de PCR de *C. mendocinus*.

4. DISCUSIÓN

Como se ha planteado al comienzo de esta tesis, se intentó aportar información y análisis tendientes a avanzar en la comprensión de varios aspectos de la evolución de este particular género de roedores sudamericanos, y al mismo tiempo, estudiar distintos aspectos de la evolución de las secuencias repetidas.

4.1. Patrones y tiempos de la cladogénesis en *Ctenomys*

Un requisito insoslayable para analizar la evolución de cualquier rasgo en un grupo de organismos es contar con un panorama filogenético confiable del grupo en cuestión. Esfuerzos realizados por numerosos investigadores han mostrado que las relaciones evolutivas de las especies de *Ctenomys* son particularmente elusivas, siendo paradójicamente los fenómenos causantes de esto, los que convierten a este género en un modelo atractivo para la biología evolutiva.

Hasta hace sólo unos pocos años, los trabajos de filogenia en *Ctenomys* se realizaron sobre conjuntos parciales de especies, que generalmente representaban regiones geográficas más o menos localizadas, con poca superposición de entidades taxonómicas entre ellas. El estudio de Lessa y Cook (1998), el primero en utilizar secuencias nucleotídicas como caracteres, incluyó especies principalmente de Bolivia, aunque también algunos representantes de distribución más austral. Más recientemente, Mascheretti y col. (2000), utilizando secuencias parciales de citocromo b, analizaron unas 14 especies argentinas no representadas en el trabajo de Lessa y Cook (1998). El estudio presentado en esta tesis, se complementa con los dos anteriores, permitiendo ampliar el panorama de la discusión de las relaciones filogenéticas en *Ctenomys*. En general, las relaciones entre especies bolivianas concuerdan con las previamente establecidas en análisis basados en caracteres morfológicos (Anderson et al. 1987), alozímicos (Cook and Yates 1994) y de secuencias de ADN (Lessa and Cook 1998). Las especies que componen el grupo "boliviensis" (tabla 3) mostraron tener una estrecha relación

(figuras 13 a 19). La forma ROBO ha sido mencionada por Cook y Yates (1994) como parte del complejo "*boliviensis*". *C. goodfellowi*, por su parte, ha sido tratada en algunos casos como una subespecie del mismo complejo (Reig et al. 1992). A pesar de las grandes diferencias cariotípicas con los taxones mencionados, *C. steinbachi* es posiblemente una especie afin a ellos (figuras 14, 17 y 18). Esta relación había sido sugerida ya por Cook y Yates (1994) en base a estudios de alozimas. Además, *C. steinbachi* se distribuye parapátricamente respecto de *C. boliviensis*. El clado "boliviano-paraguayo" (tabla 3) fue consistentemente recuperado en los análisis que forman el presente trabajo (figuras 13 a 19). La asociación entre *C. frater* y *C. lewisi* era ya conocida a partir de diversos trabajos (Anderson et al. 1987; Cook and Yates 1994; Lessa and Cook 1998). Osgood (1946) había propuesto que *C. conoveri* representa una forma distintiva, creando en consecuencia el subgénero *Chacomys* para incluir a dicha especie. Sin embargo, tal distinción no se verifica a través de las hipótesis filogenéticas presentadas aquí, así como en otros trabajos (Cook and Yates 1994; Lessa and Cook 1998).

Es notable también la cohesión mostrada por los representantes de las especies *C. opimus* y *C. fulvus*, denominadas grupo "altiplano" en este estudio (figuras 13 a 19). Estas especies, junto con *C. robustus* constituyen un grupo homogéneo con similares cariotipos ($2N=26$; $NF=48$) y patrones de bandeo C (Gallardo 1991), que habitan las áreas desérticas de altura en el norte de Chile, Argentina y oeste de Bolivia. Tanto las topologías de los árboles filogenéticos, como las distancias genéticas muestran que la forma de *C. opimus* de Jujuy está más diferenciada de las de Chile y Bolivia, respecto a las poblaciones de *C. fulvus*. Al tomar en cuenta este resultado (de gran consistencia en el presente trabajo) junto con sus similitudes en otros aspectos (Gallardo 1991), podría considerarse la posibilidad de que, al menos las dos especies representadas en este estudio, son coespecíficas. Sería interesante entonces llevar a cabo un estudio más detallado, con datos intraespecíficos de las tres especies que forman este grupo para resolver el estado taxonómico de las mismas.

La monofilia del llamado grupo mendocinus ha sido señalada desde que sus cariotipos fueron descritos por primera vez (Massarini et al. 1991). Otras

investigaciones propusieron la inclusión de *C. flamarioni* y *C. rionegrensis* en este grupo (D'Elía et al. 1999). Desde el punto de vista citogenético, *C. flamarioni* ha sido estudiado por de Freitas (1994), quien sugiere también la pertenencia de esta especie al grupo mendocinus en virtud de las similitudes cariotípicas. Los análisis presentados aquí señalan consistentemente la monofilia del grupo mendocinus, al mismo tiempo que coinciden en la estrecha relación entre *C. rionegrensis* y *C. flamarioni* con éste (figuras 13 a 15, 18 y 19). La relación entre *C. pearsoni* con el grupo es también sugerida por los árboles, así como la relación con *C. talarum*, formando el conjunto de estas especies, el grupo "central" (figuras 13 a 15, 18 y 19). Esta especie comparte el número cromosómico con especies del grupo mendocinus (Massarini et al. 1991), aunque existen diferencias en los patrones de bandas G y características morfológicas (Ortells and Barrantes 1994). Si bien *C. azarae* no fue incluido en el presente estudio, el análisis con secuencias parciales de citocromo b de Mascheretti y col. (2000) mostró que *C. azarae* se asocia fuertemente a *C. mendocinus*. Los tres especímenes de *C. mendocinus* utilizados en este estudio no forman un grupo monofilético. Uno de los ejemplares exhibe una relación más cercana con otros miembros del grupo mendocinus que con los dos ejemplares restantes de *C. mendocinus* (figuras 13 a 19). Es posible que algunas de las numerosas poblaciones de tuco-tucos que han sido asignadas a *C. mendocinus* representen en realidad formas diferentes pero a su vez cercanamente relacionadas a las especies ya reconocidas del grupo (C. Borghi, comunicación personal). Las características exhibidas por este interesante grupo de especies representan un desafío para el concepto linneano de especie debido a la dificultad en determinar los límites entre ellas (Massarini et al. 1991).

Las especies que conforman el grupo "sur", que mostraron en estos análisis una estrecha relación entre sí (figuras 13 a 19), son parte del nutrido e interesante conjunto de especies y poblaciones que habitan la Patagonia. Hasta el momento se han descrito ocho especies en la zona, principalmente andinas. Recientemente, Jiménez y col. (2000) y Bidau y col. (2000) estudiaron poblaciones de tuco-tucos de la región costera de las provincias de Chubut y Río Negro, con lo que la presencia del género en la Patagonia parece ser al

menos tan conspicua como en otras zonas de su distribución. Estos autores llevaron a cabo análisis filogenéticos y encontraron que dichas poblaciones guardan relación con *C. haigi*, que habita en la zona de Bariloche. Esto indicaría que estas poblaciones costeras no estarían relacionadas con *C. talarum* ó *C. australis*, que ocupan las costas de la Provincia de Buenos Aires, sino con el *stock* que colonizó la Patagonia, distribuyéndose desde la Cordillera de los Andes hasta la costa atlántica.

La relación entre el grupo “sur” y el grupo “tucumanus” (figuras 13 a 17) resulta intrigante, ya las áreas que ocupan ambos grupos están separadas por centenares de kilómetros, al mismo tiempo que numerosas especies, con poca relación con ellos, ocupan el área intermedia. Si se confirmara la afinidad entre estos grupos en análisis más abarcativos, se plantearían interesantes preguntas acerca de la dinámica de dispersión en los tuco-tucos.

No ha sido posible determinar la afinidad de las especies que no forman parte de los grupos definidos en la tabla 4. Esto puede ser una consecuencia de que la muestra de secuencias utilizada, aunque numerosa, resulta aún incompleta o sesgada para algunos grupos en particular.

Al igual que en los estudios previos de filogenia molecular en el género (Lessa and Cook 1998; D'Elía et al. 1999; Mascheretti et al. 2000), aquí también se presenta la dificultad para resolver las relaciones al nivel de los nodos basales del árbol. La presencia de la gran politomía basal en algunos análisis no se modificó al incorporar en el presente trabajo un importante número de especies al estudio (figuras 14 a 16 y 19). Al mismo tiempo, puede observarse que las diferencias de las topologías obtenidas por MP, MV y NJ está principalmente al nivel de las relaciones entre grupos de divergencia temprana o basal (figuras 13 a 19).

Sin embargo, los agrupamientos a partir de nodos relativamente más recientes resultan consistentes, en su mayoría, con los resultados obtenidos con las diferentes metodologías analíticas (figuras 13 a 19). Esta situación obliga a ser cauteloso, tomando en cuenta solamente aquellos agrupamientos de especies que reciben soporte de la mayoría de los análisis. Lessa y Cook (1998) discutieron el problema en términos de politomías “duras” y “blandas”, y concluyeron que en este caso, la incapacidad del marcador en resolver la

divergencia basal se debe a que la misma ocurrió en forma explosiva, con lo que la incerteza en la filogenia de *Ctenomys* genera una politomía “dura”. Una postura más estricta sostiene que en la mayoría de los casos las politomías son blandas, ya que la divergencia virtualmente simultánea de más de dos linajes es improbable (Slowinski 2001). Sin embargo, si bien es cierto que en última instancia la cladogénesis será siempre dicotómica, es razonable considerar la velocidad con que ocurren los eventos especiogénicos respecto de la velocidad de evolución de las secuencias nucleotídicas. Procesos que culminan en el aislamiento definitivo de poblaciones separadas, ocurridos en un lapso de decenas de miles de años, podrían parecer simultáneos respecto del proceso de evolución molecular, aún cuando se utilicen marcadores de evolución rápida. Una característica que estaría señalando un caso de politomía dura, como ya ha sido discutido por Lessa y Cook (1998), y por Lara y col. (1996) es que la falta de resolución se observa en un determinado nivel del árbol, a pesar de que la resolución es buena por encima y por debajo de ese nivel. Las politomías blandas están causadas por la falta de resolución del marcador debida a las homoplasias introducidas por sustituciones múltiples en los sitios de evolución más rápida. En el caso de *Ctenomys*, un gráfico de sustituciones versus divergencia muestra que la relación es lineal, indicando que la saturación por múltiples sustituciones no es significativa al nivel de la divergencia entre las especies del género (figura 41).

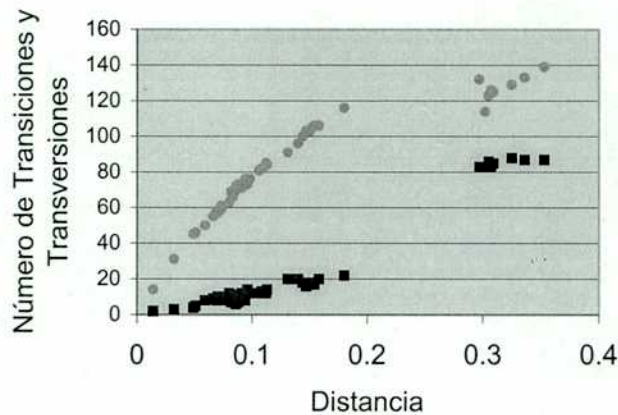


Figura 41: Relación entre el número de sustituciones y la distancia genética en el gen citocromo b para un conjunto de especies de *Ctenomys*. Tv: transversiones, ti: transiciones.

¿Será posible, entonces resolver la historia de la cladogénesis inicial en el género? La clave para superar este problema reside en encontrar el marcador genético que haya incorporado variación informativa durante el período en el que la radiación de los principales linajes tuvo lugar. Algunas regiones del genoma nuclear que no están sujetas a restricciones de secuencia (por ejemplo, intrones y pseudogenes) podrían resultar útiles, aunque es necesaria una evaluación previa para evaluar el grado de saturación mutacional, es decir, el problema opuesto.

La información provista por el estudio de las formas fósiles es importante en el esfuerzo de encontrar las relaciones entre los distintos linajes de tuco-tucos. Una exhaustiva revisión de la morfología de los *Ctenomys* fósiles en conjunto con los actuales es un enfoque que resulta clave para resolver al menos en parte el problema planteado (Verzi y Lezcano 1996), ya que de esa forma sería posible encontrar afinidades que relacionen algunas formas primitivas con los linajes actuales. Dicho de otra forma, la resolución de las elusivas relaciones entre los grupos principales podría facilitarse al estudiar los representantes de los nodos ancestrales de la filogenia.

Una cuestión de gran relevancia para comprender el patrón evolutivo de las especies de los tuco-tucos es la duración que pudo haber tenido el período de diversificación inicial. Lessa y Cook (1998) sugirieron que la diversificación fue prácticamente simultánea considerando por un lado la imposibilidad para resolver el orden de ramificación en la base del árbol. Los mismo autores, en otro trabajo (Cook and Lessa 1998), mostraron que la tasa de diversificación fue elevada en la base del género. Además, Reig (1989) propuso una antigüedad de 1,8 millones de años para el género, un período de tiempo evolutivo muy corto para la especiogénesis de los tuco-tucos, si se considera que se han descrito más de 60 especies. No obstante, la presencia de la especie extinta *C. chapalmalensis* en estratos de edad Sanandresense (Vucetich y Verzi 1995) sugiere que el origen del género debe haber ocurrido en una antigüedad bastante mayor al final de esta edad, situada en los 2,5 millones de años (Verzi 2001). Más aún, análisis en curso sugieren que un material fósil proveniente de Salta, podría tener más de 3 millones de años (D. Verzi, comunicación personal). Por lo tanto, el valor de 5 millones de años obtenido en esta tesis por reloj molecular con las secuencias de citocromo b no parece exagerado (ver ítem 3.2). El análisis de tiempo de divergencia realizado en esta tesis sugiere que el período durante el cual se originaron los linajes principales pudo haber durado hasta unos 2 millones de años (figura 20, área gris), ya que este es el tiempo estimado entre la divergencia entre los dos primeros linajes de tuco-tucos y el origen de los grupos filogenéticamente resueltos (tabla 3). Si la cladogénesis hubiese ocurrido con eventos regulares a lo largo de ese tiempo, probablemente no resulte imposible dados los marcadores adecuados, llegar a una resolución de las relaciones entre los principales linajes. Sin embargo, la estimación no descarta que el período de diversificación haya tenido una duración más breve, dada la inestabilidad de los nodos en esta región del árbol.

En resumen, el panorama actual del conocimiento de las relaciones filogenéticas dentro del género *Ctenomys* ha avanzado enormemente durante la última década. Sage y col. (1986) habían opinado que "la taxonomía de *Ctenomys* está en un estado de caos general". Hoy en día, sin embargo, existe al menos un consenso sobre las relaciones al nivel de algunos grupos de

especies bien delimitados, aunque resta resolver el problema de la politomía basal. La secuenciación de otras regiones del genoma puede aportar la información necesaria para lograr una filogenia que resuelva las relaciones en la base del árbol, así como la incorporación de más especies y un análisis filogenético de los fósiles de los tuco-tucos.

4.2. SRPC y evolución cromosómica en los tuco-tucos

Las especies del género *Ctenomys* contienen el satélite SRPC en cantidades altamente variables (Rossi 1990). Los estudios cuantitativos mostraron que el rango de variación resultó ser de 2 órdenes de magnitud, con 2000 copias en *C. opimus* y más de 6 millones en *C. haigi* (ver ítem 3.3.1). Ante la falta de un adecuado panorama filogenético del género, y en base a un criterio de parsimonia, Rossi (1990) postuló que el número de copias de SRPC caracteriza a especies o grupos de especies filogenéticamente relacionadas. *C. opimus* habría divergido tempranamente, heredando un bajo número de copias. Posteriormente habría ocurrido una gran amplificación, determinando que las especies más recientes hereden un alto contenido de SRPC. Sin embargo, al contar hoy con un panorama filogenético más completo, se hace evidente que el número de copias de SRPC no parece ser un carácter que refleje las relaciones filogenéticas. La inferencia de los valores de número de copias en los nodos internos del árbol mostró que la historia del satélite SRPC fue extremadamente compleja, con múltiples eventos de amplificaciones y deleciones, que ocurrieron independientemente en diferentes linajes (figura 21). Ante este panorama, y dado que otra característica saliente en las especies del género *Ctenomys* es su extrema variabilidad cromosómica, cabría preguntarse si existe una relación entre la dinámica del satélite y la variabilidad cromosómica en estos roedores.

La amplificación y movilización del ADN satélite es un fenómeno bien documentado (por ejemplo, ver Hamilton et al. 1990; Modi 1993a) y se ha sugerido que juega un importante rol en la evolución cariotípica (Wichman et al. 1991; Hamilton et al. 1992; Garagna et al. 1997; Garagna et al. 2001; Yang et al. 1997). Estos procesos pueden tener importantes consecuencias para la arquitectura cromosómica. Por ejemplo, Garagna y col. (2001) dilucidaron la

organización de un ADN satélite en los puntos de fusión involucrados en translocaciones robertsonianas en cromosomas de ratón. Li y col. (2000) demostraron la participación de dos ADN satélites en las fusiones que llevaron a una drástica reducción en el número cromosómico durante la evolución de los ciervos muntjac. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de Wichman y col. (1991), que sugiere que el movimiento intragenómico de secuencias repetidas (estudiado por hibridación *in situ* en cariotipos ancestrales y derivados) promueven la evolución cromosómica. Esta hipótesis es consistente con numerosos casos de evolución cromosómica, incluyendo a *Microtus* (Modi 1993a; 1993c), *Reithrodontomys* (Hamilton et al. 1990), *Peromyscus* (Hamilton et al. 1992) y *Equus* (Bradley and Wichman 1994) (ver ítem 1.6.2). El enfoque abordado en esta tesis combinó un marco filogenético con información cariotípica y de la evolución del ADN satélite, permitió investigar el impacto del ADN satélite sobre la evolución cromosómica.

Los tuco-tucos han sido reconocidos como un modelo excepcional para investigar la dinámica de los rearrreglos cromosómicos (Reig et al. 1990). El satélite de origen retroviral SRPC, presente en los genomas de estos roedores (Rossi et al. 1995b; Pesce et al. 1994) ha sido vinculado con la extrema variabilidad cromosómica registrada en este grupo (Rossi et al. 1995a). La variabilidad cromosómica en algunos grupos de especies de *Ctenomys* es comparable a los casos que han sido considerados de evolución cromosómica rápida. Bush y col. (1977) calcularon velocidades de evolución cromosómica en algunos grupos de mamíferos. La mayor tasa de diversificación cromosómica que obtuvieron fue para los caballos y fue de 0,61 cambios en el cariotipo cada millón de años. Wang y Lan (2000) hicieron lo propio con los ciervos muntjac de China e India, resultando una tasa de entre 1 y 2,1 cambios en el cariotipo cada millón de años. En los tuco-tucos, por ejemplo, el grupo de especies "sur" exhibe grandes diferencias cariotípicas entre sus integrantes. El análisis de tiempos de divergencia (figura 20) mostró que el grupo "sur" se habría originado hace unos 2,5 millones de años. Si se asume tal antigüedad para la divergencia entre *C. coyhaiquensis* (2N=28, NF=44)(Kelt and Gallardo 1994) y *C. haigi* (2N=50, NF=66)(Gallardo 1991), y se considera el número de cambios que pueden haber ocurrido, se puede concluir que la tasa de diversificación

cariotípica en este grupo de tuco-tucos podría ser aún mayor que los ejemplos citados.

