Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Evolución de un complejo de especies de Ctenomys (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite

Caraballo, Diego Alfredo

2013

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:
Caraballo, Diego Alfredo. (2013). Evolución de un complejo de especies de Ctenomys (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Caraballo, Diego Alfredo. "Evolución de un complejo de especies de Ctenomys (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Evolución de un complejo de especies de *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Diego Alfredo Caraballo

Directora de tesis: Dra. María Susana Rossi

Consejera de estudios: Dra. Viviana Confalonieri

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular

IFIBYNE – CONICET UBA

Buenos Aires, 2013

Evolución de un complejo de especies de *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite

Resumen

Los tuco-tucos, roedores subterráneos del género *Ctenomys*, de la provincia de Corrientes habitan en gran parte de su área de distribución en ambientes inestables tanto desde el punto de vista espacial como temporal. Constituyen un excelente modelo para estudiar la especiación y la hibridación, y el rol de la evolución cromosómica en estos procesos, un rasgo conspicuo en este grupo. Unas 39 poblaciones fueron descriptas en este grupo, la mayoría de *status* taxonómico indefinido. La variabilidad en el número diploide (2n) y número fundamental (NF) es inusualmente elevada en este grupo (2n=41-70, NF=76-84). En este trabajo se obtuvo una filogenia molecular que incluye representantes de 23 poblaciones correntinas, utilizando los marcadores mitocondriales citocromo b, citocromo oxidasa I y región control (*D-loop*). El grupo Corrientes resultó monofilético. Las especies previamente descriptas *C. perrensi* y *C. dorbignyi* no resultaron monofiléticas. Se propone el subgrupo iberá como linaje evolutivo diferenciado e independiente.

Por otro lado, se obtuvieron cariomorfos de 33 individuos. El cariomorfo 2n=70 NF=84 ocurre en dos linajes basales en el grupo Corrientes, y en la especie hermana *C. pearsoni*, sería ancestral y habría sufrido reducciones en 2n y NF vía fusiones céntricas y en tándem, principalmente.

Se exploró la relación entre la dinámica del principal ADN satélite de los tucos (SRPC) y la variabilidad cromosómica en Corrientes. Se analizó también la variación intra/inter poblacional del número de copias y de la secuencia del satélite SRPC. El satélite SRPC siguió un patrón conservativo en algunos linajes pero altamente dinámico en otros. La evolución de la secuencia y el número de copias de SRPC es compatible con la hipótesis de una biblioteca ancestral, cuyas variantes están presentes en todos los linajes, aunque en proporciones diferentes.

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

- Caraballo DA, Belluscio PM y Rossi MS. The library model for satellite DNA evolution: A case study with the rodents of the genus *Ctenomys* (Octodontidae) from the Iberá marsh, Argentina. Genetica, 2010. 138:1201-1210.

- Caraballo DA, Abruzzese GA y Rossi MS. Diversity of tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) in the Northeastern wetlands from Argentina: mitochondrial phylogeny and chromosomal evolution. Genetica, 2012. 40:125-136.

Palabras clave: *Ctenomys*, filogenia mitocondrial, *D-loop*, citocromo b, citocromo oxidasa I, evolución cromosómica, fusiones céntricas, fusiones en tándem, ADN satélite, modelo de la biblioteca, SRPC

Evolution of a species complex of the genus *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) from northeastern Argentina: phylogeny, chromosomal variability and satellite DNA dynamics

Abstract

Tuco-tucos, subterranean rodents of the genus *Ctenomys*, from Corrientes province inhabit unstable environments both from a spatial and a temporal point of view, in most of its distribution. Tuco-tucos represent an excellent model for studying speciation and hybridization, and the role of chromosomal evolution in these processes, being a conspicuous attribute of this group. Most of the 39 populations described in this group have an undefined taxonomic status, and show an extraordinarily high diploid (2n) and fundamental number (FN) variability, in the ranges 2n=41-70 FN=76-84. In this work a molecular phylogeny was obtained, including representatives from 23 Correntinean populations, based on mitochondrial markers: cytochrome b, cytochrome oxidase I and the control region (*D-loop*). The Corrientes group resulted monophyletic. However, previously described species *C. perrensi* and *C. dorbignyi* did not result monophyletic. The iberá subgroup is proposed as an independent and differentiated evolutionary lineage.