El análisis de la evolución del número de copias de SRPC conjuntamente con la variabilidad cromosómica en los linajes mostró dos patrones diferenciados. Un patrón se caracterizó por una alta variabilidad en el número de copias entre especies cercanamente relacionadas, acompañada por una sustancial variación cromosómica. El otro patrón presenta en números de copias más bien estables dentro de grupos cariotípicamente más estables. El primer patrón es reflejado por tres grupos bien definidos. En el grupo "tucumanus" el SRPC exhibe deleciones, especialmente en la rama que conduce a *C. tucumanus* (figura 21). Aunque los cariotipos de estas especies se diferencian por muchos rearrreglos (Reig et al. 1992) (ver números cromosómicos en la figura 21), la afinidad filogenética entre ellas es clara. Más impresionante es el caso de las especies del grupo "sur". En este grupo ocurrieron tanto grandes amplificaciones como deleciones (figura 21), las cuales fueron acompañadas por altos niveles de variación cromosómica. En este caso, el cariotipo mayormente bibraquiado de *C. coyhaiquensis* ($2N=28$, $NF=44$) (Kelt and Gallardo 1994) evolucionó en el cariotipo principalmente monobraquiado de *C. haigi* ($2N=50$, $NF=66$) (Gallardo 1991). Estos rearrreglos habrían sido acompañados por importantes expansiones del SRPC, y serían principalmente fisiones, aunque Gallardo (1991) señala también que la presencia de bandas de heterocromatina intersticial en *C. haigi* sería evidencia de otros rearrreglos más complejos. No puede descartarse, sin embargo, el proceso inverso en el linaje de *C. coyhaiquensis*.

Finalmente, si se acepta la estrecha relación de *C. steinbachi* con el grupo "boliviensis" (Cook and Yates 1994; Lessa and Cook 1998), este grupo sería otro representante del primer patrón de evolución (gran dinámica del satélite y alta variación cromosómica). *C. steinbachi* ($2N=10$) es una especie que ha sufrido evolución cariotípica extensa y rápida a partir de cariotipos con números cromosómicos más altos, evolución que ha sido acompañada por una disminución de 46 veces de SRPC (figura 21).

El segundo patrón se caracteriza por estabilidad cariotípica asociada a números de copias de SRPC similares y fue observado en el grupo

mendocinus y en el grupo "altiplano" (tabla 3). El contenido de SRPC es uniformemente alto en los miembros del grupo mendocinus. La inferencia del número de copias en los nodos ancestrales sugiere que hubo una importante amplificación en el origen del grupo, manteniéndose los valores altos a lo largo de las ramas (figura 21). Al mismo tiempo, el grupo se caracteriza por una marcada estabilidad cromosómica, tanto en número como en morfología cariotípica (Massarini et al. 1991; Freitas 1994). *C. opimus* y *C. fulvus*, que componen el grupo "altiplano" y también *C. robustus*, tienen cariotipos muy similares (Gallardo 1979) y ambos presentaron cantidades casi indetectables de SRPC (tabla 6). Se infirió que una gran deleción ocurrió en el nodo ancestral de este grupo, manteniéndose bajos valores de SRPC a lo largo de las ramas terminales (figura 21). Finalmente, el grupo "boliviano-paraguayo" también muestra contenidos de SRPC relativamente estables, excepto LLATHU, que tiene un contenido de SRPC de casi un millón de copias, frente a los 2 a 3 millones en el resto de los miembros del grupo. Los números diploides son también parecidos, con lo que este grupo podría también mostrar el patrón de estabilidad, aunque para tener un panorama más completo, se necesita la información cariotípica de LLATHU.

La asociación entre dinámica del satélite SRPC y la variabilidad cromosómica en los tuco-tucos apoya la hipótesis de Wichman y col. (1991) sobre el rol del movimiento intragenómico de las secuencias repetidas sobre la evolución cromosómica. La observación en *Ctenomys* indica que la evolución cariotípica está influenciada por la actividad replicativa de SRPC, evidenciada por cambios rápidos en el número de copias. Esta conclusión implica que la influencia del ADN repetido sobre la evolución cromosómica no reside simplemente en su número de copias, sino en su capacidad de involucrarse en procesos replicativos y recombinacionales. De ser así, un ADN satélite "activo" puede promover el cambio cromosómico aunque esté presente en bajo número de copias. Esta propiedad de los ADN satélites podría explicar la excepcional variabilidad cromosómica observada en las poblaciones que habitan en la provincia de Corrientes (ver ítem 1.1.5), ya que muchas de las especies y poblaciones involucradas presentan escaso contenido de heterocromatina en estudios de bandeos C (Reig et al. 1992; Ortells et al. 1995).

4.3. Variabilidad de la secuencia de SRPC

Muchos aspectos de la evolución de los ADN satélites están afectados por procesos relacionados con la recombinación. Dado que la misma es a su vez fuertemente dependiente de la similitud de las regiones involucradas, el estudio la secuencia nucleotídica de un satélite es importante para entender el proceso en su conjunto. Como se explicó en la Introducción (ítem 1.6.3), el modo de evolución de las secuencias repetidas difiere de aquellas que corresponden a genes de copia única y otras regiones genómicas. Las investigaciones en este sentido mostraron que las variantes son capaces de expandirse en una familia repetida por medio de procesos como el entrecruzamiento desigual, la transposición, el círculo rodante y la conversión génica, aunque la contribución relativa de cada proceso no está clara aún (Charlesworth et al. 1994). Este proceso involucra tanto al genoma de un individuo, como de los individuos interfértiles de una población. Asimismo, aunque usualmente se encuentran altos niveles de conservación intraespecífica respecto de la intraespecífica como consecuencia de estos procesos, cada caso puede presentar particularidades que dependen de las propiedades de cada familia de ADN satélite y de las características de la población. Por ejemplo, estudiar la evolución de las secuencias satélites es más fácil en insectos y plantas que en mamíferos, a causa del diferente comportamiento del ADN repetido en estos grupos (Mravinac et al. 2002). La mayoría de los estudios en plantas e insectos muestran que los satélites están altamente homogeneizados entre todos los cromosomas de la especie, y habitualmente no se evidencia una importante estructuración en subfamilias (Bachmann and Sperlich 1993; Tares et al. 1993; Elder and Turner 1995; King et al. 1995; Bachmann et al. 1996; King and Cummings 1997; Pons et al. 1997; Plohl et al. 1998; Mravinac et al. 2002). En los mamíferos, sin embargo, los satélites suelen presentar subfamilias, a veces específicas de cromosomas o de grupos de cromosomas, y estructuración de las repeticiones en unidades de orden superior. Muchas veces las subfamilias son evolutivamente más antiguas que las especies que las contienen, y exhiben mayor similitud con la misma subfamilia en otras especies que con otras subfamilias en la misma especie

(Durfy and Willard 1990; Baldini et al. 1991; Elder and Turner 1995; Rossi et al. 1995b; Modi 1993; Modi et al. 1996; Blake et al. 1997; Lee et al. 1997; Nijman and Lenstra 2001; Mravinac et al. 2002). Por ejemplo, Modi y col. (1996) describieron un complejo panorama en los genomas de los artiodáctilos, donde coexisten 6 familias de ADNs satélites, algunas de las cuales están relacionadas entre sí, y presentan distribuciones taxonómicas variadas y grandes diferencias en el número de copias tanto entre familias como entre especies. Modi (1993 a y c) analizó un satélite que a pesar de mostrar una importante dinámica de amplificación y contracción, su ubicación está restringida a unas pocas regiones cromosómicas en los roedores del género *Microtus*. Estas características complejas de los satélites de mamíferos determinan que los datos derivados de su estudio resulten menos claros y directos que en el caso de los insectos y otros grupos, aunque para una mejor comprensión de los procesos evolutivos en mamíferos es importante abordar el estudio de los aspectos moleculares del ADN satélites en estos animales.

El satélite SRPC presenta un elevado grado de conservación. Esto surge de los resultados de experimentos *Southern* en condiciones de alta y baja rigurosidad realizados en esta tesis (ítem 3.4) y en estudios previos (Rossi et al. 1995a), y de la comparación interespecífica tanto de las secuencias de clones (figura 37), como de las secuencias consenso obtenidas de productos de PCR (figuras 33, 37 y 38, ítem 6.3).

A pesar de la gran similitud interespecífica, es posible aún reconocer los efectos de los procesos de evolución concertada. La comparación de las secuencias de los clones (figura 37) muestra que algunas posiciones nucleotídicas presentan bases comunes a casi todos los clones de una especie, aunque en ningún caso se observan variantes que tipifiquen una especie, es decir, presentes en todos los clones de una especie y ausente en el resto. Esta diferenciación es más evidente entre *C. conoveri* y las otras dos especies (*C. haigi* y *C. mendocinus*), las cuales muestran más homogeneidad entre sí respecto de *C. conoveri*. En concordancia con esta observación, un árbol de NJ construido con las secuencias de todos los clones (figura 39) muestra que las variantes presentes en el genoma de *C. conoveri* se diferencian claramente de las de *C. haigi* y *C. mendocinus*. Al mismo tiempo,

puede verse que las ramas de las secuencias de *C. conoveri* son más largas, evidenciando que las variantes en esta especie son más divergentes entre sí, probablemente a consecuencia de que *C. conoveri* pertenece a una clado (el grupo "boliviano-paraguayo") relativamente antiguo (figura 20). Los clones de *C. haigi* y *C. mendocinus* muestran gran cohesión entre sí, e incluso uno de los clones de *C. mendocinus* (ME1) tiene mayor similitud con los de *C. haigi* que con los otros cuatro clones de *C. mendocinus*.

La existencia de sitios que presentan variantes compartidas entre dos o más especies ha sido interpretada por Dover y col. (1993) como debida a estados intermedios en el proceso de homogeneización. Dichos autores resaltan que la evolución concertada no es un proceso de "todo o nada". La homogeneización es el resultado de mecanismos dinámicos de conducción molecular, producto de las interacciones entre monómeros, principalmente entre cromosomas homólogos en la meiosis, pero también durante las divisiones somáticas, en las que pueden ocurrir también intercambios entre cromosomas no homólogos y entre regiones de un mismo cromosoma. La homogeneización completa de un sitio nucleotídico (fijación de una variante en todas las repeticiones) no ocurre inmediatamente, sino que, como todo proceso evolutivo, se requiere tiempo para el reemplazo de una variante por otra en una población. Entre los factores que influyen en la distribución de las variantes y el grado de homogeneización de un satélite en una población, son importantes las tasas de intercambio (*turnover*) entre y dentro de los cromosomas que llevan las repeticiones, el número de repeticiones, y la dinámica mutacional (Dover et al. 1993). Desde este punto de vista, la existencia de variantes parcialmente homogeneizadas entre especies relativamente alejadas en *Ctenomys*, como *C. conoveri* respecto de *C. mendocinus* o *C. haigi* puede responder simplemente a que el tiempo transcurrido desde la aparición de una variante en una de las especies no fue suficiente para permitir la homogeneización completa. Por otro lado, si el intercambio entre determinados cromosomas o campos cromosómicos se encuentra restringido, con lo cual las repeticiones que estén ubicadas en uno u otro cromosoma o región evolucionarán en forma independiente, las variantes presentes no podrán homogeneizarse entre sí. Para resolver este punto, será necesario estudiar en detalle la distribución

cromosómica de variantes que muestran patrones de homogeneización parcial, para determinar si alguna variante está confinada a una región de entrecruzamiento restringido. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la elevada tasa de evolución cromosómica en algunas especies podría causar que alternancias temporales en el estado de restricción de los arreglos de repeticiones de SRPC.

La estrategia de amplificación por PCR y secuenciación del producto mostró ser efectiva tanto para realizar una evaluación rápida de la variabilidad intraespecífica (ítem 3.6.2 y tabla 6), como para comparar la diferenciación interespecífica de SRPC (ítems 3.6.2; 6.3 y figura 34). Los valores de diferenciación interespecífica se corresponden muy bien con los obtenidos a partir de las secuencias de los clones (tabla 7). Se estimó la variabilidad intraespecífica medida como porcentaje de sitios con variantes (tabla 6), aunque, como resulta de la comparación de las secuencias de los clones, algunas variantes minoritarias no fueron detectadas. Los valores son bajos para *C. haigi* y *C. mendocinus* y más altos para *C. conoveri*, en concordancia con la variabilidad calculada a partir de los clones. Las secuencias consenso de los productos de PCR resultaron también informativos para la evaluación de los sitios sometidos a homogeneización, aunque teniendo en cuenta que no siempre las variantes minoritarias son detectadas. Sin embargo, en el caso particular de *C. conoveri*, la comparación del consenso de PCR con los clones muestra que la secuencia de PCR está sesgada a favor de una variante que no es representativa de la mayoría de los clones. Muchas variantes presentes sólo en el clon CONM14 de *C. conoveri* aparecen también representadas en la secuencia consenso de los productos de PCR (figura 40a). Es posible que, en este caso los cebadores estén favoreciendo a alguna o algunas variantes en particular.

Cuando un conjunto de secuencias repetidas (típicamente familias génicas) no está sujeto a procesos de evolución concertada, las copias evolucionarán independientemente, como ocurre con genes ortólogos de copia única al compararlos en distintos linajes. Para describir la relación entre las distintas copias de la familia multigénica, como los genes de globinas, los genes ribosomales y los ADN satélites se utiliza la palabra paralogía, para

diferenciarla de la ortología, que hace referencia a la relación entre genes en distintas especies o linajes originados por eventos de cladogénesis. Patterson (1988) notó que los miembros de una familia repetida que está sujeta a homogeneización, guardan una relación que resulta mayor que la esperada por evolución independiente de cada uno de ellos. El autor propuso el término plerología para enfatizar que se trata de secuencias sometidas a una serie de mecanismos de evolución concertada, es decir que evolucionan en conjunto. La plerología implica que cualquiera de las secuencias representa a todos los miembros de la familia, por lo que cualquiera podría utilizarse como se utilizan las secuencias ortólogas. El mejor ejemplo de este caso es el de los genes ribosomales (ver ítem 1.6.3 en Introducción). Estos genes están altamente homogeneizados; cuando aparece una variante en una copia, es “transmitida” al resto de las copias, o bien revierte a la versión original. Se ha intentado en ocasiones utilizar secuencias satélites como marcadores filogenéticos. Muchmore y col. (1998) secuenciaron el satélite presente en cinco especies cercanas de gastrópodos marinos. La variación encontrada les permitió establecer relaciones de parentesco entre ellas. Kunze y col. (1999) hicieron lo propio con un ADN satélite pericéntrico de roedores del género *Acomys*, aunque en ninguno de los casos citados se compararon los resultados con hipótesis filogenéticas externas.

En *Ctenomys*, sólo en algunos casos el agrupamiento por distancias de las secuencias consenso de SRPC obtenidas a partir de los productos de la amplificación por PCR reflejó relaciones congruentes con las obtenidas en los análisis con citocromo b (figura 34). Las secuencias consenso de las especies del grupo “boliviano-paraguayo” por un lado, y “altiplano” por el otro, aparecen asociados respectivamente en dos *clusters*. El *cluster* que incluye a las especies del grupo “boliviano-paraguayo”, incluye también a *C. tuconax*, cuya posición resultó incierta en los análisis filogenéticos, y a *C. steinbachi*, posiblemente asociado al grupo “boliviensis”. Los otros *clusters* del árbol incluyen especies de diversos grupos (figura 34).

La falta de congruencia del análisis de *cluster* de NJ con las secuencias de SRPC respecto de los árboles filogenéticos de citocromo b puede adjudicarse, en algunos casos, a la falta de variación entre las secuencias

consenso, que en algunos casos difieren en muy pocos sitios (ítem 6.3). Otro aspecto que debe tenerse en cuenta, que limitaría la utilidad de las secuencias satélites como marcadores filogenéticos, es que la evolución concertada haya favorecido a diferentes variantes en especies cercanamente relacionadas, ya sea difundiendo una variante por mecanismos recombinacionales (conversión génica, entrecruzamiento desigual), o por amplificación por círculo rodante. En este caso, la relación entre las variantes mayoritarias presentes en las distintas especies puede no reflejar las relaciones filogenéticas entre las mismas. Por ejemplo, dos eventos de amplificación independientes que ocurran en especies o grupos con estrecha relación, pueden causar la expansión de variantes muy diferentes, con lo que la comparación del consenso de dicho satélite no representará el parentesco entre los grupos.

4.4. Dinámica de la evolución de SRPC

Al igual que otros aspectos de los genomas eucariotas, los ADN satélites presentan características complejas, por lo que la comprensión de los mecanismos involucrados en su dinámica evolutiva y los patrones resultantes, son difíciles de abordar sin la ayuda de una gran cantidad de datos experimentales, así como de modelos teóricos y simulaciones. Luego de una primera etapa durante la cual se comenzó a recopilar datos al nivel citogenético y estructural, y luego de secuencia, se desarrollaron los primeros modelos que intentaban describir la evolución de los satélites, basados en simulaciones por computadora (Charlesworth et al. 1994). Sólo recientemente, se propuso un modelo integral para describir diferentes etapas intragenómicas en la historia de un ADN satélite, llamado modelo de retroalimentación (Nijman and Lenstra 2001). El modelo tiene como premisa que las interacciones moleculares que resultan en la dinámica de un ADN repetido (amplificación, delección, conversión génica, entrecruzamiento desigual, etcétera), dependen de la recombinación, que a su vez depende de la homogeneidad de secuencia en las regiones involucradas. Por lo tanto, los procesos que influyen en la homogeneidad de secuencia de los satélites tienen gran importancia en este modelo. Según Nijman y Lenstra (2001), la historia de un satélite presenta una fase inicial, en la cual el satélite es homogéneo, por lo que se favorecen interacciones que

causan tanto expansiones como contracciones del satélite. Dado que el número de interacciones depende del número de copias (es decir, del número de las secuencias que son sustrato de la recombinación), cuando el resultado neto de las interacciones es la amplificación, se genera un circuito de retroalimentación positiva, produciéndose cambios rápidos y sustanciales en el número de copias (figura 42).

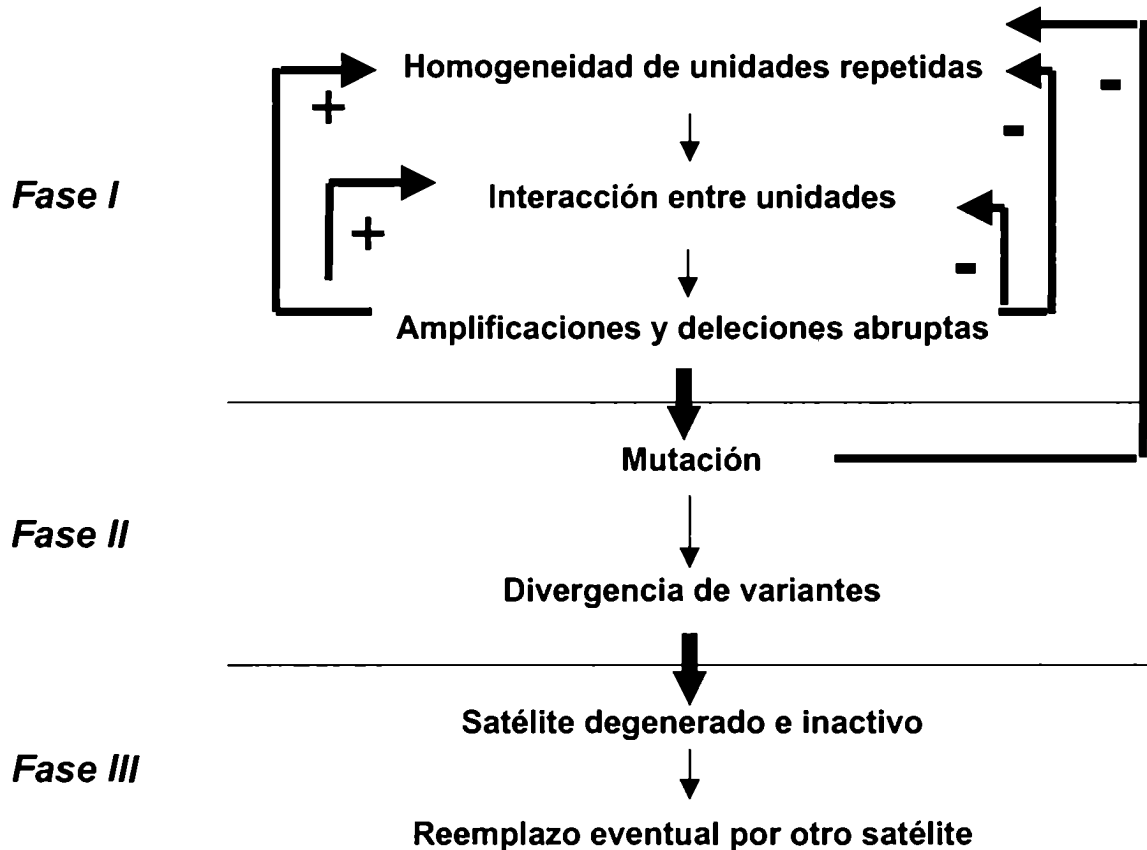


Figura 42: Modelo de retroalimentación de la evolución del ADN satélite. Los signos "+" y "-" indican retroalimentación positiva y negativa, respectivamente. Tomado de Nijman y Lenstra (2001).