Besides, 33 individual karyomorphs were obtained with uniform staining. Karyomorph 2n=70 FN=84 occurs in two basal lineages in the Corrientes group, as well as in its sister species *C. pearsoni*, would be ancestral and may have suffered reductions in both 2n and FN mainly via centric and tandem fusions.

The relationship between the major satellite DNA of tuco-tucos (RPCS) and chromosomal variability in Corrientes was studied. Intra and interpopulation variability in copy number and at RPCS' nucleotide profile were also analyzed. The satellite RPCS followed a conservative pattern in some lineages but it has been highly dynamic in others. Nucleotide sequence and copy number evolution in RPCS are compatible with the hypothesis of an ancestral library, in which variants are present in all lineages, but in different proportions.

Part of the results present in this thesis has given rise to the following two paper articles:

- Caraballo DA, Belluscio PM y Rossi MS. The library model for satellite DNA evolution: A case study with the rodents of the genus *Ctenomys* (Octodontidae) from the Iberá marsh, Argentina. Genetica, 2010. 138:1201-1210.

- Caraballo DA, Abruzzese GA y Rossi MS. Diversity of tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) in the Northeastern wetlands from Argentina: mitochondrial phylogeny and chromosomal evolution. Genetica, 2012. 40:125-136.

Keywords: *Ctenomys*, Mitochondrial phylogeny, *D-loop*, Cytochrome b, Cytochrome oxidase I, Chromosomal evolution, Centric fusions, Tandem fusions, Satellite DNA, library model, RPCS.

AGRADECIMIENTOS

A la tamaña empresa de escribir un documento de tesis que condense cinco años de trabajo ha de agregársele el incentivo y desafío de concentrar los agradecimientos acumulados a lo largo de este tiempo. Representa un premio el poder agradecer merecidamente a los que me acompañaron en un período tan significativo en mi vida.

A mi familia. A todos. En especial a mi madre, por haber sido siempre un pilar fundamental, por tanto amor y respeto a mis opciones, por su generosidad y su compañía. Por ponerse contenta de acompañarme en el momento de redacción. Gracias ma, te quiero muchísimo. También a mi hermana, mi abuela, mi cuñado y mi sobrino, que me acompañaron en este tiempo, y que todos juntos hicieron a una constelación que fuera mi acolchonado respaldo y refugio emocional en los momentos más movidos.

A mis amigos. A todos también. Difícil sería nombrarlos exhaustivamente, por lo que cometeré algunas parcialidades. A Juli y a Mari. La mitad del doctorado conviví con dos amigas del alma, y bellísimas personas. Gracias por haber navegado juntos en la nave de La Chacasita, por el amor, por acompañarnos en las tesis y en todo lo demás también. Las quiero muchísimo. A los del núcleo duro: Gas, Sapo, Gracia, Caro, Nacho, Salva, Manu. También de este grupo, pero con mención especial, a Marto y a Marcos, por haber remado el profesorado juntos, carrera paralela, y por la terapia tripartita gratuita.

Al Bachillerato Popular Ñanderoga, colectivo humano al que pertenezco con inmenso orgullo, donde ejercitamos el valor más noble de la educación: distribuir el poder y el conocimiento, y cambiar las representaciones propias y de los demás, tendiendo puentes, ampliando horizontes de posibilidades. Porque el mundo está hecho de y por los hombres, y ahí hacemos un mundo más justo, horizontal.

A los tucólogos y compañeros de campo, por el esfuerzo que significaron las capturas, lo intenso de los viajes, los momentos de distensión cantando en la camioneta o bailando a la vera de las rutas. También por las discusiones pertinentes al tema de investigación y las invaluables amistades que allí se produjeron. Gracias a Vanina Raimondi, Jimena Gómez Fernández, Patricia Mirol, Marcelo Kittlein, Matías Mora, Fernando Mapelli, Thales de Freitas, Laura Wolfenson y Rodrigo Álvarez.

A la Universidad de Buenos Aires, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. No sólo por ser el nicho en el que se gestara mi tesis, sino por la posibilidad de transitar otros caminos dentro de la facultad. Al Taller de Aguas, un espacio de espíritu transfomador. Al CEFIEC, en particular a Elsa Meinardi, y a todo el equipo de didáctica de la Biología, con los que he aprendido mucho sobre cómo enseñar ciencias. Al departamento de Ecología, Genética y Evolución, en el que se inscribe esta tesis, y donde he transitado experiencias muy satisfactorias en docencia universitaria. Gracias a Cecilia Bessega, una gran compañera, excelente docente, y alguien de quién aprendí mucho. Te deseo lo mejor, Ceci.