Cuando la mutación comienza a introducir sustituciones en algunas unidades, se inicia la segunda fase en la historia del satélite, durante la cual están privilegiadas las interacciones entre monómeros con mayor similitud de secuencia. La consecuencia de este proceso mutacional es, entonces, la amplificación o contracción de las distintas variantes. Si la interacción involucra dos o más unidades, pueden aparecer arreglos de orden superior (unidades de mayor tamaño, formadas por dos o más monómeros). Finalmente, cuando la acumulación de mutaciones no es contrarrestada por la propagación de una

variante en particular, la pérdida gradual de homogeneidad será probablemente irreversible, con lo que el satélite entrará en una fase terminal (figura 42). En esta fase, las interacciones entre unidades del satélite, tanto intra como intercromosomales se detienen. La ausencia de mecanismos que aseguren el mantenimiento subsiguiente del satélite conducirá a su remoción o, eventualmente, su reemplazo por otro satélite.

Los datos del satélite SRPC que se obtuvieron en esta tesis pueden ser analizados a la luz de las predicciones del modelo descripto. Como la divergencia entre los octodontinos y los ctenominos fue estimada en 10 millones de años (Quintana 1994; Verzi 1999), el satélite tiene al menos esa edad. Dentro del contexto del modelo de retroalimentación, el satélite SRPC es más bien antiguo, por lo tanto debería exhibir características típicas de la fase final. Esto parece ser cierto en el caso de los géneros de octodontinos, donde el satélite no es notablemente activo en términos de cambio en el número de copias, al menos cuando se lo compara con el género *Ctenomys*. Sin embargo, en las especies de tuco-tucos, el satélite ha sufrido sustanciales expansiones y contracciones en el número de copias (figura 21). Este escenario sugiere que variantes de la secuencia ancestral (la que encontramos hoy en octodontinos sería la más parecida a ésta) surgieron en el linaje que condujo al género *Ctenomys*, originando una nueva y "joven" subfamilia que entró en la fase inicial (figura 42). Como predice el modelo de retroalimentación, esta fase muestra drásticos cambios en el número de copias, como ocurrió, por ejemplo, en la base del grupo "central", y en linajes de los grupos "sur" y "tucumanus" (figura 21).

Los niveles de divergencia interespecifica estaría reflejando que el satélite estaría atravesando por diferentes etapas en determinadas especies o grupos de especies. Aquellas que muestran mayor homogeneidad de secuencia tendrían su satélite en la primera etapa, como puede ser el caso del grupo "central", mientras que aquellos linajes que presentan más divergencia en sus repeticiones estarían atravesando una etapa más avanzada, como podría ser el caso del grupo "boliviano-paraguayo", el cual es uno de los grupos antiguos (figura 20) y presenta además valores altos de variación nucleotídica en el satélite (tablas 6 y 7).

4.5. SRPC como agente de evolución en los tuco-tucos

Los resultados presentados aquí muestran claramente que el SRPC es un componente sumamente dinámico de los genomas de las especies de *Ctenomys*. Como se discutió más arriba (ítem 4.2), la relación entre la dinámica del satélite y la evolución cromosómica es evidente, y respondería a las propiedades de la SRPC en tanto que secuencia altamente repetida, es decir, con capacidad de funcionar como sustrato para procesos recombinacionales que promueven rearrreglos cromosómicos.

Las complejas características que presenta el satélite SRPC, concuerdan con lo predicho por el modelo de retroalimentación, según el cual el SRPC estaría atravesando diferentes etapas de la historia de vida en diferentes linajes, explicando la multiplicidad de patrones evolutivos observados. Por otro lado, este satélite, al ser de origen retroviral, tiene la potencialidad de influir sobre la regulación génica del genoma portador (Pesce et al. 1994; Rossi et al. 1995a), constituyendo un factor más que señala al satélite SRPC como un agente promotor del cambio evolutivo.



5. Bibliografía

- Alderton, D. (1996) *Rodents of the World*, Blandford, London.
- Altuna, C.A., Novello, A.F. & Lessa, E.P. (1985) Notas sobre la morfología espermática de *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Brenesia*, **24**, 397-401.
- Anderson, S., Yates, T.L. & Cook, J.A. (1987) Notes on Bolivian Mammals 4: The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *American Museum Novitates*, **2891**, 1-20.
- Antinuchi, C.D. & Busch, C. (1992) Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Z. Saugetierkunde*, **57**, 163-168.
- Apfelbaum, L.I., Massarini, A.L., Dakeffe, L.E. & Reig, O.A. (1991) Genetic variability in the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteوسي* (Rodentia: Octodontidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **19**, 467-476.
- Attardi, G. (1985) Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Internatl. Rev. Cytol.*, **93**, 93-145.
- Awise, J.C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*, Chapman & Hall, New York.
- Bachmann L. & Sperlich D. (1993) Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 647-659.
- Bachmann, L., Venanzetti, F. & Sbordoni, V. (1996) Tandemly repeated satellite DNA of *Dolichopoda schiavazzii*: a test for models on the evolution of highly repetitive DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **43**, 135-144.
- Bailey, W.J., Fitch, D.H.A., Tagle, D.A., Czelusniak, J., Slightom, J.L. &
-

- Goodman, M. (1991) Molecular evolution of the psi-nu-gene locus: Gibbon phylogeny and the hominoid slowdown. *Molecular Biology and Evolution*, **8**, 155-184.
- Baker, R.J. & Bickham, J.W. (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **83**, 8245-8248.
- Baldini, A., Miller, D.A., Miller, O.J., Ryder, O.A. & Mitchell, A.R. (1991) A chimpanzee-derived chromosome-specific alpha satellite DNA sequence conserved between chimpanzee and human. *Chromosoma*, **100**, 156-161.
- Barros, M.A. & Patton, J.L. (1985) Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). III. Fluorochrome-revealed heterochromatin heterogeneity. *Chromosoma*, **92**, 337-343.
- Basolo, A.L. (1990) Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science*, **250**, 808-810.
- Beckman, J.S. & Weber, J.L. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**, 627-31.
- Benedum, U.M., Neitzel, H., Sperling, K., Bogenberger, J. & Fittler, F. (1986) Organization and chromosomal distribution of a novel repetitive DNA component from *Muntiacus muntjak vaginalis* with a repeat length of more than 40 kb. *Chromosoma*, **94**, 267-272.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. & Allshire, R.C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.
- Best, S., Le Tissier, P.R. & Stoye, J.P. (1997) Endogenous retroviruses and the evolution of resistance to retroviral infections. *Trends in Microbiology*, **5**, 313-318.
-

- Bidau, C. J., Giménez, M. D., Contreras, J. R., Argüelles, C. F., Braggio, E., D'Errico, R., Ipucha, C., Lanzone, C., Montes, M., & Suárez, P. (2000) Variabilidad cromosómica y molecular inter- e intraespecíficas en *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae, Octodontoidea): Múltiples patrones evolutivos? IX Congreso Iberoamericano de Biodiversidad y Zoología de Vertebrados.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blake, R.D., Wang, J.Z. & Beauregard, L. (1997) Repetitive sequence families in *Alces alces americana*. *Journal of Molecular Evolution*, **44**, 509-520.
- Blanchette, M., Kunisawa, T. & Sankoff, D. (1999) Gene order breakpoint evidence in animal mitochondrial phylogeny. *Journal of Molecular Evolution*, **49**, 193-203.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A. & Karpen, G.H. (2002) Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell*, **2**, 319-330.
- Bock, M. & Stoye, J.P. (2000) Endogenous retrovirus and the human germline. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**, 651-655.
- Borrueal, N., Campos, C.M., Giannoni, S.M. & Borghi, C.E. (1998) Effect of herbivorous rodents (cavies and tuco-tucos) on a shrub community in the Monte Desert, Argentina. *Journal of Arid Environments*, **39**, 33-37.
- Bostock, C.J. (1986) Mechanisms of DNA sequence amplification and their evolutionary consequences. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **312B**, 261-273.
- Bradley, R.D. & Wichman, H.A. (1994) Rapidly evolving repetitive DNAs in a conservative genome: a test of factors that affect chromosomal evolution. *Chromosome Research*, **2**, 354-360.
-

- Brown, D.D., Wensink, P.C. & Jordan, E. (1972) A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: evolution of tandem genes. *Journal of Molecular Evolution*, **63**, 57-73.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **18**, 225-239.
- Bucheton, A. (1995) The relationship between the flamenco gene and gypsy in *Drosophila*: how to tame a retrovirus. *Trends Genet*, **11**, 349-353.
- Bulmer, M. (1991) Strand symmetry of mutation rates in the beta globin region. *Journal of Molecular Evolution*, **33**, 305-310.
- Busch, C. (1987) Haematological correlates of burrowing in *Ctenomys*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **86A**, 461-463.
- Busch, C., Malizia, A.I., Scaglia, O. A. & Reig, O. A.. (1989) Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, **70**, 204-208.
- Busch, C., Antinuchi, C.D., del Valle, J.C., Kittlein, M.J., Malizia, A.I., Vassallo, A.I. & Zenuto, R.R. (2000) Population ecology of subterranean rodents. *Life underground. The biology of subterranean rodents*. (ed. by E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron), pp. 183-226. The Chicago University Press., Chicago.
- Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C. & Patton, J.L. (1977) Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 3942-3946.
- Cáceres, M., Ranz, J.M., Barbadilla, A., Long, M. & Ruiz, A. (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science*, **285**, 415-418.

- Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P.P. (1998) *DNA markers. Protocols, applications and overviews*, Wiley-Liss, New York.
- Cantrell, M.A., Filanoski, B.J., Ingermann, A.R., Olsson, K., DiLuglio, N., Lister, Z. & Wichman, H.A. (2001) An ancient retrovirus-like element contains hot spots for SINE insertion. *Genetics*, **158**, 769-77.
- Capanna, E. (1982) Robertsonian numerical variation in animal speciations: *Mus musculus* an emblematic model. *Mechanisms of speciation* (ed. by C. Bariogozzi), pp.155-177. A.R. Liss Inc., NY.
- Capy, P., Bazin, C., Higuete, D. & Langin, T. (1997) *Dynamics and evolution of transposable elements*. Landes Bioscience, Austin, Texas.
- Carleton, M.D. (1984) Introduction to rodents. *Orders and Families of Recent Mammals of the World* (ed. by S. Anderson and J.K. Jones), pp.255-265. John Wiley and Sons, N.Y.
- Cavalier-Smith, T. (1985) *The evolution of genome size*, Wiley, N.Y.
- Charlesworth, B., Langley, C.H. & Stephan, W. (1986) The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences. *Genetics*, **112**, 947-962.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P. & Stephan, W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, **371**, 215-220.
- Cione, A.L. & Tonni, E.P. (1995) Chronostratigraphy and "Land Mammal Ages" in the Cenozoic of southern South America: Principles, practices and the "Uquian" problem. *Journal of Paleontology*, **69**, 135-159.
- Conroy, C.J. & Cook, J.A. (2000) Phylogeography of a post-glacial colonizer: *Microtus longicaudus* (Rodentia: muridae). *Mol Ecol.*, **9**, 165-75.

- Contreras, L.C., Torres-Mura, J.C. & Spotorno, A.E. (1990) The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent. *Experientia*, **46**, 506-508.
- Cook, J. A. (1990) Rapid chromosomal evolution and the systematics of the Bolivian tuco-tucos (Rodentia, Ctenomyidae). University of New Mexico, Albuquerque, N.M.
- Cook, J.A., Lessa, E.P. & Hadly, E.A. (2000) Paleontology, phylogenetic patterns, and macroevolutionary processes in subterranean rodents. *Life underground: the biology of subterranean rodents*. (ed. by E. Lacey, J.L. Patton and G. Cameron), pp. 332-369. University of Chicago Press, Chicago.
- Cook, J.A. & Lessa, E.P. (1998) Are Rates of Diversification in Subterranean South American Tuco-Tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Unusually High? *Evolution*, **52**, 1521-1527.
- Cook, J.A. & Yates, T.L. (1994) Systematic relationships of the Tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, **75**, 583-599.
- Cortes, A., Miranda, E., Rosenmann, M. & Rau, J.R. (2000) Thermal biology of the fossorial rodent *Ctenomys fulvus* from the Atacama desert, northern Chile. *J. Therm. Biol*, **25**, 425-430.
- Csink, A.K. & Henikoff, S. (1998) Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics*, **15**, 200-204.
- Cunningham, C.W., Omland, K.E. & Oakley, T.H. (1998) Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 361-366.
- Cutler, D.J. (2000) Estimating divergence times in the presence of an

- overdispersed molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1647-1660.
- D'Elía, G., Lessa, E.P. & Cook, J.A. (1998) Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *Z. Saugetierkunde*, **63**, 285-296.
- D'Elía, G., Lessa, E.P. & Cook, J.A. (1999) Molecular Phylogeny of Tuco-Tucos, Genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): Evaluation of the mendocinus Species Group and the Evolution of Asymmetric Sperm. *Journal of Mammalian Evolution*, **6**, 9-38.
- Demastes, J.W., Spradling, T.A., Hafner, M.S., Hafner, D.J. & Reed, D.L. (2002) Systematics and phylogeography of pocket gophers in the genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22**, 144-54.
- DeSalle, R. (1994) Implications of ancient DNA for phylogenetic studies. *Experientia*, **50**, 542-550.
- Doolittle, W.F. & Sapienza, C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, **284**, 601-3.
- Dover, G.A. (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, **299**, 111-117.
- Dover, G.A., Ruiz Linares, A., Bowen, T. & Hancock, J.M. (1993) Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods in Enzymology*, **224**, 525-541.
- Dover, G.A., Strachan, T., Coen, E.S. & Brown, S.D. (1982) Molecular drive. *Science*, **218**, 1069.
- Durfy, S.J. & Willard, H.F. (1990) Concerted evolution of primate alpha satellite
-

- DNA. Evidence for ancestral sequence shared by gorilla and human X chromosome alpha satellite. *J. Mol. Biol.*, **216**, 555-566.
- Easteal, S., Collet, C. & Betty, D. (1995) *The mammalian molecular clock.*, R.G. Landes, Austin, TX.
- Edelman, G.M. & Gally, J.A. (1970) Arrangement and evolution of eukaryotic genes. *The neurosciences: second study program.* (ed. by F.O. Schmitt), pp.962-972. Rockefeller University Press, New York.
- Eggleston, W.B., Rim, N.R. & Lim, J.K. (1996) Molecular characterization of hobo-mediated inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **144**, 647-56.
- Erlich, D., Fedorov, V.B., Stenseth, N.C., Krebs, C.J. & Kenney, A. (2000) Phylogeography and mitochondrial DNA (mtDNA) diversity in North American collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Mol Ecol.*, **9**, 329-37.
- Elder, J.F. & Turner, B.J. (1994) Concerted evolution at the population level: Pupfish HindIII satellite DNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **91**, 994-998.
- Elder, J.F. & Turner, B.J. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, **70**, 297-320.
- Ellerman, J.R. (1940) *The families and genera of living rodents. Vol. 1: Rodents other than muridae.* British Museum (Natural History), London.
- Evgen'ev, M.B., Zelentsova, H., Poluectova, H., Lyozin, G.T., Veleikodvorskaja, V., Pyatkov, K.I., Zhivotovsky & Kidwell, M.G. (2000) Mobile elements and chromosomal evolution in the virilis group of *Drosophila*. *Proc. Nat.*
-

Acad. Sci., **97**, 11337-11342.

Farris, J. (1969) A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology*, **18**, 374-385.

Farris, J. (1973) On the use of the parsimony criterion to inferring evolutionary trees. *Systematic Zoology*, **22**, 250-256.

Farris, J. (1989) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics*, **5**, 417-419.

Feito, R. & Gallardo, M.H. (1976) Notes on the sperm morphology of *Ctenomys maulinus* (Rodentia, Octodontidae). *Experientia*, **32**, 735-736.

Feito, R. & Gallardo, M.H. (1982) Sperm morphology of the Chilean species of *Ctenomys* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, **63**, 658-661.

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

Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). University of Washington, Seattle.

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

Felsenstein, J. (1985b) Phylogenies and the Comparative Method. *American Naturalist*, **125**, 1-15.

Freitas, T.R. (1994) Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **67**, 193-198.

-
- Freitas, T.R.O. & Lessa, E.P. (1984) Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, **65**, 637-642.
- Gallardo, M.H. (1979) Las especies chilenas de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). I. Estabilidad cariotípica. *Arch. Biol. Med. Exper.*, **12**, 71-82.
- Gallardo, M.H. (1991) Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, **72**, 11-21.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A. & Köhler, N. (1999) Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, **401**, 341
- Gallardo, M.H. & Köhler, N. (1992) Genetic divergence in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from the Andes of Chile. *Journal of Mammalogy*, **72**, 99-105.
- Gallardo, M.H., Köhler, N. & Araneda, C. (1995) Bottleneck effects in local populations of fossorial *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) affected by vulcanism. *Heredity*, **74**, 638-646.
- Gallardo, M.H., Köhler, N. & Araneda, C. (1996) Loss of genetic variation in *Ctenomys coyhaiquensis* (Rodentia, Ctenomyidae) affected by vulcanism. *Mastozoología Neotropical*, **3**, 7-13.
- Garagna, S., Marziliano, N., Zuccotti, M., Searle, J.B., Capanna, E. & Redi, C.A. (2001) Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 171-175.
- Garagna, S., Pérez-Zapata, A., Zuccotti, M., Mascheretti, S., Marziliano, N., Redi, C.A., Aguilera, M. & Capanna, E. (1997) Genome composition in Venezuelan spiny-rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae).
-

- I. Genome size, C-heterochromatin and repetitive DNAs in situ hybridization patterns. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **78**, 36-43.
- Garfinkel, D.J., Curcio, M.J., Youngren, S.D. & Sanders, N.J. (1989) The biology and exploitation of the retrotransposon Ty in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome*, **31**, 909-919.
- Gasser, R.B., Zhu, X., Chilton, N.B., Newton, L.A., Nedergaard, T. & Guldberg, P. (1998) Analysis of sequence homogenisation in rDNA arrays of *Haemonchus contortus* by denaturing gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **14**, 2391-2395.
- Gaubatz, J.W. (1990) Extrachromosomal circular DNAs and genomic sequence plasticity in eukaryotic cells. *Mutation Research*, **237**, 271-292.
- Gilbert, N. & Allan, J. (2001) Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 11949-11954.
- Giménez, M.D., Bidau, C.J., Argüelles, C.F. & Contreras, J.R. (1999) Chromosomal characterization and relationship between two new species of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from northern Córdoba province, Argentina. *Z. Saugetierkunde*, **64**, 91-106.
- Giménez, M.D., Contreras, J.R. & Bidau, C.J. (1997) Chromosomal variation in *Ctenomys pilarensis*, a recently described species from eastern Paraguay (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalia*, **61**, 385-398.
- Giménez, M. D., Montes, M. A., Searle, J. B., and Bidau, C. J. Estudio evolutivo de poblaciones costeras de *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) de la Provincia de Chubut (Argentina). XV Jornadas Argentinas de Mastozoología.
- Goodman, M. (1963) Man's place in the phylogeny of primates as reflected in serum proteins. *Classification and human evolution* (ed. by S. L.