Gracias a Viviana Confalonieri, mi consejera de estudios, siempre dispuesta a darme una mano o un consejo. Y gracias también a Mabel y Graciela, secretarias del EGE por su calidez.

Al Laboratorio de Citogenética y Evolución (LACyE), en particular al grupo dirigido por Liliana Mola. Gracias por darme un espacio para realizar una parte central de la tesis, gracias por el tiempo compartido, y las discusiones metodológicas y de los resultados. Gracias Aye, Renzo, Giselle, Sergio, las Flores, y Geo, por darme siempre una mano. Gracias a Pablo Rebagliati, por formarme en ese camino, por lo humano del vínculo que generamos y por compartir juntos la dirección de la tesis de Paola Jablonski. Gracias Pao también, por la buena onda, el esfuerzo en tu tesis, y celebro feliz de estar recorriendo otros caminos juntos.

Al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. A toda su gente, en particular a los del lado Sur, con quienes he compartido de cerca estos años. A Lidia Szczupak, Omar Coso, Paula Cramer, Alberto Kornblihtt y María Ana Calviño, por los momentos de discusión de temas de todo tipo, intercambios musicales, y por sumarse a juegos de preguntas y respuestas organizados en la mesada. También al personal de apoyo y técnicos, a Dani, José, Leonor, Paula y Ramona, que son la fuerza motriz del laboratorio. A mis amigos del laboratorio que los quiero mucho. A Sol y a Julián, gracias por las charlas, los oídos, las risas y los abrazos, y por ser parte del núcleo duro. A Flor, compañerita desde el principio, Berni, Dai y Angie, por todos estos años amenizándonos la vida. A los más nuevos, ya no tan nuevos, Eli, Pau, Lau y Martín.

A mis compañeros de grupo. A Gise por la buena onda, y una predisposición inagotable para emprender la resolución de los juegos de rompecabezas que a veces se plantean en la labor de investigación. ¡Gracias por el optimismo, equipo! También por compartir preocupaciones, charlas y lecturas más que interesantes. A Pablo Belluscio, compañero y amigo, gracias por el vínculo que tenemos, por tu genialidad e inventiva, por haberme enseñado las primeras técnicas, y por el sólido equipo de campaña que hemos integrado. A Leo Ianone también, por los intercambios en las búsquedas filogenéticas y por las charlas sobre plantas nativas rioplatenses.

Por último, consideré conveniente hacer una mención aparte para el otro papel protagónico en esta historia. Al momento de la defensa de este trabajo de tesis, llevamos unos siete años trabajando juntos, en los que los roles y el vínculo tomaron muchas formas. Al principio, fui el aprendiz de una maestra que me introdujo al mundo de los tuco-tucos, la biología evolutiva, y la evolución de las secuencias de ADN satélite. Al comenzar esta tesis doctoral fuimos reacomodando fichas, y buscando la configuración más sinérgica posible. Y creo que la encontramos. Fue un placer escribir los trabajos publicados, fue muy fácil (si se exceptúa el esfuerzo relativo al volumen del trabajo) escribir la tesis también. Las discusiones, los mapas en el escritorio, con árboles filogenéticos por encima y cariotipos revoloteando, fueron dándole las

pinceladas más gruesas a este trabajo. Pinceladas que se cargaban de discrepancias pulidas, trabajos discutidos, y gusto por el tema de estudio. Entre sus virtudes, Susana Rossi tiene una visión amplia de la biología evolutiva. Es deseable, cuando uno trabaja con un modelo concreto, poder hacer cambios de nivel, compararlo con lo que se sabe del tema en otros modelos, y poder discutir la teoría y el dato a la vez. Eso fue posible con Susana. Las lecturas intercambiadas, la discusión teórica y la concreta han sido siempre ricas. También quiero agradecer a Susana el esfuerzo por horizontalizar la relación, algo que me dio mucha confianza en mí mismo, y que permitió, entre otras cosas, que pudiera dirigir la tesis de Paola, sin dudas una experiencia muy significativa en mi formación. También deseo agradecerle por el vínculo personal, la empatía mutua, la confianza depositada, y por acompañarme en mi formación como científico, un carácter que me constituirá el resto de mi existencia.

1 **INTRODUCCIÓN** 1

1.1 Los roedores del género *Ctenomys* 1

1.1.1 Taxonomía 1

1.1.2 Adaptaciones al ambiente subterráneo 1

1.1.3 Distribución 2

1.1.4 Estructura poblacional y social 4

1.1.5 Variabilidad cromosómica 7

1.1.6 El grupo Corrientes 7

1.1.6.1 Filogenia del grupo Corrientes 11

1.2 Filogenias 13

1.2.1 Sobre la elección de los caracteres 14

1.2.1.1 ¿Análisis combinados o por separado? 15

1.3 Filogenias a partir de secuencias nucleotídicas 16

1.3.1 Homología 16

1.3.2 Árboles de secuencias nucleotídicas y filogenias de organismos 17

1.3.3 Evolución de secuencias nucleotídicas 19

1.3.3.1 Restricciones funcionales 19

1.3.3.2 Sesgo en el uso de codones 20

1.3.3.3 Saturación por sustituciones múltiples 21

1.3.3.3.1 El método de Xía 23

1.3.4 Modelos de evolución molecular 24

1.3.5 Métodos de inferencia filogenética 27

1.3.5.1 *Neighbor joining* 28

1.3.5.2 Máxima parsimonia 28

1.3.5.3 Métodos bayesianos 30

1.3.6 Medidas de apoyo de los nodos 34

1.4 Filogenia del género *Ctenomys* 35

1.5 Evolución cromosómica 36

1.5.1 Evolución cromosómica en mamíferos 37

1.5.1.1 Un cambio fundamental en el paradigma sobre las causas del cambio en el número de brazos cromosómicos 43

1.5.2 Evolución cromosómica en roedores 45

1.5.3 ¿Poliploidía en mamíferos? 46

1.5.4 Evolución cromosómica en *Ctenomys* 47

1.5.5 Evolución cromosómica en el grupo Corrientes 52

1.6 ADN satélite 54

1.6.1 Evolución en concierto (y modos de evolución del ADN satélite) 56

1.6.2 ADN satélite y evolución cromosómica 58

1.6.3 Hipótesis de una biblioteca ancestral 59

1.6.4 SRPC: principal ADN satélite de los tuco-tucos 61

1.7 Propuesta, hipótesis y objetivos del trabajo 65

2 **MATERIALES Y MÉTODOS** 67

2.1 Individuos examinados 67

2.2 Preparación de las muestras para posterior extracción de ADN 70

2.3 Preparación de las muestras para análisis citogenéticos 71

2.4 Extracción y purificación de ADN genómico 71

Cuantificación del ADN 72

2.5 Electroforesis en geles de agarosa 72

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) 72

2.6.1 Diseño de cebadores específicos de SRPC 72

2.6.2 Protocolo PCR SRPC 74

2.6.3 Diseño de cebadores específicos de *loci* mitocondriales 75

2.6.4 Protocolos de amplificación por PCR *loci* mitocondriales 76

2.7 Purificación de productos de PCR 77

2.8 Secuenciación 77

2.9 Lectura de las secuencias 78

2.10 Obtención de secuencias genómicas consenso 78

2.11 Análisis de la variabilidad de los perfiles de SRPC entre y dentro de las poblaciones 79

2.12 Análisis de secuencias y búsquedas filogenéticas 80

2.12.1 Alineamiento y análisis de saturación de sustituciones 80

2.12.2 Elección de modelo de sustitución nucleotídica 81

2.13 Inferencias filogenéticas 81

2.13.1 Análisis de distancias 82

2.13.2 Análisis por máxima parsimonia 82

2.13.3 Análisis por métodos bayesianos 82

2.14 Análisis cromosómicos 83

2.14.1 Obtención de preparados cromosómicos 83

2.14.2 Tinción con Giemsa 84

2.14.3 Confección de cariogramas 84

2.15 Estimación del número de copias de SRPC por método de *dot blot* 84

2.15.1 Diseño de los experimentos 85

2.15.1.1 Curva de calibración con amplicones A y C 85

2.15.1.2 Curva de calibración con ADN genómico de una muestra conocida 86

2.15.2 Transferencia y fijación a membranas 86

2.15.2.1 Preparación de las muestras 86

2.15.2.2 Configuración de la unidad microfiltradora con bomba de vacío 86

2.15.2.3 Siembra 86

2.15.2.4 Fijación del ADN a la membrana de nylon 86

2.15.3 Obtención y marcación de sondas 87

2.15.4 Hibridación de ADN y lavados 87

2.15.5 Detección 87

2.15.6 Tratamiento de los datos 87

2.16 Análisis de aislamiento por distancia 88

3 **RESULTADOS** 89

3.1 Filogenia molecular del grupo Corrientes 89

3.1.1 La variabilidad nucleotídica es comparable entre *cyt-b*, *D-loop* y *COI* 89

3.1.2 Árboles obtenidos en base a los marcadores por separado y a la matriz concatenada 90