- Washburn), pp. 204-234. Aldine, Chicago, IL.
- Grant, V. (1981) *Plant speciation*, Columbia University Press, N.Y.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. & Lewontin, R.C. (2000) *Genética moderna*, McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Hall, W.P. (1983) Modes of speciation and evolution in the scleroporine iguanid lizards. I. Epistemology of the comparative approach and introduction to the problem. *Advances in herpetology and evolutionary biology* (ed. by A.G. Rhodin and K. Miyata), pp.643-679. Harvard University, Cambridge, MA.
- Hamilton, M.J., Honeycutt, R.L. & Baker, R.J. (1990) Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. *Chromosoma*, **99**, 321-329.
- Hamilton, M.J., Hong, G. & Wichman, H.A. (1992) Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **60**, 40-44.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hancock, J.M. (1996) Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays*, **18**, 762-818.
- Harris, D., Rogers, D.S. & Sullivan, J. (2000) Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology*, **9**, 2129-35.
- Hartl, D.L., Moriyama, E.N. & Sawyer, S. A. (1994) Selection intensity for codon bias. *Genetics*, **138**, 227-234.
-

- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160-174.
- Hatch, F.T., Bodner, A.J., Mazrimas, J.A. & Moore, D.H. (1976) Satellite DNA and cytogenetic evolution. DNA quantity, satellite DNA and karyotypic variations in kangaroo rats (genus *Dipodomys*). *Chromosoma*, **58**, 155-168.
- Hedges, S.B., Parker, P.H., Sibley, C.G. & Kumar, S. (1996) Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature*, **381**, 226-229.
- Hedrick, P.W. (1981) The establishment of chromosomal variants. *Evolution*, **35**, 322-332.
- Henikoff, S. (2002) Near the edge of a chromosome's 'black hole'. *Trends Genet*, **18**, 165-167.
- Hennig, W. (1966) *Phylogenetic systematics*, University of Illinois Press, Illinois.
- Henning, W (1999) Heterochromatin. *Chromosoma*, **108**, 1-9.
- Hey, J. (2001) The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 326-329.
- Hilliker, A.J. & Chovnick, A. (1981) Further observations on intragenic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res*, **38**, 281-296.
- Hillis, D.M. & Huelsenbeck, J.P. (1992) Signal, noise and reliability in molecular phylogenetic analysis. *Journal of Heredity*, **83**, 189-195.
- Hillis, D.M. & Huelsenbeck, J.P. (1995) Assessing molecular phylogenies. *Science*, **267**, 255-256.

- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996) *Molecular systematics*, Sinauer, Sunderland, MA.
- Hoffstetter, R. (1975) El origen de los Caviomorpha y el problema de los Hystricognathi (Rodentia). 1er. Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía. 74. Tucumán.
- Honacki, J.H., Kinman, K.E. & Koepl, J.W. (1982) *Mammal species of the world*, Allen Press and Assoc, Lawrence, Kansas.
- Hudson, R.R., Kreitman, M. & Aguadé, M. (1987) A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics*, **116**, 153-159.
- Hudson, T.J., Engelstein, M., Lee, M.K., Ho, E.C., Rubenfield, M.J., Adams, C.P., Housman, D.E. & Dracopoli, N.C. (1992) Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms. *Genomics* , **13**, 622-9.
- Huelsenbeck, J.P., Larget, B. & Swofford, D.L. (2000) A compound Poisson process for relaxing the molecular clock. *Genetics*, **154**, 1879-1892.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. & Wilson, A.C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, **32**, 128-144.
- Jagadeeswaran, P., Forget, B.G. & Weissman, S.M. (1981) Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA pol III transcripts? *Cell*, **26**, 141-142.
- Jamain, S., Girondot, M., Leroy, P., Clergue, M., Quach, H., Fellous, M. & Bourgeron, T. (2001) Transduction of the human gene FAM8A1 by endogenous retrovirus during primate evolution. *Genomics* , **78**, 38-45.
- Janecek, L.L., Honeycutt, R.L., Adkins, R.M. & Davis, S.K. (1996) Mitochondrial
-

- gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily Bovinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **6**, 107-119.
- Jeffreys, A.J., MacLeod, A., Tamaki, K., Neil, D.L. & Monckton, D.G. (1991) Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, **354**, 204-209.
- Jermann, T.M., Opitz, J.G., Stackhouse, J. & Benner, S.A. (1995) Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature*, **374**, 57-59.
- Jobse, C., Buntjer, J.B., Haagsma, N., Breukelman, H.J., Beintema, J.J. & Lenstra, J.A. (1995) Evolution and recombination of bovine DNA repeats. *Journal of Molecular Evolution*, **41**, 277-283.
- John, B. (1988) The biology of heterochromatin. *Heterochromatin* (ed. by R.S. Verma), Cambridge University Press, Cambridge.
- John, B. & King, M. (1983) Population cytogenetics of *Atractomorpha similis*. I. C band variation. *Chromosoma*, **88**, 57-68.
- John B. & Miklos, G.L.G. (1988) *The eukaryotic genome in development and evolution*, Allen and Urwin, London.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism III*. (ed. by H.N. Munro), p.79-95. Springer-Verlag, Tokyo.
- Kelt, D.A. & Gallardo, M. (1994) A New Species of Tuco-tuco. Genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) from Patagonian Chile. *Journal of Mammalogy*, **75**, 338-348.
- Kiblicky, P., Brum-Zorrilla, N., Pérez, G. & Sáez, F.A. (1977) Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador

- del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Mendeliana*, **2**, 85-93.
- Kidwell, M.G. & Lisch, D. (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **94**, 7704-7711.
- Kim, I., Phillips, C.J., Monjeau, J.A., Birney, E.C., Noack, K., Pumo, D.E., Sikes, R.S. & Dole, J.A. (1998) Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology*, **7**, 667-78.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Kimura, M. (1983) *The neutral theory of molecular evolution*, Cambridge University Press, Cambridge.
- King, K., Jobst, J. & Hemleben, V. (1995) Differential homogenization and amplification of two satellite DNAs in the genus *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Journal of Molecular Evolution*, **41**, 996-1005.
- King, L.M. & Cummings, M.P. (1997) Satellite DNA repeat sequence variation is low in three species of burying beetles in the genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae). *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 1088-1095.
- King, M. (1981) Chromosome change and speciation in lizards. *Evolution and speciation* (ed. by W.R. Atchley and D. Woodruff), pp.262-285. Cambridge University Press, London.
- King, M. (1993) *Species evolution. The role of chromosome change*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kirsch, J.A.W., Dickerman, A.W., Reig, O.A. & Springer, M.S. (1991) DNA hybridization evidence for the Australian affinity of the American marsupial *Dromiciops australis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **88**, 10465-10469.

- Kishino H. & Hasegawa M. (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *Journal of Molecular Evolution*, **29**, 170-179.
- Kishino H., Thorne, J.L. & Bruno, W.J. (2001) Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 352-361.
- Kiyama, R., Oishi, M. & Kanda, N. (1989) Cytoplasmic localization of human repetitive DNA revealed by in situ hybridization. *Exp Cell Res*, **183**, 239-244.
- Kooistra, W.H. & Medlin, L.K. (1996) Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): IV. A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **6**, 391-407.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S. & Bhattacharya. (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, **288**, 1789-1796.
- Kreitman, M. (1983) Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **304**, 412-417.
- Kreitman, M. & Akashi, H. (1995) Molecular evidence for natural selection. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **26**, 403-422.
- Kunze, B., Traut, Garagna, S., Weichenhan, D., Redi, C.A. & Winking, H. (1999) Pericentric satellite DNA and molecular phylogeny in *Acomys* (Rodentia). *Chromosome Research*, **7**, 131-141.
- Lacey, E.A. (2001) Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*, **86**, 628-637.

- Lacey, E.A., Braude, S.H. & Wieczorek, J.R. (1997) Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy*, **78**, 556-562.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G. (1984) A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*, **20**, 86-93.
- Lande, R. (1985) The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. *Heredity*, **54**, 323-332.
- Lara, M.C., Patton, J.L. & Silva, M.N. (1996) The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5**, 403-413.
- Lee, C., Court, D.R., Cho, C., Haslett, J.L. & Lin, C.C. (1997) Higher-order organization of subrepeats and the evolution of cervid satellite I DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **44**, 327-335.
- Lessa, E.P. (1993) Analysis of DNA sequence variation at population level by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, **224**, 419-428.
- Lessa, E.P. & Cook, J.A. (1998) The Molecular Phylogenetics of Tuco-Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**, 88-99.
- Levinson, G. & Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 203-221.
- Lewontin, R.C. & Hubby, J.L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila*

pseudoobscura. *Genetics*, **54**, 595-609.

Li, W.H. (1997) *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA.

Li, Y.C., Lee, C., Sanoudou, D., Hsu, T.H., Li, S.Y. & Lin, C.C. (2000) Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Research*, **8**, 363-373.

Linneo, C. (1758) *Systema Naturae*. Reimpreso en 1964 por Wheldon and Wesley. Ltd., New York.

Losos, J.B. (1992) The evolution of convergent structure in Caribbean *Anolis* communities. *Systematic Biology*, **41**, 403-420.

Löwer, R., Löwer, J. & Kurth, R. (1996) The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **93**, 5177-5184.

Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L. & Eickbush, T.H. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*, **72**, 595-605.

Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (1997) MacClade Version 3. Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, Mass.

Mager, D.L., Hunter, D.G., Schertzer, M. & Freeman, J.D. (1999) Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics*, **59**, 255-63.

Margoliash, E. (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**, 672-679.

- Martin, A.P. (1995) Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 1124-31.
- Martin, A.P. & Palumbi, S.R. (1993) Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Nat. Acad. Sci.* , **90**, 4087-4091.
- Martin, Y., Gerlach, G., Schlotterer, C. & Meyer, A. (2000) Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16**, 37-47.
- Mascheretti, S., Mirol, P., Giménez, M.D., Bidau, C., Contreras, J.R. & Searle, J.B. (2000) Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontidae), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biol. J. Linn. Soc.*, **70**, 361-376.
- Massarini, A.L., Dyzenchouz, F.J. & Tiranti, S.I. (1998) Geographic variation of chromosomal polymorphism in nine populations of *Ctenomys azarae*, Tuco-tucos of the *Ctenomys mendocinus* group (Rodentia: Octodontidae). *Hereditas*, **128**, 207-211.
- Massarini, A.L., Barros, M.A., Ortells, M.O. & Reig, O.A. (1991) Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica*, **83**, 131-144.
- McDonald, J.F. (1995) Transposable elements: possible catalysis of organismic evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 123-126.
- McDonald, J.H. & Kreitman, M. (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, **351**, 652-654.
- Melen, J. M. (2001) Caracterización del RNA ribosomal 28S del roedor *Ctenomys*: primera evidencia en vertebrados de un rRNA que sufre

- fragmentación y splicing. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Melen, J.M., Pesce, C.G., Rossi, M.S. & Kornblihtt, A.R. (1999) Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an "intron" bearing a hidden break site. *EMBO J*, **18**, 3107-3118.
- Meyer zu Altenschildesche, G., Heller, H., Wilgenbus, P., Tjia, S.T. & Doerfler, W. (1996) Chromosomal distribution of the hamster intracisternal A-particle (IAP) retrotransposons. *Chromosoma*, **104**, 341-4.
- Modi, W.S. (1993a) Comparative analyses of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **62**, 142-148.
- Modi, W.S. (1993b) Heterogeneity in the concerted evolution process of a tandem satellite array in meadow mice (*Microtus*). *Journal of Molecular Evolution*, **37**, 48-56.
- Modi, W.S. (1993c) Rapid, localized amplification of a unique satellite DNA family in the rodent *Microtus chrotorrhinus*. *Chromosoma*, **103**, 484-490.
- Modi, W.S., Gallagher, D.S. & Womack, J.E. (1996) Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the Artiodactyla (Mammalia). *Journal of Molecular Evolution*, **42**, 337-349.
- Montgelard, C., Bentz, S., Tirard, C., Verneau, O. & Catzeflis, F.M. (2002) Molecular systematics of sciurognathi (rodentia): the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes support the Anomaluroidea (Pedetidae and Anomaluridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22**, 220-33.
- Mravinac, B., Plohl, M., Mestrovic, N. & Ugarkovic, D. (2002) Sequence of PRAT Satellite DNA "Frozen" in Some Coleopteran Species. *Journal of*
-

Molecular Evolution, **54**, 774-783.

Muchmore, M.E., Moy, G.W., Swanson, W.J. & Vacquier, V.D. (1998) Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **7**, 1-6.

Nabeyama, M., Kubota, S. & Kohno, S. (2000) Concerted evolution of a highly repetitive DNA family in Eptatretidae (Cyclostomata, Agnatha) implies specifically differential homogenization and amplification events in their germ cells. *Journal of Molecular Evolution*, **50**, 154-169.

Nagylaki, T. (1983) Evolution of a large population under gene conversion. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **80**, 5941-5945.

Nagylaki, T. (1990) Gene conversion, linkage and the evolution of repeated genes dispersed among multiple chromosomes. *Genetics*, **126**, 261-276.

Nei, M., Xu, P. & Glazko, G. (2001) Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**, 2497-2502.

Nelson, O.E. (1975) The waxy locus in Maize III. Effect of structural heterozygosity on intragenic recombination and flanking marker assortment. *Genetics*, **79**, 31-44.

Nevo, E. (1979) Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **10**, 269-308.

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr. & Deerfield, D.W.II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* , **4**, 14

Nijman, I.J. & Lenstra, J.A. (2001) Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats.

Journal of Molecular Evolution, **52**, 361-371.

Novello, A.F. & Lessa E.P. (1986) G-band homology in two karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia: Octodontidae) of neotropical fossorial rodents. *Z. Saugetierkunde*, **51**, 378-380.

Nowak, R.M. (1991) *Walker's mammals of the world*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

O'hUigin, C. & Li, W.-H. (1992) The molecular clock ticks regularly in muroid rodents and hamsters. *Journal of Molecular Evolution*, **35**, 377-384.

Ohno, S. (1972) So much "junk" DNA in our genome. Evolution of genetic systems. Brookhaven Symposium in Biology, **23**, 366-370. 72.

Ohta, T. (1992) The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **23**, 263-286.

Ohta, T. (1995) Synonymous and nonsynonymous substitutions in mammalian genes and the nearly neutral theory. *Journal of Molecular Evolution*, **40**, 56-63.

Ohta, T. & Dover, G.A. (1984) The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics*, **108**, 501-521.

Okumura, K., Kiyama, R. & Oishi, M. (1987) Sequence analyses of extrachromosomal Sau3A and related family DNA: analysis of recombination in the excision event. *Nucleic Acids Res*, **15**, 7477-7489.

Orgel, L.E. & Crick, F.H.C. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, **284**, 604-606.

Ortells, M.O., Contreras, J.R. & Reig, O.A. (1990) New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia: Octodontidae) from north-eastern Argentina and from

- Paraguay confirm the extreme multiformity of the genus. *Genetica*, **82**, 189-201.
- Ortells, M.O. (1995) Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **54**, 43-70.
- Ortells, M.O. & Barrantes, G. (1994) A study of genetic distances and variability in several species of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) with special reference to a probable causal role of chromosomes in speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, **53**, 189-208.
- Osgood, W.H. (1946) A new octodont rodent from the Paraguayan Chaco. *Fieldiana: Zoology*, **31**, 47-49.
- Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Page, R.D.M. & Charleston, M.A. (1998) Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 356-359.
- Page, R.D.M. & Holmes, E.C. (1998) *Molecular evolution. A phylogenetic approach*, Balckwell Science, Oxford.
- Patterson, C. (1988) Homology in classical and molecular biology. *Molecular Biology and Evolution*, **5**, 603-625.
- Patton, J.L. & Yang, S.Y. (1977) Genetic variation in *Thomomys bottae* pocket gophers: Macrogeographic patterns. *Evolution*, **31**, 697-720.
- Patton, J.L. & Sherwood, S.W. (1982) Genome Evolution in Pocket Gophers
-

- (Genus *Thomomys*). I. Heterochromatin Variation and Speciation Potential. *Chromosoma*, **85**, 149-162.
- Pelisson, A., Song, S.U., Prud'homme, N., Smith, P.A., Bucheton, A. & Corces, V.G. (1994) Gypsy transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila* flamenco gene. *EMBO J*, **13**, 4401-11.
- Pesce, C.G., Rossi, M.S., Muro, A.F., Reig, O.A., Zorzópulos, J. & Kornblihtt, A.R. (1994) Binding of nuclear factors to a satellite DNA of retroviral origin with marked differences in copy number among species of the rodent *Ctenomys*. *Nucleic Acids Research*, **22**, 656-661.
- Petes, T.D. & Hill, C.W. (1988) Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet*, **22**, 147-168.
- Petes, T.D., Malone, R.E. & Symington, L.S. (1991) Recombination in yeast. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Genome dynamics, protein synthesis and energetics. Vol. 1* (ed. by J. Broach and E.P.J. Jones), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Picariello, O., Feliciello, I., Bellinello, R. & Chinali, G. (2002) S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*, **45**, 63-70.
- Plohl, M., Mestrovic, N., Bruvo, B. & Ugarkovic, D. (1998) Similarity of structural features and evolution of satellite DNAs from *Palorus subdepressus* (Coleoptera) and related species. *Journal of Molecular Evolution*, **46**, 234-239.
- Pons, J., Bruvo, B., Juan, C., Petitpierre, E., Plohl, M. & Ugarkovic, D. (1997) Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene*, **205**, 183-190.
-

- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Quintana, C.A. (1994) Sistemática y anatomía funcional del roedor Ctenomyinae *Praectenomys* (Caviomorpha: Octodontidae) del Plioceno de Bolivia. *Revista Técnica de YPF B*, **15**, 175-185.
- Rees, H., Jenkins, G., Seal, A.G. & Hutchinson, J. (1982) Assays of the phenotypic effects of changes in DNA amount. *Genome evolution* (ed. by D.A. Dover and R.B. Flavell), pp.287-297. Academic Press, San Diego.
- Reig, O.A. (1989) Karyotypic repatterning as a triggering factor in cases of explosive speciation. Pp. 246-289. *Evolutionary biology of unstable populations*. (ed. by Fontdevila A.), Springer Verlag, Berlin.
- Reig, O.A., Busch, C., Ortells, M.O. & Contreras, J.R. (1990) An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pp. 97-128. *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. (ed. by E. Nevo and O.A. Reig), Wiley-Liss, New York.
- Reig, O.A. & Kiblicky, P. (1969) Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma*, **28**, 211-244.
- Reig, O.A., Massarini, A.L., Ortells, M.O., Barros, M.A., Tiranti, S.I. & Dyzenchouz, F.J. (1992) New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia*, **56**, 603-623.
- Rodríguez, F., Oliver, J.L., Marín, A. & Medina, J.R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.*, **142**, 485-501
- Roig, V.G. & Reig, O.A. (1969) Precipitin test relationships among Argentinian
-

- species of the genus *Ctenomys*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **30**, 665-672.
- Rossi, M. S. (1990) Organización, replicación y evolución de un ADN satélite del género *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Rossi, M.S., Pesce, C.G., Kornblihtt, A.R. & Zorzó pulos, J. (1995a) Origin and evolution of a major satellite DNA from South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Revista Chilena de Historia Natural*, **68**, 171-183.
- Rossi, M.S., Pesce, C.G., Reig, O.A., Kornblihtt, A.R. & Zorzó pulos, J. (1993a) Retroviral-like features in the monomer of the major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *DNA Sequence*, **3**, 379-381.
- Rossi, M.S., Redi, C.A., Viale, G., Massarini, A.L. & Capanna, E. (1995b) Chromosomal distribution of the major satellite DNA of South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **69**, 179-184.
- Rossi, M.S., Reig, O.A. & Zorzó pulos, J. (1990) Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Molecular Biology and Evolution*, **7**, 340-350.
- Rossi, M.S., Reig, O.A. & Zorzó pulos, J. (1993b) A major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Z. Säugetierkunde*, **58**, 244-251.
- Rozas, J. & Rozas, R. (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**, 174-175.
- Ruedas, L.A., Cook, J.A. & Yates, T.L. (1993) Conservative genome size evolution in chromosomally variable family of rodents (Rodentia):

Ctenomyidae). *Evolution*, **36**, 449-458.

- Rusconi, C. (1928) Dispersión geográfica de los tuco-tucos vivientes (*Ctenomys*) en la región Neotropical. *An. Soc. Argentina Est. Geogr. "Gaea"*, **3**, 233-250.
- Russo, C.A., Takezaki, N. & Nei, M. (1995) Molecular phylogeny and divergence times in Drosophilid species. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 391-404.
- Sage, R.D., Contreras, J.R., Roig, V.G. & Patton, J.L. (1986) Genetic variation in South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Z. Zaugetierkunde*, **51**, 158-172.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Samuelson, L.C., Wiebauer, K., Gumucio, D.L. & Meisler, M.H. (1988) Expression of the human amylase genes: recent origin of a salivary amylase promoter from an actin pseudogene. *Nucleic Acids Research*, **16**, 8261-76.
- Sanderson, M.J. (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 1218-1231.
- Schluter, D. (1995) Uncertainty in ancient phylogenies. *Nature*, **377**, 108-109.
- Schluter, D. (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 372-380.
- Schluter, D., Price, T., Mooers, A. & Ludwig, D. (1997) Likelihood of Ancestor States in Adaptive Radiation. *Evolution*, **51**, 1699-1711.