3.1.2.1 Las filogenias obtenidas con los marcadores por separado son congruentes entre sí 91

3.1.2.1.1 Filogenia obtenida con *D-loop* 91

3.1.2.1.2 Filogenia obtenida con *COI* 92

3.1.2.1.3 Filogenia obtenida con *cyt-b* 94

3.1.2.2 La matriz concatenada aumenta la resolución del árbol 95

3.1.2.2.1 El grupo Corrientes es monofilético. Principales linajes 97

3.1.2.2.2 ¿Las especies nominales son monofiléticas? 98

3.2 Análisis de la variabilidad cromosómica del grupo Corrientes 99

3.2.1 Curuzú Laurel 99

3.2.2 Paraje Caimán 102

3.2.3 Estancia San Luis 105

3.2.4 Mbarigüí 106

3.2.5 Paraje Sarandicito 107

3.2.6 Santa Rosa 108

3.2.7 San Roque 109

3.2.8 Chavarría 110

3.2.9 Saladas centro 111

3.2.10 Saladas Sur 112

3.2.11 Goya 114

3.2.12 Las fusiones/fisiones son el tipo de reordenamiento más frecuente en el grupo Corrientes 115

3.3 Evolución del satélite SRPC en el grupo Corrientes 116

3.3.1 Los polimorfismos intragenómicos de la secuencias de SRPC son compartidos entre los miembros del grupo Corrientes 116

3.3.2 Los sitios variables de SRPC en el grupo Corrientes solapan con los sitos variables de otros linajes de *Ctenomys* 118

3.3.2.1 No hay fijación completa de variantes y la variabilidad es menor entre poblaciones que dentro de una población: un rol menor para la conversión génica. 119

3.3.3 Un satélite activo: el número de copias de SRPC varía dentro de las poblaciones 119

3.3.4 La asociación inversa entre el número de copias y la variabilidad nucleotídica global (dentro de cada población) es explicable si éstas estaban presentes en el ancestro: hipótesis de la biblioteca ancestral 123

4 **DISCUSIÓN** 124

4.1 Filogenia mitocondrial del grupo Corrientes: monofilia del grupo y de sus poblaciones, los tres clados principales. 124

4.2 Dos poblaciones resultaron parafiléticas en la filogenia mitocondrial: ¿*sorting* incompleto o hibridación? 125

4.3 Congruencias y discrepancias entre marcadores de distinto tipo de herencia 128

4.4 Los cariomorfos del grupo Corrientes en una red de transformaciones cromosómicas mínimas 130

4.4.1 La formación de centrómeros *de novo*: un fenómeno frecuente que podría ser la causa de cambios en número fundamental en el grupo Corrientes 135

4.5 Un marco filogenético para la evolución cromosómica 136

4.6 Nuevamente, ¿*sorting* o hibridación? ¿De cariomorfos, de haplotipos mitocondriales, o de ambos? 141

4.7 El *status* taxonómico de los miembros del grupo Corrientes 147

4.8 ¿Es aplicable la metodología del "código de barras del ADN" al grupo Corrientes? 150

4.8.1 Sobre los valores umbrales para la delimitación de especies el establecimiento de niveles de divergencia inter e intraespecífico 152

4.8.2 La última palabra la tienen los árboles 153

4.8.3 Sobre la aplicación de un criterio de distancias para delimitar especies en el grupo Corrientes 154

4.9 La actividad de SRPC en genomas de una misma población: cambios de hasta un orden de magnitud en el número de copias no alteran la morfología de los cromosomas 157

4.10 La variabilidad de SRPC es compartida por todos los linajes: la hipótesis de la biblioteca ancestral 158

5 **CONCLUSIONES** 160

6 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **¡Error! Marcador no definido.**

7 **ANEXOS** 173

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Los roedores del género Ctenomys