- Schmid C.W. & Jelinek W.R. (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science*, **216**, 1065-1070.
- Schneider, H., Schneider, M.P.C. & Sampaio, M.I.C. (1993) Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2**, 225-242.
- Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K. & Willard, H.F. (2001) Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*, **294**, 109-115.
- Schwartz, A., Chan, D.C., Brown, L.G., Alagappan, R., Pettay, D., Disteche, C, McGillivray, B., de la Chapelle, A. & Page, D.C. (1998) Reconstructing hominid Y evolution: X-homologous block, created by X-Y transposition, was disrupted by Yp inversion through LINE-LINE recombination. *Hum Mol Genet*, **7**, 1-11.
- Sharp, P.M. & Li, W.S. (1987) The rate of synonymous substitution in enterobacterial genes is inversely related to codon usage bias. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 222-230.
- Sites, J.W. & Moritz, C. (1987) Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology*, **36**, 153-174.
- Slowinski, J.B. (2001) Molecular polytomies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 114-120.
- Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, **191**, 528-535.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman, San Francisco.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments

- separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Springer, M.S. & Kirsch, J.A.W. (1991) DNA hybridization, the compression effect and the radiation of diprotodontian marsupials. *Systematic Zoology*, **40**, 131-151.
- Steinberg, E.K. & Patton, J.L. (2000) Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. *Life underground. The biology of subterranean rodents* (ed. by E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron), pp. 301-331. The University of Chicago Press, Chicago.
- Stephan, W. (1986) Recombination and the evolution of satellite DNA. *Genet Res*, **47**, 167-174.
- Stephan, W. (1987) Quantitative variation and chromosomal location of satellite DNAs. *Genet Res*, **50**, 41-52.
- Stephan, W. (1989) Tandem-repetitive noncoding DNA: forms and forces. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 198-212.
- Stephan, W. & Cho, S. (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, **136**, 333-341.
- Strachan, T., Webb, D. & Dover, G.A. (1985) Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J*, **4**, 1701-1708.
- Stravenshagen, J.B. & Robins, D.M. (1988) An ancient provirus has imposed androgen regulation on the adjacent mouse sex-limited protein gene. *Cell*, **55**, 247-254.
- Sverdlov, E.D. (2000) Retroviruses and primate evolution. *BioEssays*, **22**, 161-171.

- Svoboda, J. (1998) Molecular biology of cell nonpermissiveness to retroviruses. Has the time come? *Gene*, **206**, 153-163.
- Swofford, D. L. (1998) PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sinauer, Sunderland, Mass.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. & Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, **33**, 23-35.
- Tajima, F. & Nei, M. (1984) Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **1**, 269-285.
- Takezaki, N., Rzhetsky, A. & Nei, M. (1995) Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 823-833.
- Tares, S., Cornuet, J.M. & Abad, P. (1993) Characterization of an unusually conserved AluI highly reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera*. *Genetics*, **134**, 1195-1204.
- Tate, G.H.H. (1935) The taxonomy of the genera of Neotropical hystricoid rodents. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist*, **68**, 295-447.
- Templeton, A.R. (1980) The theory of speciation via the founder principle. *Genetics*, **94**, 1011-1038.
- Thomas, C.A. (1971) The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet*, **5**, 237-256.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876-4882.

- Thorne, J.L., Kishino H. & Painter, I.S. (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1647-1657.
- Ting, C.N., Rosenberg, M.P., Snow, C.M., Samuelson, L.C. & Meisler, M.H. (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes and Development*, **6**, 1457-65.
- Tobler, H. (1986) The differentiation of germ and somatic cell lines in nematodes. *Results Probl Cell Differ*, **13**, 1-69.
- Turelli, M., Barton, N.H. & Coyne, J.A. (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 330-343.
- Ullu, E. & Tschudi, C. (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, **312**, 171-172.
- Van Arsdell, S.W., Denison, R.A., Bernstein, L.B., Weiner, A.M., Manser, T. & Gesteland, R.F. (1981) Direct repeats flank three small nuclear RNA pseudogenes in the human genome. *Cell*, **26**, 11-17.
- Varagona, M.J., Purugganan, M. & Wessler, S.R. (1992) Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize waxy gene. *Plant Cell*, **4**, 811-20.
- Verzi, D. H. (1994) Origen y evolución de los Ctenomyinae (Rodentia, Octodontidae): un análisis de anatomía cráneo-dentaria. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Verzi, D.H. (1999) The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae, Ctenomyidae). *Acta Theriologica*, **44**, 263-282.

- Verzi, D.H. (2001) Phylogenetic position of *Abalosia* and the evolution of the extant Octodontinae (Rodentia, Caviomorpha, Octodontidae). *Acta Theriologica*, **46**, 243-268.
- Verzi, D.H. & Lezcano, M. (1996) Status sistemático y antigüedad de '*Megactenomys*' *kraglievichi* Rusconi, 1930 (Rodentia, Octodontidae). *Revista Museo La Plata*, **9**, 239-246.
- Vitullo, A.D. & Cook, J.A. (1991) The role of sperm morphology in the evolution of tuco-tucos, *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): Confirmation of results from Bolivian species. *Z. Zaugetierkunde*, **56**, 359-364.
- Vitullo, A.D., Roldán, E.R. & Merani, M.S. (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. Lond.*, **215**, 675-683.
- Vucetich, M.G. & Verzi, D.H. (1995) Los roedores caviomorfos. *Evolución biológica y climática de la región pampeana durante los últimos cinco millones de años. Un ensayo de correlación con el mediterráneo occidental* (ed. by M.T. Alberdi, G. Leone and E.P. Tonni), Madrid.
- Walsh, J.B. (1987) Persistence of tandem arrays: implications for satellite DNA and simple-sequence DNAs. *Genetics*, **115**, 553-567.
- Wang, W. & Lan, H. (2000) Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, **17**, 1326-1333.
- White, M.J.D. (1968) Modes of speciation. *Science*, **159**, 1065-1070.
- White, M.J.D. (1978) *Modes of speciation*, W.H. Freeman, San Francisco.
- Wichman, H.A., Payne, C.T., Ryder, O.A., Hamilton, M.J., Maltbie, M. & Baker,

- R.J. (1991) Genomic Distribution of Heterochromatic Sequences in Equids: Implications to Rapid Chromosomal Evolution. *Journal of Heredity*, **82**, 369-377.
- Williams, P.L. & Fitch, W. (1989) Finding the minimal change in a given tree. *The hierarchy of Life* (ed. by B. Fernholm, K. Bremer and H. Jornvall), pp.453-470. Elsevier, Amsterdam.
- Wood, A.E. (1955) A revised classification of the rodents. *Journal of Mammalogy*, **36**, 165-187.
- Woods, C.A. (1984) Hystricognath rodents. *Orders and families of recent mammals of the world* (ed. by S. Anderson and J. Knox Jones Jr), pp.389-446. John Wiley and Sons, New York.
- Xiong, Y. & Eickbush, T.H. (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J*, **9**, 3353-3362.
- Yang, F., O'Brien, P.C., Wienberg, J. & Ferguson-Smith, M.A. (1997) A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Research*, **5**, 109-117.
- Yang, Z. (1996) Among-site variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 367-371.
- Yang, Z., Kumar, S. & Nei, M. (1995) A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics*, **141**, 1641-50.
- Zakian, V.A. (1989) Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet*, **23**, 579-604.
- Zenuto, R. & Busch, C. (1998) Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *Z.*

Zaugetierkunde, **60**, 277-285.

Zenuto, R.R., Lacey, E.A. & Busch, C. (1999) DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Molecular Ecology*, **8**, 1529-1532.

Zhao, Y., Jacobs, C.P., Wang, L. & Hardies, S.C. (1999) MuERV1: a new family of murine retrovirus-related repetitive sequences and its relationship to previously known families. *Mamm Genome*, **10**, 477-81.

Zimmer, E.A., Martin, S.L., Beverley, S.M., Kan, Y.W. & Wilson, A.C. (1980) Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 2158-2162.

Zuckerlandl, E. (1976) Gene control in eukaryotes and the c-value paradox "excess" DNA as an impediment to transcription of coding sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **9**, 73-104.

Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins* (ed. by V. Bryson and Vogel H.J.), p.97. Academic Press, New York.

6. APÉNDICE

6.1 Nuevas secuencias nucleotídicas del gen citocromo b

I702_argenATGACCAATACACCAAAATCCCACCCCTCATTAAAATTATGAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCTCCCTCTAAT
 ATTTACAGCATGATGAAATTTTGGTTCTTTATTAGGACTATGCTTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCTTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCAATTTTCTTTATTACATATCGGACGGGAATTTACTACGGGCTTACTATACAATCAAAGATGTATTAGGGA
 ATTGGGGTCTTACTATTATTTGAGTTATAGTACCAGCTTCCATAGGTTACGTATTACCATGAGGACAAATATCTTTTTGAGGAGCAA
 CAGTAATTACAAACCTCCTTTCAGCTATCCCTTATATTGGACCTACTCTAGTAGAGTGAATTTGAGGAGGTTTCTCAGTTGACAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTCCATTTCCATTTTATTTACAGCAATAGTAATAATTCACCTACTATTCTTACACGAA
 ACAGGATCAAATAATCCATCTGGCGTAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTCCACCTTACTATACAATCAAAGATGTATTAGGGA
 TTTTATTATAAATAATTACATTAATAAGTCTAGTAATAATTTACGCCAGATCTTCTAGGAGATCCAGACAACTATACCCCTGCCAACCC
 ATTAACACACCTCCCATATTAAACCAGAATGATACCTCTCTCGCATACGCAATTTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTTGGCGGA
 GTATTAGCTTTAGTCTTCCATCCTAATCCTAACACTATTCCTTATTCTACATTCATAAACAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATGAAATATTAGTGGCCAACCTATTAAATTTACTACGAAATTTGGCGGCAACCGATCGAACATCCCTTTATCAC
 CATTGGTCAACTAGCATCTGTAACCTATTTCTTTACTATCTTAATTTCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGATAA

I229_port

ATGACCAATACACCACAATCTCATCCCTCATCAAATTTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAATATCTCAGCAT
 GATCAAACCTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAACTCTTAACTGGGTTGTTCTTAGCAATGCACCTACACCGCTGACAC
 CACTACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTACATACATGCCAACGGAGCATCA
 ATATTCTTCAATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCTTACACATTTATAGACATGAAAATTTGGAGTCT
 TACTATTATTGACGTTATAGTACCAGCTTCCATAGGCTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACT
 AAACCTTCTCTCAGCTATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGCCACATTAACC
 CGATTCTTTGCCCTTCCATTTCACTTCTCCATTTATTTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACACGAAAACAGGATCAA
 ACAACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTCCACCTTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGAACTCTTATTAT
 AATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACCCAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCCCTTAAATACA
 CCTCCCATATCAAACAGAATGATACTTCTCTCGCATAGCTATTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGAGTATTAGCCT
 TAGTCTTCTCTATCCTAATCCTAATATTATTTCCCATTTCTACACTCATCTAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTTTAAGTCAATG
 TCTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTTCTTACATGAATCGGGGACAACCGATCGAACATCCCTTCTCACCATTGGCCAG
 TTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTATTATTTAATTTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAAATGAAGA

I_539port

ATGACCAATACAGAAAATCTCATCCCTCATCAAATTTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAATATCTCAGCAT
 GATGGAACCTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCTTAGCAATGCACCTACACCGCTGACAC
 CACTACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTACATACATGCCAACGGAGCATCA
 ATATTCTTCAATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCTTACACATTTATAGACATGAAAATTTGGAGTCT
 TACTATTATTGACGTTATAGTACCAGCTTCCATAGGCTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACTACGTAACACT
 AAACCTTCTCTCAGCTATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGCCACATTAACC
 CGATTCTTTGCCCTTCCATTTCACTTCTCCATTTATTTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACACGAAAACAGGATCAA
 ACAACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTCCACCTTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGAACTCTTATTAT
 AATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACCCAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCCCTTAAATACA
 CCTCCCATATCAAACAGAATGATACTTCTCTCGCATAGCTATTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGAGTATTAGCCT
 TAGTCTTCTCTATCCTAATCCTAATATTATTTCCCATTTCTACACTCATCTAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTTTAAGTCAATG
 CCTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTTCTTACATGAATCGGGGACAACCGATCGAACATCCCTTCTCACCATTGGCCAA
 CTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTATTATTTAATTTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAATATAAACTACTCAAATGAAGA

I679_tuconATGACCAATATACGAAAATCTCATCCTCTTATTAAAATTTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCAACCCCTTCTAAT
 ATTTACAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTATTAGGAGTATGTTTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCTTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCAATTTTCTTTACTTCCACATCGGACGAGGAATTTATTATGGATCCTATACATTCATAGACACATGAAAC
 ATCGGAATCTTACTATTATTGACGTCATAGTACCAGCTTCCATAGGTTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTTGAGGCGCAA
 CAGTAATTACAAACCTTCTTTCAGCTATCCCTTATATTGGACTCACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCCCTTCCATTTCACTTCTCCATTTTACTTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACACGAA
 ACAGGATCAAACAATCCATCGGGCATAAAATTCAGATTACAGACAAAATTCATTTCCACCCCTACTATACAATTAAGGATATCTTAGGAG
 TCTTATTATAAATAATCGCATTAAAGTCTAGTAATATTTTCCACAGACCTTTTAGGGGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAATACACCTCCCATATTAACCAGAATGATAATTTCTCTCGCATAGCATTCTACGCTCAATCCCAACAACTCGGCGGAGTATTAGCCT
 GTATTAGCCTTAGCCTTCCATCCTAATCCTAATATTATTTCCCATTTCTACACTTATCCAAACAACGCAGCATATCATTCCGGCCCC
 TAAGCCAGTGTTTAATATGAATACTAGTGGCCAATCTAATAATCCTTACATGAATTTGAGGACAACCGATGAAACCCCTTCTCAT
 CATTGGTCAACTAGCATCCGTAACCTACTTCTTTACTATTTAATTTCTAATGCCTTCAACGGCCTTAATAGAAAACAACTACTCAA
 TGAAGA

I867_tuconATGACCAATATACGAAAATCTCATCCTCTTATTAAAATTTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTTCTAAT
 ATTTACAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTATTAGGAGTATGTTTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCTTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCAATTTTCTTTACTTCCACATCGGACGAGGAATTTATTATGGATCCTATACATTCATAGACACATGAAAC
 ATCGGAATCTTACTATTATTGACGTCATAGTACCAGCTTCCATAGGTTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTTGAGGCGCAA
 CAGTAATTACAAACCTTCTTTCAGCTATCCCTTATATTGGACTCACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCCCTTCCATTTCACTTCTCCATTTTACTTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACACGAA
 ACAGGATCAAACAATCCATCGGGCATAAAATTCAGATTACAGACAAAATTCATTTCCACCCCTACTATACAATTAAGGATATCTTAGGAG
 TCTTATTATAAATAATCGCATTAAAGTCTAGTAATATTTTCCACAGACCTTTTAGGGGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAATACACCTCCCATATTAACCAGAATGATAATTTCTCTCGCATAGCATTCTACGCTCAATCCCAACAACTCGGCGGA
 GTATTAGCCTTAGCCTTCTCCATCCTAATCCTAATATTATTTCCCATTTCTACACTTATCCAAACAACGCAGCATATCATTCCGGCCCC

TAAGCCAGTGTTAATATGAATACTAGTGGCCAACTAATAATCCTTACATGAATTGGAGGACAACCAGTTGAATACCCCTTCATCAT
 CATTGGTCAACTAGCATCCGTAACCTACTTCTTTACTATTTTAATCTAATGCCTTCAACGGCCTTAATAGAAAACAACTACTCAA
 TGAAGA

AS872_fulvATGACCAATACAGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTATAAACCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTACTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAATCTTAACCGGGTTATTCCCTAGCAATGCCTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTGCGTAGCTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTATACATTGACGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGAGTAATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTAACCTATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGGGCAA
 CAGTAATCAGGAACCTTCTTTCAGCCATCCCTACATGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACAGGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTTACCCTTACCATACAATTAAGGATATCCTAGGAG
 TCTTACTCATAATAATTATATAAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAATGATACTTCTCTTTGATACGCAATTTACTAGCTCAAATCCCTAATAAACTCGGCGGT
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATACTATTCCCTATTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATTGGAGGGCAACCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCTTCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

2342_fulvATGACCAATACAGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTATAAACCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTACTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAATCTTAACCGGGTTATTCCCTAGCAATGCCTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTGCGTAGCTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTATACATTGACGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGAGTAATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTAACCTATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGGGCAA
 CAGTAATCAGGAACCTTCTTTCAGCCATCCCTACATGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTTACAGGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTTACCCTTACCATACAATTAAGGATATCCTAGGAG
 TCTTACTCATAATAATTATATAAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAATGATACTTCTCTTTGATACGCAATTTACTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGT
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATACTATTCCCTATTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATTGGAGGGCAACCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCTTCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

MHG1042_fuATGACCAATACAGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTGTA AACCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTACTAGGAGTATGCCTAGGTTACAAATCTTAACCGGGTTATTCCCTAGCAATGCCTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTGCGTAGCTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTATACATTGACGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGAGTAATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTAACCTATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGGGCAA
 CAGTAATCAGGAACCTTCTTTCAGCCATCCCTACATGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTTCTATTCTTACAGGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTTACCCTTACCATACAATTAAGGATATCCTAGGAG
 TCTTACTCATAATAATTATATAAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAATGATACTTCTCTTTGATACGCAATTTACTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGT
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATACTATTCCCTATTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATTGGAGGGCAACCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCTTCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

DR2323_fulATGACCAATACAGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTATAAACCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTACTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAATCTTAACCGGGTTATTCCCTAGCAATGCCTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTGCGTAGCTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTATACATTGACGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGAGTAATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTAACCTATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGGGCAA
 CAGTAATCAGGAACCTTCTTTCAGCCATCCCTACATGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTTCTATTCTTACAGGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTTACCCTTACCATACAATTAAGGATATCCTAGGAG
 TCTTACTCATAATAATTATATAAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAATGATACTTCTCTTTGATACGCAATTTACTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGT
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATACTATTCCCTATTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATTGGAGGGCAACCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCTTCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

I695_talarATGACCAATACAGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTGTA AACCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAAT
 ATCTCAACATGATGAAACTTCGGTCTTTATTGGGAGTATGTCTAGGATTACAAATTTTAAACCGGGTTATTCCCTAGCAATGCCTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGCCGTGACGTAACCTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATGACGACACATGAAAT
 ATTGGAGTCTTACTATTATTGAGTAATAGCTACCGCTTCATAGGTTACGTAACCTATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGAGCAA
 CAGTAATTAACAACCTTCTCTGCGCATCCCTTATATTGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTTGACAAAGC
 TACATTAACCCGATTTTTCGCTTTTCTTTCATTTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTGAATAATCCACCTACTATTCTTACAGGAA
 ACAGGATCAAATAAATCCATCTGGCATAAACTCAGACTCAGACAAAATTCATTTTACCCTTACCATACAATTAAGGATATCCTAGGAA
 TTTTATTCTATAATAATTACATTAATAAACCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAACTACACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAATGATACTTCTCTTTGATACGCAATTTACTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGT
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCTATCCTAATCCTAATAATTATTCCCTATTCTACACTCATCCAACAACGCAGTATATCATTCCGACCTT

TAAGTCAGTGCCTAATGAACACTAGTAGCCAACCTATTAATTCCTTACATGAATTGGGGACAACCAGTCGAACACCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACCTAGCATCCATAACCTATTTCTTACTATTTTAATTCCTTATACTTTCAACAGCCTTAATAGAAATATAAACTACTCAA
 TGAAGA

68_magellaATGACCAACACAGAAAATCCACCCTCTCATTAAAAATTATAAACTACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCCAAT
 ATTTAGCATGATGGAACCTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAAATTTAACTGGCTTATTCCCTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGACACCCTACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGCCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTTCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGGTCTATACATTATAGACACATGAAAT
 ATGGAGCTTACTATTATTGTCAGTCATAGCCACCGCTTCATAGTTACGTACTGCCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGACAA
 CAGTAATTACAAACCTTCTCAGCCATCCCTTACATGGACCTACCTTAGTAGAATGAATCTGAGGAGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTCGCTTCCATTTTCTTCCATTCTTCCATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTACACGAA
 ACAGGATCAAAACACCCATCTGGCATAAACTCAGACTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACCACACAATCAAGGATATCCTAGGAG
 TTATATTTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCACCCCATCTCAGACTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACCACACAATCAAGGATATCCTAGGAG
 GTATTAGCCCTAGTACTCTCCATCCTAATCCTGATACTATTCCCTATTCTACACTCATCCAAACAACGCAGTATATCATTCCGACCCT
 TAAGCCAGTCTTAATATGAATACTAGTGGCAATCTACTAATTCCTTACATGAATCGGAGGTCACCCAGTCGAACACCCCTTCATCAC
 CATTGGCAACTAGCATCCGTAACCTACTTCTTACTATTTCTAATTCCTTATACTTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

1987_tucumATGACCAATACAGAAAATCCCATCCTCTCATTAAAAATTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAAT
 ATTTGGCATGATGGAATTTGGCTCCTTATTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGATACCACCCGCTTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGTCGTAACCTACGGCTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTATGGGTCTATACATTATAGACACATGAAAT
 ATTGGAATCTTACTATTATTGTCAGTCATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATTACAAATCTTCTCTCAGCCATCCCTTACATGGACCCACCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTCCACTTCACTTCCATTTATCATCAGCAATAGTAATAATCCACCTATTATTCTCATATGAA
 ACAGGATCAAAACAACCCATCTGGCATAAAATCAGACTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGGG
 TTTTATTCAATAAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACCCCTGCCAACCC
 ATTAATAACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCAATTTCTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGA
 GTATTAGCTTTAGTTTTCTCTATCCTAATCCTAATATTATCCCTATTCTACATTCTCAAACAACGCAGTATATCATTTCGACCTT
 TAAGTCAGTCTTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCCTACATGAATGGTGGTCAACCAGTAGAACACCCCTTTATCAC
 CATTGGCCAACCTAGCATCTGTAATCTATTTCTTACTATTTTAATTCCTACACTTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

1989_tucumATGACCAAAACAGAAAATCCCATCCTCTCATTAAAAATTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAAT
 ATTTGGCATGATGGAATTTGGTCTCCTTATTAGGACTATGCCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGATACCACCCGCTTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGTCGTAACCTACGGCTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTATGGGTCTATACATTATAGACACATGAAAT
 ATTTGGAATCTTACTATTATTGTCAGTCATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATTACAAATCTTCTCTCAGCCATCCCTTACATGGACCCACCCCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTCCACTTCACTTCCATTTATCATCAGCAATAGTAATAATCCACCTATTATTCTCATATGAA
 ACAGGATCAAAACAACCCATCTGGCATAAAATCAGACTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGGG
 TTTTATTCAATAAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACCCCTGCCAACCC
 ATTAATAACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCAATTTCTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGA
 GTATTAGCTTTAGTTTTCTCTATCCTAATCCTAATATTATCCCTATTCTACATTCTCAAACAACGCAGTATATCATTTCGACCTT
 TAAGTCAGTCTTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCCTACATGAATGGTGGTCAACCAGTAGAACACCCCTTTATCAC
 CATTGGCCAACCTAGCATCTGTAATCTATTTCTTACTATTTTAATTCCTACACTTTCAACAGCCTTAATAGAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

1990_tuconATGACCAATATACGAAAATCTCATCCTCTTATTAATAATTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTGAGCATGATGAAACTTCGGCTCTCTATTAGGAGTATGTTTAGGACTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGATACCACCCGCTTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGTCGTAACCTACGGCTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTACTTCCACATCGGACGAGGAATTTATTATGGATCCTATACATTATAGACACATGAAAC
 ATCCGAATCTTACTATTATTGTCAGTCATAGCTACCGCTTCATAGGTTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATTACAAACCTTCTTTCAGCTATCCCTTATATTGGACTCACCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTCCACTTCACTTCCCATTTATCATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTCTACACGAA
 ACAGGATCAAAACAATCCATCCGGCATAAAATCAGATTACAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACAATTAAGGATATCTTAGGAG
 TCTTATTCAATAAATCGCATTAAATAAGTCTAGTAATATTTTCCAGACCTTTTAGGGGACCCAGACAACTACCCCTGCCAACCC
 CTTAAATACACCTCCCATATTAACCAGAAATGATATTTCTCTTCCGATACGCAATTTCTAGCTCAATCCCAACAACCTCGGCGGA
 GTATTAGCCTTAGCCTTCCATCCTAATCCTAATATTATTTCCCATTTCTACACTTATCCAAACAACGCAGCATATCATTCCGCCCC
 TAAGCCAGTGTAAATATGAATACTAGTGGCAATCTAATAATCCTTACATGAATGGAGGACAACCAGTTGAATACCCCTTCATCAT
 CATTGGTCAACTAGCATCCGTAACCTACTTCTTACTATTTTAATTCCTAATGCCTTCAACAGCCTTAATAGAAAACAACCTACTCAA
 TGAAGA

38_tucumanATGACCAATACAGAAAATCCCATCCTCTCATTAAAAATTGTAATCACTCTTTCATTGATTTACCTGCCCCCTCTAAT
 ATTTGGCATGATGGAATTTGGCTCCTTATTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACCTACA
 CCGCTGATACCACCCGCTTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGTCGTAACCTACGGCTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTATGGGTCTATACATTATAGACACATGAAAT
 ATTGGAATCTTACTATTATTGTCAGTCATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATTACAAATCTTCTCTCAGCCATCCCTTACATGGACCCACCCCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTCCACTTCACTTCCATTTATCATCAGCAATAGTAATAATCCACCTATTATTCTCATATGAA
 ACAGGATCAAAACAACCCATCTGGCATAAAATCAGACTCAGACAAAATCCCATTCACCCCTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGGG
 TTTTATTCAATAAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACCCCTGCCAACCC
 ATTAATAACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCAATTTCTAGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGA
 GTATTAGCTTTAGTTTTCTCTATCCTAATCCTAATATTATCCCTATTCTACATTCTCAAACAACGCAGTATATCATTTCGACCTT

TAAGTCAGTGCTTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTCACATGAATTGGTGGTCAACCGTAGAACACCCCTTTATCAC
CATTGGCCAACCTAGCATCTGTAATCTATTTCTTTACTATTTTAATTCTCATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGAAGA

MSR2_mendoATGACCAATACAGAAAATCTCACCTCTCATTAAAATTGTAATCACTCTTTTATTGATTACCTGCCCCCTCTAAT
ATCTCAACATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACTACA
CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTCACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTATAGACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTATTTGCAGTTATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTCTGAGGAGCAA
CAGTAATTACAAACCTCTCTCAGCCATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
CACATTAACCGATTCTTTGCCTTCCATTTTATTCTTCCATTTATTATCACAGCAATAGTAATAATCCACTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAAACACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGATAAAATTCATTTTACCCCTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGAA
TCTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCTATTCTACGCTCAATCCCAATAAACTCGGCGGA
GTATTAGCCTTAGTCTTCTATCTTAATCCTAATATTATTTCCCTATTCTACACTCATCAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTT
TAAGTCAGTGCTTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATCGGAGGACAAACAGTCGAACATCCCTTATCAC
CATTGGCCAATTAGCATCCGTAACCTATTTTCTTACTATTTTAATTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGAAGA

MSR33_mendATGACCAATACAGAAAATCCACCTCTCATTAAAATTGTAATCACTCTTTTATTGATTACCTGCCCCCTCTAAT
ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTACTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACTACA
CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTCACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTATAGACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTATTTGCAGTTATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTCTGAGGAGCAA
CAGTAATTACAAACCTCTCTCAGCCATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
CACGTTAACCGATTCTTTGCCTTCCATTTTATTCTTCCATTTATTATCACAGCAATAGTAATAATCCACTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAAACACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGATAAAATTCATTTTACCCCTACTATAACAATCAAAGATATCTTAGGAA
TCTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACAGATCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCTATTCTACGCTCAATCCCAATAAACTCGGCGGA
GTATTAGCCTTAGTCTTCTATCTTAATCCTAATATTATTTCCCTATTCTACACTCATCAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTT
TAAGTCAGTGCTTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATCGGAGGACAAACAGTCGAACATCCCTTATCAC
CATTGGCCAATTAGCATCCGTAACCTATTTTCTTACTATTTTAATTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGAAGA

1036_austrATGACCAATACAGAAAATCTCATCCCTCATCAAATTTGTAATCACTCTTTTATTGATTACCTGCCCCCTCTAAT
ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACTACA
CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTACACATTATAGACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTATTTGCAGTTATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTCTGAGGAGCAA
CAGTAATTACAAACCTCTCTCAGCCATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
CACATTAACCGATTCTTTGCCTTCCATTTTATTCTTCCATTTATTATCACAGCAATAGTAATAATCCACTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAAACACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGATAAAATTCATTTTACCCCTACTATAACAATCAAAGATATCTTAGGAA
TCTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
CTTAAATACACCTCCCATATCAAACCCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCTATTCTACGCTCAATCCCAATAAACTCGGTGGA
GTATTAGCCTTAGTCTTATCTATCCTAATCCTAATATTATTTCCCTATTCTACACTCATCAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTT
TAAGTCAATGCCTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATCGGGGGACAAACAGTCGAACATCCCTTATCAC
CATTGGCCAATTAGCATCCGTAACCTATTTCTTATTATTTTAATTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGAAGA

2_australiATGACCAATACAGAAAATCTCATCCCTCATCAAATTTGTAATCACTCTTTTATTGATTACCTGCCCCCTCTAAT
ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTCGCTATGCACTACA
CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTACACATTATAGACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTATTTGCAGTTATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTCTGAGGAGCAA
CAGTAATTACAAACCTCTCTCAGCCATCCCTTACATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
CACATTAACCGATTCTTTGCCTTCCATTTTATTCTTCCATTTATTATCACAGCGATAGTAATAATCCACTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAAACACCCGCTCTGGCATAAACTCAGACTCAGATAAAATTCATTTTACCCCTACTATAACAATCAAAGATATCTTAGGAA
TCTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
CTTAAATACACCTCCCATATCAAACCCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCTATTCTACGCTCAATCCCAATAAACTCGGTGGA
GTATTAGCCTTAGTCTTATCTATCCTAATCCTAATATTATTTCCCTATTCTACACTCATCAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTT
TAAGTCAATGCCTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATCGGGGGACAAACAGTCGAACATCCCTTATCAC
CATTGGCCAATTAGCATCCGTAACCTATTTCTTATTATTTTAATTCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGAAGA

44_talarumATGACCAATACAGAAAATCTCATCCCTCTTATAAAATTGTAATCACTCTTTTATTGATTACCTGCCCCCTCTAAT
ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAAATTTAACTGGGTGTTCCTAGCAATGCACTACA
CCGCTGATACCACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGCTGACGTAACACTACGGTTGACTAATCCGCTATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTATAGACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTATTTGCAGTTATAGCTACCGCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTCTGAGGAGCAA
CAGTAATTACGAACCTCTCTCTGCCATCCCTTATATTGGACCTACCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGATAAAGC
TACATTAACCGATTCTTTGCCTTCCATTTTATTCTTCCATTTATTATCACAGCGATAGTAATAATCCACTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAAATAATCCATCTGGCATAAACTCAGACTCAGATAAAATTCATTTTACCCCTACTATAACAATCAAAGATATCTTAGGAA
TTTTATTATAATAATTACATTAATAACCCTAGTAATATTTACACAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCTGCCAACCC
CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCCAGAAATGATACTTCTCTCGCATACGCTATTCTACGCTCAATCCCAATAAACTCGGTGGA
GTATTAGCCTTAGTCTTATCTATCCTAATCCTAATATTATTTCCCTATTCTACACTCATCAAACAACGCAGCATATCATTCCGACCTT

TAAGTCAGTGCCATAATGAACACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATTGGGGGCAACCCAGTCGAACACCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCATCCATAACCTATTTCTTACTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

2_talarum

ATGACCAATACACGAAAATCTCATCTCTTATTAAAATTGTAATCACTCTTTTATTGATTTACCTGCCCTCTAATATCTCAGCAT
 GATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAATTTAAACCGGGTTATTCTAGCAATGCACTACACCGCTGATAC
 CACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGCCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAACGGAGCATCA
 ATATTCTTCAATTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTCATAGACACATGAAATATTGGAGTCT
 TACTATTATTGAGTTATAGCTACCGCTTTCATAGGTTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGCAACAGTAATTAC
 GAACCTTCTCTGCCATCCCTTATATTGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTTGACAAAAGTACTAAACC
 CGATTCTTTGCCCTTTCATTTCACTTCTCCATTCAATATCACAGCAATAGTGATAATCCACCTACTATTTCTACACGAAACAGGATCAA
 ATAATCCATCTGGCATAAATCTCAGACTCAGACAAAATCCATTCCACCCCTACTATACAATCAAAGATATCTTAGGAATCTTATTCAT
 AATAATTACATTAATAACCCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCTGCCAACCCCTTAAATACA
 CTTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTTTCGCATACGCTATTTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGTGGAGTATTAGCCT
 TAGTCTTATCTATCTAATCCTAATATTTATTTCCCATTTCTACACTCATCTAAAACAGCGAGCATATCATTCCGACCTTTAAGTCAATG
 CCTAATATGAATACTAGTAGCCAACCTATTAATTCTTACATGAATCGGGGCAACCCAGTCGAACATCCCTTCATCACCATTGGCCAA
 TTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAAATGAAGA

I464_opimuATGACCAATACACGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTGTAACCCTCTTTTATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTGAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTACTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAATCTTAACCGGGTTATTCTAGCAATGCACTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCTTTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTACATTCATGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGTCAGTAATAGCTACTGCCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATCAAACTTCTCTCAGCCATCCCTACATTGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTCACTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTTCTACACGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAATCAGACTCAGACAAAATCCATTCCACCTTACCATACAATTAAGGATATCTTAGGAG
 TCATACTATAATAATTATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAAACTACACTCCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTTCTTGCATACGCAATTTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGG
 GTGTTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATATTTATTTCCCTATTTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGCATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATGGAGGGCAACCCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCATCCGTAACCTATTTCTTCACTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

DR2326_opiATGACCAATACACGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTGTAACCCTCTTTTATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATTTGAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTACTAGGAGTATGCCTAGGATTACAAATCTTAACCGGGTTATTCTAGCAATGCACTACA
 CCGCTGATACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCAATTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTACGGGTCTTACATTCATGACACATGAAAT
 ATCGGAGTCTTACTATTATTGTCAGTAATAGCTACTGCCTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATACGAATCTTCTCTCAGCCATCCCTACATTGGACCTACCCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACACTAACCCGATTCTTCGCATTCCATTTCACTTCTCCATTTATTATTACAGCAATAGTAATAATCCACCTACTATTTCTACACGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAATCAGACTCAGACAAAATCCATTCCACCTTACCATACAATTAAGGATATCTTAGGAG
 TCTTACTCAATAATATTAATAAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCGCAAACTACACCCTGCCAACCC
 CTTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATACTTCTTCTTGCATACGCAATTTCTACGCTCAATCCCTAATAAACTGGGCGGG
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATAATTTCCCTATTTCTACACTCATCCAAGCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATATGAACACTAGTGGCTAACCTATTAATCCTTACATGAATGGAGGGCAACCCAGTAGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGCCAACTAGCATCCATAACATATTTCTTTACTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

MHG1151_maATGACCAATACACGAAAATCTCATCTCTCATTAAAATTATAAATCACTCTTTTATTGATTTACCTACCCCTCTAAT
 ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAATTTAAACCGGGTTATTCTAGCAATGCACTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCTTTTCTTTATTTCCATATCGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTCATGACACATGAAAT
 ATTGGAGTCTTACTATTATTGTCAGTTATAGCTACCGCTTTCATAGGCTACGTATTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATACGAATCTTCTCTCAGCCATCCCTACATTGGTCCTACTCTAGTAGAATGAATTTGAGGAGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTTCATTTCACTTCTCCATTTATTATCACTGCAATAGTAATAATCCACCTATTTCTACACGAA
 ACAGGATCAAATAACCCATCTGGAATAAATCAGACTCAGACAAAATCCATTCCACCTTACTATACAATCAAGGATATCTTAGGAG
 TTTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCTGCCAACCC
 CCTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATAATTTCTTCTTGCATACGCAATCTTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGA
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATAATTTCCCATTTCTACACTCATCCAACCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATATGAGTGTAGTAGCTAACCTATTAATCTTACATGAATGGAGGGCAACCCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGTCAACTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

1019_mauliATGACCAATACACGAAAATCTCACCTCTCATTAAAATTATAAATCACTCTTTTATTGATTTACCTGCCCTTCTAAT
 ATCTCAGCATGATGAAACTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGTCTAGGATTACAAATTTAAACCGGGTTATTCTAGCAATGCACTACA
 CCGCTGACACCACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
 CGGAGCATCAATATTTCTTCTTTTCTTTATTTCCATATTGGACGAGGAATTTACTATGGATCCTATACATTCATGACACATGAAAT
 ATTGGAGTCTTACTATTATTGTCAGTTATAGCTACCGCTTTCATAGGCTACGTATTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGGCAA
 CAGTAATACGAATCTTCTCTCAGCCATCCCTACATTGGTCCTACTCTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
 CACATTAACCCGATTCTTTGCTTTCATTTCACTTCTCCATTTATTATCACTGCAATAGTAATAATCCACCTATTTCTACACGAA
 ACAGGATCAAACAACCCATCTGGAATAAATCAGACTCAGACAAAATCCATTCCACCTTACTATACAATCAAGGATATCTTAGGAG
 TTTTATTATAATAATTACATTAATAAGCCTAGTAATATTTACACCAGACCTTCTAGGAGACCCAGACAACTACACCCTGCCAACCC
 CCTAAACACACCTCCCATATCAAACCAGAAATGATAATTTCTTCTTGCATACGCAATCTTACGCTCAATCCCTAATAAACTCGGCGGA
 GTATTAGCCTTAGCTTTCTCCATCCTAATCCTAATAATTTCCCATTTCTACACTCATCCAACCAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
 TAAGTCAGTGCTTAATATGAGTGTAGTAGCTAACCTATTAATCTTACATGAATGGAGGGCAACCCAGTCGAACATCCCTTCATCAC
 CATTGGTCAACTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTAAATCTTATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
 TGAAGA

CATTGGCCAACCTAGCATCCGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATTCTCATACCTTCAACAGCCTTAATAGAAAACAACTACTCAA
TGAAGA

1998_latroATGACCAATACACGAAAATCTCACCCCTCATTAAAATTATGAATCACTCTTTATTGATTTACCTGCTCCCTCTAAT
ATTTGAGCATGATGAAATTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGCTTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCCCTAGCAATGCCTACAC
CCGCTGACACCCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAA
CGGAGCATCAATATTTCTTCTTTCTTTATTTACATATCGGACGGGAAATTTACTACGGGCTCTATACATTCAAAAACACATGAAAT
ATTGGAGTCTTACTATTACTTGCAGTTATAGCTACTGCCTTCATAGGTTACGTATTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGACAA
CAGTAATTACAAACCTCCTTTACAGTATCCCTTACATTGGACCTACTCTAGTAGAGTGAATTTGAGGAGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
CACATTAACCCGATTTCTTTGCTTTCCATTTTATTCTTCCATTTATAATCACAGCAATAGTAATAATTCACCTACTATTCTTACACGAA
ACAGGATCAAATAATCCATCTGGCGTAAACTCAGACTCAGACAAAATCCATTTACCCTTACTATACAATCAAAGATGTATTAGGGA
TTTTATTCAATAATTACACTAATAAGTCTAGTAATATTACGCCAGATCTTCTAGGAGATCCAGACAATATACCCTGCCAACCC
ATTAACACACCTCCCATATTAACCAGAATGATACTTCTCTTCGCATACGCAATCTACGCTCAATCCCTAATAAACTTGGAGGA
GTATTAGCTTTAGTCTTCCATTTAATCCTAACACTATTCCTTATTCTACACTCATCTAAACAACGCAGTATATCATTCCGACCTT
TAAGTCAGTGCTTAATATGAATATTAGTGCCAACTATTAATCTTACATGAATTTGGCGGCAACCAGTCGAACATCCCTTTATCAC
CATTGGTCAACTAGCATCTGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAA
TGATAA