Los tuco-tucos, también conocidos como "tunduques" o "anguyá tutús" debido a sus vocalizaciones típicas, o también llamados "ocultos" por sus hábitos furtivos, comprenden el género más especioso entre los roedores subterráneos, y también uno de los de mayor número de especies entre los mamíferos. Con más de 60 especies descriptas (Woods y Kilpatrick 2005), *Ctenomys* posee además el mayor rango de números cromosómicos (2n) conocido para un género de mamíferos, de 2n = 10 a 2n = 70 (Ortells, Contreras y Reig 1990; Cook, Anderson y Yates 1990). Los miembros de este especioso género fueron y están siendo estudiados desde diversos puntos de vista: ecofisiológico (Cutrera, Fanjul y Zenuto 2012; Tomotani *et al* 2012), sistemático (Parada *et al* 2011; D'Anatro y D'Elía 2011), paleontológico (Quintana 1994; Verzi *et al* 2010), etológico (Mastrangelo, Schleich y Zenuto 2010), cromosómico (Fernandes *et al* 2009) y genético-poblacional (Mapelli *et al* 2012) entre otros.

1.1.1 Taxonomía

Los tuco-tucos pertenecen a la familia Octodontidae (Caviomorpha) que está distribuida en el cono sur de Sudamérica. Los roedores del género *Ctenomys*, y géneros extintos relacionados, están incluidos en la subfamilia Ctenomyinae, hermana de la subfamilia Octodontinae que incluye géneros de hábitos terrestres, parcialmente subterráneos y un único género, *Spalacopus*, subterráneo estricto (Gallardo *et al* 2007). Los Ctenomyinae constituyen un grupo diferenciado a partir del Mioceno tardío, 10 M. A. (Quintana 1994; Verzi 2002), aunque la cladogénesis profusa de *Ctenomys* se ubica en el Plioceno temprano – Pleistoceno tardío, como indican el registro fósil (Reig *et al* 1990; Quintana 1994; Verzi 2002) así como estudios de reloj molecular basados en el gen mitocondrial citocromo b (Slamovits 2002a; Parada *et al* 2011).

1.1.2 Adaptaciones al ambiente subterráneo

Entre las fosoriales, las especies subterráneas se caracterizan por pasar la mayor parte de su vida bajo tierra. Las excursiones de forrajeo de los tuco-tucos suelen estar limitadas a la vecindad de las aberturas por las que salen, en un radio de 0,3-4,0 metros (Lessa *et al* 2008). Los tuco-tucos presentan una serie de adaptaciones asociadas al modo de vida subterráneo, de tipo anatómicas (óseas y dentarias principalmente) así como fisiológicas, relacionadas a las actividades de excavación y a las condiciones de hipoxia y alta presión parcial de CO_2 de las

galerías, respectivamente (Busch *et al* 1989; Reig *et al* 1990; Vassallo 1998). Sin embargo, las adaptaciones a la vida bajo tierra son menos extremas que las de los especialistas. Por ejemplo, la reducción de la cola y del tamaño de los ojos no son tan pronunciadas en *Ctenomys* como en roedores de la familia Spalacidae, o en los insectívoros de la familia Chrysochloridae o en los marsupiales de la familia Notoryctidae (Reig *et al* 1990; Borghi, Giannoni y Roig 2002). La anatomía externa e interna de los tuco-tucos es extremadamente uniforme en las distintas especies, pese a que ocupan un amplio rango de hábitats (Figura 1, ver ítem 1.1.3 en Introducción). La característica que da nombre al género son sus *ctenos*, pelos en forma de peine en las falanges distales de los miembros tanto posteriores como anteriores. Uno de los rasgos fenotípicos más variables a lo largo de las especies de tuco-tucos es el tamaño corporal cuyo menor valor lo presenta *C. pundti* con 100 gramos de peso corporal y 220 mm de largo, mientras que *C. conoveri* pesa unos 1100 gramos y mide 430 mm de largo (Reig *et al* 1990).

1.1.3 Distribución

Las más de 60 especies reconocidas de tuco-tucos se distribuyen sobre una extensa región de Sudamérica (Figura 2), desde 17°S a 54°S en latitud, y desde Los Andes hasta el Océano Atlántico, región que barre desde el sur de Perú y Brasil, la mayor parte de Paraguay y Bolivia, Uruguay, Argentina y Chile. En esta extensa área las especies de *Ctenomys* ocupan una gran variedad de hábitats, como las pampas de la Puna a más de 4000 m de altura (*C. opimus*, *C. peruanus*), las estepas de alta montaña (*C. tuconax*), hasta los valles bajos del oeste (*C. maulinus*, *C. mendocinus*), y desde las dunas de la costa atlántica al este (*C. flamarioni*, *C. australis*) o las planicies de la pampa húmeda (*C. porteousi*), hasta los desiertos o semidesiertos (*C. fulvus*, *C. knightii*); desde las áreas abiertas entre bosques tropicales (*C. sylvanus*) hasta las estepas fueguinas (*C. magellanicus*). Debido a que las galerías permanecen la mayor parte del tiempo cerradas, en el nicho subterráneo se crean condiciones microclimáticas de humedad y temperatura relativamente independientes del ambiente exterior (Reig *et al* 1990). Casi todas las especies de *Ctenomys* ocupan rangos disyuntos, siendo pocos los casos de parapatría o simpatría. La mayor parte de los autores coinciden en que la distribución de los tuco-tucos depende de dos factores principales: la presencia de suelos arenosos y la profundidad del agua freática (Contreras 1973; Reig *et al* 1990 y referencias allí citadas).

Figura 1. Tuco-tucos que ocurren en diferentes tipos de hábitat. a) *Ctenomys* sp de Estancia San Luis, Corrientes, Argentina. b) *Ctenomys opimus* del PN Laguna de los Pozuelos, Jujuy, Argentina. c) *Ctenomys torquatus* del sur de Brasil (Tomada por Jorge Maurinho, www.ufrgs.br). d) *Ctenomys* sp. de San Roque, Corrientes, Argentina. e) *Ctenomys conoveri* del PN Teniente Enciso, Departamento Boquerón, Paraguay (Tomada por Hugo del Castillo, www.faunaparaguay.com).

Figura 2. Distribución geográfica del género *Ctenomys*. El área sombreada señala la distribución del género.

1.1.4 Estructura poblacional y social

Combinadas con los factores mencionados, a saber, la composición del suelo y los niveles de agua freática, las discontinuidades en las condiciones locales de aptitud del hábitat tales como la topografía, densidad y altura de la vegetación, la calidad y disponibilidad de fuentes de alimento, determinan una distribución en parches de las poblaciones de tuco-tucos a lo largo de todo su rango de distribución (Reig *et al* 1990). La estructura poblacional de casi

todas las especies estudiadas consiste en colonias semiaisladas que ocupan ambientes favorables delimitados y separadas por grandes tramos no poblados (Reig *et al* 1990). Como la mayor parte de las especies subterráneas, los tuco-tucos son organismos solitarios (Zenuto, Vassallo y Busch 2002; El Jundi y De Freitas 2004) y tienen un comportamiento marcadamente territorial, con las madrigueras ocupadas por un único individuo, excepto por las hembras y sus crías desde el parto hasta el estadio juvenil (Cutrera, Lacey y Busch 2005; Cutrera *et al* 2006). Con excepción de las épocas de apareamiento, los adultos tienen un contacto mínimo entre sí y los individuos de ambos sexos reaccionan agresivamente frente a la presencia de un conspecífico (Busch *et al* 1989; Zenuto, Vassallo y Busch 2002). Sin embargo, existen excepciones al hábito solitario de los tuco-tucos: en *C. peruanus* los machos son solitarios, mientras que las hembras forman colonias (Reig et al. 1990); el caso más extremo lo constituye *C. sociabilis*, en cuyas madrigueras pueden hallarse simultáneamente varias hembras y en muchos casos, un macho adulto (Lacey, Braude y Wieczorek 1997).

El análisis de la variabilidad de marcadores genéticos puede revelar patrones poblacionales históricos y demográficos de una especie, como el tipo de dispersión, la vagilidad y el comportamiento sexual. Por ejemplo, a partir de un patrón de baja diversidad nucleotídica y alta diversidad haplotípica observado en poblaciones de *C. australis* en un análisis basado en secuencias de la región control mitocondrial (*D-loop*), Mora y colaboradores (2006) concluyeron que esta especie habría sufrido una expansión en su rango geográfico, a partir de una distribución pasada más acotada. En contraste, tanto *C. talarum,* especie que ocurre en simpatría con *C. australis*, así como la uruguaya *C. pearsoni* serían estables en el tamaño poblacional efectivo, según las inferencias demográficas realizadas analizando la variabilidad haplotípica de *D-loop* (Tomasco y Lessa 2007; Mora *et al* 2007).