46_latro

ATGACCAATACACGAAAATCTCACCCCTCATTAAAATTATGAATCACTCTTTATTGATTTACCTGCTCCCTCTAATTTTTCAGCAT
GATGAAATTTTGGCTCTTTATTAGGAGTATGCTTAGGATTACAAATTTAACTGGGTTGTTCCCTAGCAATGCCTACACCGCTGACAC
CACCACCGCATTCTCATCAGTTACACATATTTGTCGTGACGTAAACTACGGTTGACTAATCCGCTATATACATGCCAACGGAGCATCA
ATATTCTTCTTTCTTTATTTACATATCGGACGGGAAATTTACTACGGGCTCTATACATTCAAAAACACATGAAATTTGGGGTCT
TACTTACTTGCAGTTATAGTACCCTTCCATAGGTTACGTATTACCATGAGGACAAATATCTTTTGGAGGACAACTAATTAATAC
AACTCCTTTACAGTATCCCTTACATTGGACCTACTCTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGTTTCTCAGTTGATAAAGCCACATTAACC
CGATTCTTTGCTTTCCATTTTATTCTTCCATTTATAATCACAGCAATAGTAATAATTCACCTACTATTCTTACACGAAACAGGATCAA
ATAATCCATCTGGCGTAAACTCAGACTCAGACAAAATCCATTTACCCTTACTATACAATCAAAGATGTATTAGGATTTTATTTCAT
AATAATTACACTAATAAGTCTAGTAATATTACGCCAGATCTTCTAGGAGATCCAGACAATATACCCTGCCAACCCATTAAACACA
CCTCCCATATTAACCAGAATGATACTTCTCTTCGCATACGCAATCTACGCTCAATCCCTAATAAACTTGGCGGAGTATTAGCTT
TAGTCTTCTCCATTCTAATCCTAACACTATTCCTTATTCTACATTCATCTAAACAACGCAGTATATCATTCCGACCTTAAAGTCAGTG
CTTAATATGAATATTAGTGCCAACTATTAATCTTACATGAATTTGGCGGCAACCAGTCGAACATCCCTTTATCACCATTTGGTCAA
CTAGCATCTGTAACCTATTTCTTTACTATTTTAATCTTATACCCTCAACAGCCTTAATAGAAAATAAACTACTCAAATGATAA

OctodontomATGACTAATATCCGAAAATCTCACCCCTTAATCAAATCATTAACTCAATTTATCGACTTACCAGCTCCCTCAAAT
ATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCCTTATTAGGTGATGTTTAAATATTACAAATTTATCACAGGTTATTTCTAGCTATACACTACA
CAGCGGATACTACTACAGCATTCTCATCAGTACCCATATCTGCCGAGATGTTAACTACGGATGACTAATCCGCTACCTTACAGCTAA
CGGGGATCTATATCTTTATTTCTTTTATTTCTTATCTTATCGGACGGAAATTTATTACGGATCAATTTACTTTTATAGAAAACCTGAAAC
ATCGGAGTACTACTATTATTCGCGTCTAGCTACAGCTTTCATAGGCTACGTACTACCATGAGGACAAATATCCTTTTGGGGGCGA
CTGTTATTACAAATCTTTTATCAGCAATCCCTTATATTGGCCTAACTTAGTAGAATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAGTTGATAAAGC
TACATAACCCGATTTCTCGCTTCCACTTCAATTTACATTATTCAGCAATAGTAATAATCCACTTATTATCTTACACGAA
ACAGGGTCAAATAACCCATCAGGACTAACTCAGATTACAGCAAAATCCCTTCCACCTTATTATACAATCAAAGACATCTTAGGAC
TTCTATTCTAGTACTTACACTAATAACCTTGTTTTATTTTACCAGATCTCTTAGGAGACCCAGATAATTATACACCCGCTAATCC
GCTAAATACCCCTCCACATTAACCAGAATGATATTTCTATTGTCATACGCTATCCTTCGCTCAATCCCAATAAATAGGAGGG
GTTTTAGCCTTAGTATTTTCTATTTTAACTTAAATATTATTTCCCTACTACAAATATCCAAACAACGCAGTATATCATCCGCTCCC
TAAGTCAATCCCTTTTATAGTCCCTAGTGCCAACTTAAATATTCTTACATGAATTTGGAGGTCAACCAGTAGAACACCCATTCATCAT
AATTGGACAACCTAGCCTCAGTGATTTATTTTCTATTATCTTAACTTTTATACCAATTTAGTCTTATAGAAAACAACTCCTTAA
TGAAGA

6.1. Matriz de distancias entre las secuencias de citocromo b

P A U P *

Version 4.0b10 for Macintosh (PPC)

This copy registered to: Maria Susana Rossi

FCEyN, UBA

(serial number = B413774)

Uncorrected ("p") distance matrix

	1							
1 C.boliv15800	-							
2 C.boliv15726	0.00000	-						
3 ROBO12437	0.03355	0.03355	-					
4 ROBO12438	0.03355	0.03355	0.00000	-				
5 C.opimus11550	0.03388	0.03388	0.03849	0.03849	-			
6 Octodon17519	0.09836	0.09836	0.10493	0.10493	0.10230	-		
7 Octodon17520	0.09836	0.09836	0.10493	0.10493	0.10230	0.00000	-	
8 C.steinbachi1213	0.03421	0.03421	0.03684	0.03684	0.03914	0.10559	0.10559	-
9 C.steinbachi1213	0.03388	0.03388	0.03651	0.03651	0.03882	0.10526	0.10526	
10 C.frater14621	0.05724	0.05724	0.06414	0.06414	0.05888	0.10921	0.10921	
11 C.frater14622	0.05658	0.05658	0.06349	0.06349	0.05822	0.10921	0.10921	
12 ITA12221	0.03224	0.03224	0.03586	0.03586	0.03257	0.10230	0.10230	
13 LLATHU22840	0.05625	0.05625	0.05724	0.05724	0.05000	0.10461	0.10461	
14 C.lewisil14649	0.05625	0.05625	0.05954	0.05954	0.05329	0.10658	0.10658	
15 Spalacopus	0.10757	0.10757	0.11053	0.11053	0.11447	0.06349	0.06349	
16 C.mendoc5502	0.03487	0.03487	0.03783	0.03783	0.03553	0.09375	0.09375	
17 C.goodfello13029	0.00789	0.00789	0.03421	0.03421	0.03553	0.09967	0.09967	

18	<i>C.goodfelloi</i> 13030	0.00526	0.00526	0.03224	0.03224	0.03289	0.10000	0.10000
19	<i>C.minutus</i> 12404	0.03355	0.03355	0.03783	0.03783	0.03520	0.09803	0.09803
20	<i>C.minutus</i> 12406	0.03421	0.03421	0.03849	0.03849	0.03586	0.09803	0.09803
21	<i>C.conoverii</i> 12606	0.05197	0.05197	0.05526	0.05526	0.04967	0.10526	0.10526
22	<i>C.conoverii</i> 12607	0.05296	0.05296	0.05625	0.05625	0.05066	0.10592	0.10592
23	<i>C.leucodon</i> 14789	0.05329	0.05329	0.05263	0.05263	0.05329	0.11118	0.11118
24	<i>Tympanoctomys</i>	0.09803	0.09803	0.10362	0.10362	0.10164	0.07204	0.07204
25	<i>C.haigi</i> 5509	0.03849	0.03849	0.04474	0.04474	0.04507	0.10197	0.10197
26	MONTE21303	0.03092	0.03092	0.03191	0.03191	0.03553	0.10592	0.10592
27	<i>C.argentinus</i> I702	0.04868	0.04868	0.05000	0.05000	0.04967	0.10493	0.10493
28	<i>C.porteوسي</i> I229	0.04046	0.04046	0.04276	0.04276	0.03947	0.10033	0.10033
29	<i>C.porteوسي</i> I539	0.03421	0.03421	0.03586	0.03586	0.03487	0.09539	0.09539
30	<i>C.tuconax</i> I679	0.04408	0.04408	0.04934	0.04934	0.04605	0.09868	0.09868
31	<i>C.tuconax</i> I867	0.04408	0.04408	0.05000	0.05000	0.04507	0.10132	0.10132
32	<i>C.fulvus</i> AS872	0.03651	0.03651	0.03849	0.03849	0.01086	0.09868	0.09868
33	<i>C.fulvus</i> 2342	0.03783	0.03783	0.04046	0.04046	0.01217	0.10000	0.10000
34	<i>C.fulvus</i> MHG1042	0.03454	0.03454	0.03717	0.03717	0.00822	0.10033	0.10033
35	<i>C.fulvus</i> DR2323	0.03586	0.03586	0.03849	0.03849	0.01020	0.09803	0.09803
36	<i>C.talarum</i> I695	0.03882	0.03882	0.04474	0.04474	0.03684	0.09375	0.09375
37	<i>C.magellanicus</i> 68	0.03520	0.03520	0.03684	0.03684	0.03553	0.09474	0.09474
38	<i>C.tucumanus</i> I987	0.03421	0.03421	0.03520	0.03520	0.03618	0.09178	0.09178
39	<i>C.tucumanus</i> I989	0.03783	0.03783	0.03783	0.03783	0.03980	0.09474	0.09474
40	<i>C.tuconax</i> I990	0.04375	0.04375	0.05066	0.05066	0.04572	0.10066	0.10066
41	<i>C.tucumanus</i> 38	0.03388	0.03388	0.03553	0.03553	0.03651	0.09211	0.09211
42	<i>C.mendocinus</i> MSR2	0.03553	0.03553	0.03914	0.03914	0.03520	0.09737	0.09737
43	<i>C.mendocinus</i> MSR3	0.03421	0.03421	0.03783	0.03783	0.03257	0.09572	0.09572
44	<i>C.australis</i> 1036	0.03520	0.03520	0.03882	0.03882	0.03618	0.09474	0.09474
45	<i>C.australis</i> 2	0.03520	0.03520	0.03882	0.03882	0.03586	0.09474	0.09474
46	<i>C.talarum</i> 44	0.03487	0.03487	0.04211	0.04211	0.03224	0.09178	0.09178
47	<i>C.talarum</i> 2	0.03816	0.03816	0.04342	0.04342	0.03750	0.09145	0.09145
48	<i>C.opimus</i> I464	0.03750	0.03750	0.03947	0.03947	0.00954	0.10197	0.10197
49	<i>C.opimus</i> DR2326	0.03421	0.03421	0.03684	0.03684	0.00559	0.10033	0.10033
50	<i>C.maulinus</i> MHG115	0.03651	0.03651	0.03783	0.03783	0.03158	0.09605	0.09605
51	<i>C.maulinus</i> 1019	0.03553	0.03553	0.03750	0.03750	0.03322	0.09770	0.09770
52	<i>C.latro</i> I998	0.04572	0.04572	0.04770	0.04770	0.04737	0.10428	0.10428
53	<i>C.latro</i> 46	0.04770	0.04770	0.05033	0.05033	0.04934	0.10625	0.10625
54	<i>C.pearsoni</i>	0.04145	0.04145	0.04408	0.04408	0.03849	0.10132	0.10132
55	<i>C.rionegrensis</i> CA	0.03750	0.03750	0.03816	0.03816	0.03454	0.09572	0.09572
56	<i>C.coyhaiquensis</i> F	0.03026	0.03026	0.03717	0.03717	0.03586	0.09638	0.09638
57	<i>C.torquatus</i> CA743	0.03750	0.03750	0.04046	0.04046	0.03882	0.09836	0.09836
58	<i>C.flamarioni</i> T29	0.03816	0.03816	0.03980	0.03980	0.03816	0.09770	0.09770
59	<i>Octodontomys</i>	0.10625	0.10625	0.10789	0.10789	0.10757	0.06776	0.06776

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	8	9	10				
8 C.steinbachii1213	-						
9 C.steinbachii1213	0.00033	-					
10 C.frateri14621	0.05691	0.05691	-				
11 C.frateri14622	0.05691	0.05691	0.00066	-			
12 ITA12221	0.03158	0.03158	0.05559	0.05493	-		
13 LLATHU22840	0.05954	0.05921	0.04803	0.04737	0.05263	-	
14 C.lewisii14649	0.05625	0.05658	0.02895	0.02895	0.05362	0.04507	-
15 Spalacopus	0.10724	0.10691	0.11349	0.11414	0.10987	0.11250	0.11316
16 C.mendoc5502	0.03651	0.03618	0.05559	0.05493	0.03125	0.05395	0.05033
17 C.goodfello13029	0.03651	0.03618	0.06020	0.05954	0.03421	0.05789	0.05658
18 C.goodfello13030	0.03388	0.03421	0.05888	0.05822	0.03059	0.05362	0.05428
19 C.minutus12404	0.03618	0.03618	0.05493	0.05428	0.02730	0.05428	0.04868
20 C.minutus12406	0.03651	0.03651	0.05526	0.05461	0.02763	0.05493	0.04901
21 C.conoveri12606	0.05395	0.05362	0.05033	0.05033	0.04901	0.04046	0.04211
22 C.conoveri12607	0.05428	0.05461	0.05099	0.05099	0.04967	0.04079	0.04243
23 C.leucodon14789	0.05822	0.05789	0.06447	0.06382	0.05066	0.06414	0.06414
24 Tympanoctomys	0.10461	0.10493	0.10822	0.10789	0.09770	0.10362	0.10461
25 C.haigi5509	0.04276	0.04243	0.06184	0.06118	0.04243	0.06053	0.05921
26 MONTE21303	0.03487	0.03487	0.05691	0.05691	0.02730	0.05395	0.05822
27 C.argentinusI702	0.04572	0.04605	0.06612	0.06612	0.04276	0.06414	0.06349
28 C.porteوسيI229	0.04145	0.04112	0.06184	0.06118	0.03553	0.06086	0.05658
29 C.porteوسيI539	0.03618	0.03586	0.05461	0.05395	0.03158	0.05329	0.04803
30 C.tuconaxI679	0.04507	0.04539	0.05428	0.05493	0.04408	0.05230	0.05296
31 C.tuconaxI867	0.04638	0.04671	0.05592	0.05658	0.04539	0.05296	0.05197
32 C.fulvusAS872	0.03980	0.03947	0.05691	0.05625	0.03520	0.05132	0.05559
33 C.fulvus2342	0.04079	0.04079	0.05855	0.05789	0.03586	0.05263	0.05658
34 C.fulvusMHG1042	0.03849	0.03816	0.05395	0.05329	0.03322	0.05000	0.05329
35 C.fulvusDR2323	0.03914	0.03882	0.05691	0.05625	0.03454	0.05066	0.05493
36 C.talarumI695	0.03816	0.03849	0.05954	0.05954	0.03684	0.05987	0.05526
37 C.magellanicus68	0.03684	0.03717	0.05197	0.05197	0.03355	0.04770	0.04770
38 C.tucumanusI987	0.03454	0.03421	0.05757	0.05691	0.03158	0.05362	0.04967
39 C.tucumanusI989	0.03816	0.03783	0.05987	0.05921	0.03454	0.05658	0.05329
40 C.tuconaxI990	0.04605	0.04638	0.05493	0.05559	0.04507	0.05395	0.05296
41 C.tucumanus38	0.03421	0.03388	0.05724	0.05658	0.03125	0.05329	0.04934
42 C.mendocinusMSR2	0.03520	0.03487	0.05493	0.05428	0.03092	0.05329	0.04868
43 C.mendocinusMSR3	0.03454	0.03421	0.05428	0.05362	0.02961	0.05197	0.04868
44 C.australis1036	0.03750	0.03717	0.05625	0.05559	0.03125	0.05493	0.05197
45 C.australis2	0.03750	0.03717	0.05691	0.05625	0.03125	0.05625	0.05263
46 C.talarum44	0.03487	0.03520	0.05691	0.05691	0.03289	0.05625	0.05197
47 C.talarum2	0.03947	0.03980	0.05724	0.05724	0.03487	0.05559	0.05263
48 C.opimusI464	0.04013	0.03980	0.05658	0.05592	0.03355	0.05164	0.05461
49 C.opimusDR2326	0.03783	0.03750	0.05658	0.05592	0.03289	0.04934	0.05230
50 C.maulinusMHG115	0.03454	0.03421	0.05592	0.05526	0.03158	0.04967	0.05263
51 C.maulinus1019	0.03322	0.03289	0.05395	0.05329	0.03322	0.05230	0.05395
52 C.latroI998	0.04474	0.04507	0.06414	0.06414	0.04112	0.06414	0.06217
53 C.latro46	0.04605	0.04638	0.06546	0.06546	0.04243	0.06579	0.06349
54 C.pearsoni	0.03980	0.03947	0.06217	0.06217	0.03553	0.05921	0.05493
55 C.rionegrensisCA	0.03816	0.03783	0.05592	0.05526	0.03388	0.05493	0.05164
56 C.coyhaiquensisF	0.03553	0.03520	0.05395	0.05329	0.03355	0.05164	0.05066
57 C.torquatusCA743	0.04046	0.04013	0.05822	0.05757	0.03553	0.05625	0.05493
58 C.flamarioniT29	0.04178	0.04145	0.05921	0.05855	0.03388	0.05954	0.05362
59 Octodontomys	0.11118	0.11086	0.10855	0.10855	0.10493	0.10362	0.10855

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	15	16	17				
15 Spalacopus	-						
16 C.mendoc5502	0.10066	-					
17 C.goodfello13029	0.10987	0.03750	-				
18 C.goodfello13030	0.10888	0.03684	0.00724	-			
19 C.minutus12404	0.10592	0.03158	0.03586	0.03322	-		
20 C.minutus12406	0.10592	0.03224	0.03651	0.03388	0.00066	-	
21 C.conoveri12606	0.11316	0.04605	0.05559	0.05132	0.04441	0.04507	-
22 C.conoveri12607	0.11316	0.04638	0.05658	0.05164	0.04507	0.04572	0.00099
23 C.leucodon14789	0.11678	0.05428	0.05461	0.05197	0.05263	0.05329	0.06842
24 Tympanoctomys	0.08224	0.09211	0.10099	0.09836	0.09770	0.09737	0.10526
25 C.haigi5509	0.10888	0.03553	0.04013	0.03947	0.04145	0.04211	0.05625
26 MONTE21303	0.11118	0.03487	0.03224	0.03191	0.03092	0.03158	0.05493
27 C.argentinusI702	0.11447	0.03980	0.05033	0.04901	0.04507	0.04572	0.06151
28 C.porteosisI229	0.10526	0.01086	0.04309	0.04309	0.03717	0.03783	0.05296
29 C.porteosisI539	0.10066	0.00658	0.03750	0.03684	0.03125	0.03191	0.04474
30 C.tuconaxI679	0.10428	0.04342	0.04671	0.04408	0.04704	0.04770	0.05559
31 C.tuconaxI867	0.10493	0.04507	0.04803	0.04408	0.04737	0.04803	0.05428
32 C.fulvusAS872	0.10987	0.03487	0.03651	0.03520	0.03816	0.03882	0.05230
33 C.fulvus2342	0.11118	0.03618	0.03783	0.03618	0.03914	0.03980	0.05362
34 C.fulvusMHG1042	0.11184	0.03487	0.03421	0.03289	0.03618	0.03684	0.04934
35 C.fulvusDR2323	0.10921	0.03421	0.03586	0.03454	0.03750	0.03816	0.05164
36 C.talarumI695	0.10296	0.02533	0.04211	0.04079	0.03684	0.03750	0.05230
37 C.magellanicus68	0.10099	0.03026	0.03750	0.03421	0.03257	0.03322	0.04934
38 C.tucumanusI987	0.10197	0.02401	0.03586	0.03454	0.03125	0.03191	0.04803
39 C.tucumanusI989	0.10559	0.02763	0.03947	0.03750	0.03487	0.03553	0.05164
40 C.tuconaxI990	0.10428	0.04474	0.04770	0.04375	0.04704	0.04770	0.05395
41 C.tucumanus38	0.10230	0.02368	0.03553	0.03421	0.03092	0.03158	0.04770
42 C.mendocinusMSR2	0.10099	0.01447	0.03816	0.03816	0.03092	0.03158	0.04868
43 C.mendocinusMSR3	0.10132	0.01316	0.03684	0.03684	0.02961	0.03026	0.04803
44 C.australis1036	0.10033	0.00625	0.03849	0.03783	0.03191	0.03257	0.04605
45 C.australis2	0.10033	0.00625	0.03849	0.03783	0.03191	0.03257	0.04803
46 C.talarum44	0.10197	0.02138	0.03816	0.03684	0.03289	0.03355	0.04901
47 C.talarum2	0.09868	0.01349	0.04079	0.04013	0.03487	0.03553	0.04737
48 C.opimusI464	0.11250	0.03520	0.03717	0.03586	0.03651	0.03717	0.05132
49 C.opimusDR2326	0.11184	0.03651	0.03388	0.03257	0.03586	0.03651	0.05000
50 C.maulinusMHG115	0.10658	0.02697	0.03849	0.03553	0.03092	0.03158	0.04770
51 C.maulinus1019	0.10592	0.02533	0.03684	0.03586	0.03191	0.03191	0.04934
52 C.latroI998	0.11118	0.03816	0.04737	0.04671	0.04211	0.04276	0.05921
53 C.latro46	0.11349	0.03947	0.04934	0.04868	0.04342	0.04408	0.06053
54 C.pearsoni	0.11053	0.02895	0.04309	0.04211	0.03717	0.03783	0.05263
55 C.rionegrensisCA	0.09836	0.01711	0.03947	0.03947	0.03520	0.03586	0.05132
56 C.coyhaiquensisF	0.10164	0.02566	0.03421	0.03289	0.03125	0.03191	0.04638
57 C.torquatusCA743	0.10493	0.02862	0.03914	0.03816	0.03421	0.03487	0.05493
58 C.flamarioniT29	0.10164	0.01382	0.04079	0.04013	0.03553	0.03618	0.05033
59 Octodontomys	0.07763	0.09770	0.10724	0.10724	0.10395	0.10362	0.10625

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	22	23	24				
22 C.conoveri12607	-						
23 C.leucodon14789	0.06875	-					
24 Tympanoctomys	0.10428	0.10691	-				
25 C.haigi5509	0.05724	0.05888	0.10099	-			
26 MONTE21303	0.05559	0.05329	0.10132	0.04309	-		
27 C.argentinusI702	0.06118	0.06086	0.10921	0.05132	0.05033	-	
28 C.porteouisiI229	0.05329	0.05789	0.09671	0.04276	0.03980	0.03947	-
29 C.porteouisiI539	0.04507	0.05395	0.09243	0.03882	0.03553	0.04013	0.01118
30 C.tuconaxI679	0.05592	0.05987	0.10000	0.04836	0.04507	0.05658	0.04638
31 C.tuconaxI867	0.05461	0.05888	0.09770	0.05000	0.04638	0.05822	0.04803
32 C.fulvusAS872	0.05329	0.05822	0.10263	0.04507	0.03816	0.04704	0.03882
33 C.fulvus2342	0.05428	0.05954	0.10362	0.04638	0.03914	0.04803	0.04013
34 C.fulvusMHG1042	0.05033	0.05658	0.10329	0.04243	0.03487	0.04770	0.03882
35 C.fulvusDR2323	0.05263	0.05757	0.10197	0.04441	0.03750	0.04638	0.03816
36 C.talarumI695	0.05132	0.05921	0.09868	0.04342	0.04013	0.04342	0.02961
37 C.magellanicus68	0.04967	0.05132	0.09638	0.03454	0.03618	0.04243	0.03717
38 C.tucumanusI987	0.04901	0.05428	0.09408	0.03487	0.03618	0.03684	0.03026
39 C.tucumanusI989	0.05263	0.05724	0.09737	0.03816	0.03947	0.03849	0.03388
40 C.tuconaxI990	0.05428	0.05954	0.09770	0.04934	0.04572	0.05789	0.04770
41 C.tucumanus38	0.04868	0.05461	0.09441	0.03520	0.03651	0.03651	0.02993
42 C.mendocinusMSR2	0.04901	0.05428	0.09803	0.03487	0.03421	0.03882	0.01875
43 C.mendocinusMSR3	0.04836	0.05230	0.09605	0.03355	0.03289	0.03684	0.01743
44 C.australis1036	0.04638	0.05461	0.09243	0.03816	0.03586	0.03882	0.00921
45 C.australis2	0.04836	0.05461	0.09309	0.03816	0.03586	0.04013	0.00888
46 C.talarum44	0.04803	0.05658	0.09572	0.04013	0.03618	0.04079	0.02566
47 C.talarum2	0.04638	0.05789	0.09211	0.04079	0.03882	0.04145	0.01776
48 C.opimusI464	0.05230	0.05691	0.10263	0.04539	0.03520	0.04934	0.03849
49 C.opimusDR2326	0.05099	0.05428	0.10362	0.04408	0.03520	0.04868	0.04046
50 C.maulinusMHG115	0.04803	0.05164	0.09638	0.03586	0.03520	0.03750	0.03125
51 C.maulinus1019	0.05033	0.05197	0.09638	0.03388	0.03487	0.03816	0.03026
52 C.latroI998	0.05888	0.06053	0.10461	0.05000	0.04737	0.00757	0.04112
53 C.latro46	0.06020	0.06250	0.10757	0.05197	0.04868	0.00822	0.04243
54 C.pearsoni	0.05296	0.05230	0.10362	0.04375	0.04013	0.04704	0.03322
55 C.rionegrensisCA	0.05164	0.04967	0.09671	0.03914	0.03783	0.04079	0.02072
56 C.coyhaiquensisF	0.04671	0.05066	0.09507	0.02303	0.03553	0.03980	0.03224
57 C.torquatusCA743	0.05526	0.05395	0.09671	0.03914	0.03816	0.04408	0.03125
58 C.flamarioniT29	0.05066	0.05724	0.09572	0.04276	0.03750	0.04276	0.01809
59 Octodontomys	0.10592	0.11250	0.07007	0.10592	0.10888	0.11349	0.10329

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	29	30	31				
29 C.porteوسيI539	-						
30 C.tuconaxI679	0.04178	-					
31 C.tuconaxI867	0.04211	0.00263	-				
32 C.fulvusAS872	0.03421	0.04474	0.04638	-			
33 C.fulvus2342	0.03684	0.04572	0.04737	0.00263	-		
34 C.fulvusMHG1042	0.03553	0.04408	0.04572	0.00691	0.00822	-	
35 C.fulvusDR2323	0.03487	0.04408	0.04572	0.00066	0.00197	0.00625	-
36 C.talarumI695	0.02434	0.04737	0.04901	0.03553	0.03783	0.03684	0.03618
37 C.magellanicus68	0.03092	0.04474	0.04507	0.03520	0.03618	0.03388	0.03454
38 C.tucumanusI987	0.02401	0.04243	0.04408	0.03618	0.03750	0.03487	0.03553
39 C.tucumanusI989	0.02697	0.04605	0.04770	0.03914	0.04112	0.03849	0.03914
40 C.tuconaxI990	0.04309	0.00263	0.00132	0.04572	0.04671	0.04507	0.04507
41 C.tucumanus38	0.02368	0.04243	0.04408	0.03651	0.03783	0.03520	0.03586
42 C.mendocinusMSR2	0.01546	0.04276	0.04441	0.03454	0.03586	0.03454	0.03388
43 C.mendocinusMSR3	0.01414	0.04211	0.04375	0.03191	0.03322	0.03191	0.03125
44 C.australis1036	0.00658	0.04309	0.04474	0.03553	0.03684	0.03553	0.03487
45 C.australis2	0.00658	0.04309	0.04474	0.03520	0.03651	0.03520	0.03454
46 C.talarum44	0.02171	0.04342	0.04507	0.03224	0.03322	0.03224	0.03158
47 C.talarum2	0.01513	0.04276	0.04441	0.03684	0.03783	0.03684	0.03618
48 C.opimusI464	0.03520	0.04572	0.04737	0.00987	0.01118	0.00757	0.00921
49 C.opimusDR2326	0.03586	0.04737	0.04770	0.00855	0.00987	0.00625	0.00789
50 C.maulinusMHG115	0.02664	0.04112	0.04276	0.03158	0.03289	0.03092	0.03092
51 C.maulinus1019	0.02566	0.04276	0.04441	0.03125	0.03257	0.03125	0.03059
52 C.latroI998	0.03849	0.05526	0.05691	0.04539	0.04638	0.04539	0.04474
53 C.latro46	0.03980	0.05658	0.05822	0.04671	0.04770	0.04737	0.04605
54 C.pearsoni	0.03059	0.04836	0.05000	0.03980	0.04112	0.03849	0.03914
55 C.rionegrensisCA	0.01743	0.04112	0.04276	0.03454	0.03586	0.03454	0.03388
56 C.coyhaiquensisF	0.02566	0.04539	0.04572	0.03717	0.03849	0.03454	0.03651
57 C.torquatusCA743	0.02829	0.04309	0.04474	0.03882	0.04013	0.03684	0.03816
58 C.flamarioniT29	0.01414	0.04243	0.04375	0.03849	0.03980	0.03616	0.03783
59 Octodontomys	0.09770	0.09901	0.10000	0.10658	0.10789	0.10789	0.10592

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	36	37	38				
36 C.talarumI695	-						
37 C.magellanicus68	0.03618	-					
38 C.tucumanusI987	0.03092	0.03059	-				
39 C.tucumanusI989	0.03322	0.03388	0.00362	-			
40 C.tuconaxI990	0.04868	0.04605	0.04342	0.04704	-		
41 C.tucumanus38	0.03059	0.03026	0.00033	0.00395	0.04375	-	
42 C.mendocinusMSR2	0.02401	0.03026	0.02566	0.02599	0.04408	0.02533	-
43 C.mendocinusMSR3	0.02401	0.02829	0.02368	0.02730	0.04342	0.02336	0.00461
44 C.australis1036	0.02500	0.03191	0.02566	0.02928	0.04441	0.02533	0.01480
45 C.australis2	0.02500	0.03191	0.02566	0.02928	0.04441	0.02533	0.01480
46 C.talarum44	0.00526	0.03289	0.02763	0.03125	0.04474	0.02730	0.02138
47 C.talarum2	0.01316	0.03454	0.02961	0.03322	0.04408	0.02928	0.01941
48 C.opimusI464	0.03783	0.03487	0.03586	0.03947	0.04671	0.03618	0.03421
49 C.opimusDR2326	0.03684	0.03289	0.03586	0.03947	0.04836	0.03618	0.03618
50 C.maulinusMHG115	0.03059	0.02895	0.02500	0.02796	0.04243	0.02467	0.02697
51 C.maulinus1019	0.03224	0.02862	0.02467	0.02829	0.04408	0.02434	0.02533
52 C.latroI998	0.04342	0.04145	0.03618	0.03980	0.05658	0.03586	0.03717
53 C.latro46	0.04572	0.04342	0.03750	0.03783	0.05789	0.03717	0.03520
54 C.pearsoni	0.03257	0.03388	0.03421	0.03750	0.04967	0.03388	0.02895
55 C.rionegrensisCA	0.02829	0.03355	0.02862	0.03224	0.04178	0.02829	0.01678
56 C.coyhaiquensisF	0.03224	0.02434	0.02566	0.02928	0.04671	0.02533	0.02566
57 C.torquatusCA743	0.03487	0.03388	0.03355	0.03684	0.04441	0.03322	0.02730
58 C.flamarioniT29	0.03026	0.03487	0.03125	0.03454	0.04342	0.03092	0.02039
59 Octodontomys	0.10099	0.10066	0.09901	0.10263	0.10066	0.09934	0.10099

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	43	44	45				
43 C.mendocinusMSR3	-						
44 C.australis1036	0.01349	-					
45 C.australis2	0.01349	0.00197	-				
46 C.talarum44	0.02007	0.02105	0.02105	-			
47 C.talarum2	0.01809	0.01250	0.01250	0.00855	-		
48 C.opimusI464	0.03158	0.03520	0.03487	0.03388	0.03783	-	
49 C.opimusDR2326	0.03355	0.03717	0.03684	0.03224	0.03849	0.00855	-
50 C.maulinusMHG115	0.02566	0.02664	0.02664	0.02730	0.02928	0.03257	0.03257
51 C.maulinus1019	0.02401	0.02566	0.02566	0.02763	0.02895	0.03355	0.03289
52 C.latroI998	0.03586	0.03618	0.03816	0.04013	0.04079	0.04704	0.04638
53 C.latro46	0.03717	0.03783	0.03980	0.04178	0.04243	0.04901	0.04836
54 C.pearsoni	0.02763	0.02862	0.02862	0.02862	0.02993	0.03947	0.03750
55 C.rionegrensisCA	0.01414	0.01678	0.01678	0.02401	0.02171	0.03454	0.03618
56 C.coyhaiquensisF	0.02434	0.02697	0.02697	0.02895	0.03026	0.03618	0.03487
57 C.torquatusCA743	0.02599	0.02730	0.02730	0.03092	0.03092	0.03717	0.03914
58 C.flamarioniT29	0.01908	0.01349	0.01349	0.02632	0.01974	0.03849	0.03914
59 Octodontomys	0.09967	0.09868	0.09803	0.09803	0.09539	0.10888	0.10757

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	50	51	52				
50 C.maulinusMHG115	-						
51 C.maulinus1019	0.00822	-					
52 C.latroI998	0.03651	0.03651	-				
53 C.latro46	0.03849	0.03783	0.00329	-			
54 C.pearsoni	0.03158	0.03322	0.04507	0.04737	-		
55 C.rionegrensisCA	0.02895	0.02796	0.03914	0.04046	0.03224	-	
56 C.coyhaiquensisF	0.02664	0.02566	0.03882	0.04079	0.03454	0.02796	-
57 C.torquatusCA743	0.02895	0.03059	0.04309	0.04375	0.02993	0.03158	0.03191
58 C.flamarioniT29	0.02961	0.02862	0.04112	0.04243	0.03125	0.02039	0.03224
59 Octodontomys	0.09836	0.09901	0.11053	0.11283	0.10888	0.10132	0.10000

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	57	58	59
57 C.torquatusCA743	-		
58 C.flamarioniT29	0.03191	-	
59 Octodontomys	0.10132	0.10132	-

6.3. Matriz de distancias entre las secuencias de SRPC

9 10

1 magellanicus	-						
2 porteusi	0.00377	-					
3 boliviensis	0.00000	0.00358	-				
4 haigi	0.00000	0.00764	0.00376	-			
5 tucumanus	0.00000	0.00791	0.00389	0.00646	-		
7 minut	0.00000	0.00793	0.00391	0.00645	0.00000	-	
8 goodfellowi	0.00000	0.00763	0.00376	0.00000	0.00000	0.00000	-
9 robo	0.00000	0.00782	0.00385	0.00651	0.01933	0.01922	0.00000
-							
10 ita	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.00000							
11 monte	0.00367	0.00358	0.00358	0.00391	0.00406	0.00407	0.00392
0.00401	0.00000						
12 talarum	0.00370	0.00739	0.00371	0.00000	0.00000	0.00366	0.00000
0.00000	0.00000						
13 consenso clones	0.00782	0.01503	0.01127	0.00926	0.04072	0.04725	0.00357
0.00659	0.00385						
14 latro	0.00371	0.01146	0.00747	0.00644	0.03175	0.03768	0.00000
0.00000	0.00000						
15 mendo	0.01824	0.02549	0.02142	0.01690	0.03312	0.03615	0.01395
0.01316	0.01466						
16 pearsoni	0.00357	0.01144	0.00735	0.00965	0.03793	0.04090	0.00345
0.00313	0.00364						

17 australis	0.00000	0.00791	0.00389	0.00644	0.03457	0.03740	0.00000
0.00000 0.00000							
18 maulinus	0.00000	0.01486	0.01090	0.02293	0.03269	0.03556	0.01683
0.01924 0.01095							
19 argentinus	0.01151	0.02217	0.01813	0.02326	0.03235	0.03512	0.01358
0.01282 0.01779							
20 leucodon	0.00397	0.01493	0.01112	0.01149	0.01160	0.01160	0.01140
0.01152 0.01163							
21 opiB	0.00761	0.01862	0.01441	0.01962	0.03541	0.03831	0.01347
0.01591 0.01431							
22 fulvus	0.00754	0.01836	0.01429	0.01660	0.01687	0.01689	0.01353
0.01678 0.01435							
23 opiA	0.00413	0.01517	0.01108	0.01646	0.03210	0.03500	0.01019
0.01274 0.01099							
24 llathu	0.05163	0.06053	0.05687	0.05932	0.06806	0.07095	0.05378
0.05473 0.05756							
25 steinbachi	0.04144	0.04407	0.04695	0.04713	0.05929	0.06239	0.04517
0.04596 0.04823							
26 conoveri	0.04720	0.04680	0.05452	0.05745	0.05697	0.05819	0.05852
0.05827 0.05883							
27 frater	0.03341	0.04080	0.04263	0.04595	0.06758	0.07375	0.04062
0.04490 0.04309							
28 lewisi	0.04115	0.04842	0.05128	0.05074	0.05054	0.05148	0.05171
0.05146 0.05200							
29 tuconax	0.02620	0.02939	0.03649	0.04047	0.04091	0.04185	0.04130
0.04156 0.02964							

18	19						
11 monte	-						
12 talarum	0.00374	-					
13 consenso clones	0.00794	0.00385	-				
14 latro	0.00404	0.00000	0.00649	-			
15 mendo	0.01875	0.01474	0.01944	0.01310	-		
16 pearsoni	0.00774	0.00720	0.01861	0.00623	0.01283	-	
17 australis	0.00406	0.00360	0.01913	0.00624	0.01628	0.01254	-
18 maulinus	0.01518	0.01073	0.02914	0.02252	0.02614	0.02255	0.01920
19 argentinus	0.02212	0.02217	0.02574	0.01908	0.03268	0.01904	0.01586
0.01929							
20 leucodon	0.01586	0.01512	0.01920	0.01528	0.02633	0.01531	0.01147
0.00000 0.00372							
21 opiB	0.01878	0.01816	0.02562	0.02231	0.02946	0.02223	0.01895
0.01604 0.01280							
22 fulvus	0.01865	0.01825	0.02002	0.02020	0.03090	0.02001	0.01671
0.01674 0.01015							
23 opiA	0.01536	0.01474	0.02582	0.01910	0.02621	0.01907	0.01573
0.01279 0.00959							
24 llathu	0.06299	0.06177	0.06099	0.06101	0.06899	0.05799	0.05762
0.05799 0.05465							
25 steinbachi	0.04933	0.05220	0.04890	0.04605	0.06267	0.04586	0.04599
0.04288 0.04262							
26 conoveri	0.05553	0.06243	0.05740	0.05849	0.07388	0.05766	0.05808
0.04623 0.05405							
27 frater	0.04522	0.04708	0.05058	0.04783	0.06210	0.04447	0.04765
0.04817 0.04167							
28 lewisi	0.05388	0.05521	0.05062	0.05518	0.07002	0.05103	0.05117
0.04008 0.04770							
29 tuconax	0.02662	0.04124	0.04133	0.04554	0.05968	0.04155	0.04176
0.03395 0.04095							

28							
20 leucodon	-						
21 opiB	0.00346	-					
22 fulvus	0.00353	0.00321	-				
23 opiA	0.00000	0.00000	0.00321	-			
24 llathu	0.04394	0.03865	0.03966	0.04172	-		
25 steinbachi	0.03444	0.02634	0.02381	0.02972	0.04578	-	
26 conoveri	0.04307	0.03438	0.03473	0.03881	0.03435	0.00409	-
27 frater	0.02887	0.03512	0.02605	0.03833	0.01281	0.02278	0.01144
28 lewisi	0.03749	0.02885	0.02904	0.03294	0.00759	0.02639	0.01562

0.00314
29 tuconax 0.03044 0.02576 0.02564 0.02974 0.02196 0.03343 0.01175
0.01178 0.01874