La estructura de las poblaciones es una característica central en Biología Evolutiva, dado que implica la identificación de grupos aislados reproductivamente. Si las poblaciones están subdivididas, entonces los demos pueden evolucionar independientemente. Los demos también pueden tener una estructura completa si se produce un equilibrio entre migración y deriva. También existen las metapoblaciones, en las que en lugar de flujo génico, se producen sucesiones de extinciones y recolonizaciones en los diferentes demos. En *Ctenomys* el estudio de la genética de poblaciones ha permitido entender en profundidad la estructuración poblacional de varias especies, encontrándose en todos los casos algún nivel de estructuración geográfica, lo que es coherente con el carácter subterráneo de los tucos y su distribución

discontinua en la escala local. En un estudio basado en microsatélites donde se muestrearon poblaciones de *C. australis* distantes a un máximo de 3,8 km, Mora y colaboradores (2010) encontraron que si bien las dispersiones en distancias menores a 4 km serían frecuentes, no son suficientes como para evitar una subestructuración geográfica. El análisis genético a escala local se opone a la existencia de poblaciones grandes y continuas propuestas por Zenuto y Busch (1998) para esta especie, revelando la presencia de demos semiaislados. De la misma forma, los datos genotípicos basados en microsatélites muestran que en *C. rionegrensis* las subpoblaciones tendrían una fuerte estructuración geográfica, constituyendo unidades genéticas diferenciadas y, como ocurre con *C. australis*, no tendrían un patrón de aislamiento por distancia (Wlasiuk, Garza y Lessa 2003). Los autores de este trabajo hipotetizan que la diferenciación entre poblaciones se debería a procesos estocásticos, y no la distancia lineal entre poblaciones. Los análisis de la variabilidad en 8 *loci* microsatélites permitieron establecer que 3 subpoblaciones de la especie brasilera *C. lami* con una distancia máxima de 450 m conformarían una única unidad panmíctica (El Jundi y De Freitas 2004). En estudios basados en marcadores mitocondriales así como en microsatélites *C. talarum* y *C. porteousi* (en este caso basados sólo en microsatélites) muestran una fuerte estructuración geográfica a escala local (Cutrera, Lacey y Busch 2005; Mora *et al* 2007; Mapelli *et al* 2012).

Las características etológicas en combinación con las demográficas influyen sobre los patrones de dispersión de una especie. En estudios donde se midió la capacidad de recolonización de *C. talarum* en áreas en las que se removieron todos los tuco-tucos que las habitaban, Malizia, Zenuto y Busch (1995) encontraron que los dispersores son juveniles, mientras que los adultos permanecen en los sitios fuente. También encontraron que en demos con baja densidad poblacional los dispersores juveniles eran de ambos sexos en proporciones parejas, mientras que en demos con alta densidad poblacional los machos dispersaban más. Estos hallazgos son concordantes con el hecho de que el grado de poliginia en la especie estudiada, *C. talarum*, es variable, siendo mayor la influencia de la jerarquía de dominancia que determina el acceso a las hembras entre machos cuando la densidad poblacional es alta, produciendo consecuentemente una mayor estructuración poblacional en hembras (Cutrera, Lacey y Busch 2005), revelada ésta por el análisis de marcadores microsatélites. También en *C. flamarioni* las diferencias en densidad poblacional habrían influido sobre las diferencias en los patrones de dispersión observados entre poblaciones reflejado en una mayor estructuración por parte de las hembras (Fernández-Stolz, Stolz y Freitas 2007), mientras que en *C. sociabilis* y en *C. australis* también se reportó una dispersión de los juveniles sesgada hacia los machos

(Lacey 2001; Mora *et al* 2010). La estructura poblacional, confirmada en todas las especies de tuco-tucos estudiadas, es una condición necesaria para el establecimiento de los cariotipos diferenciados que caracterizan a la mayoría de las especies de *Ctenomys*. Si el flujo génico fuera irrestricto, la diferenciación cromosómica sería muy baja, aún si la tasa de mutación cromosómica fuera alta.

1.1.5 Variabilidad cromosómica

Desde los trabajos seminales de Osvaldo Reig (Reig y Kiblisky 1969 y referencias allí citadas) el vasto rango de heterogeneidad cromosómica descripto ha permitido comprobar que *Ctenomys* estuvo (y en algunos linajes aún está) sujeto a una al tasa de evolución cromosómica, un de las más altas entre los mamíferos. La mayoría de las 60 especies vivientes posee cariotipos exclusivos y variantes politípicas y polimórficas de los mismos, con excepción de dos grupos. El primero lo componen las especies de la puna altoandina *C. opimus*, *C. fulvus* y *C. robustus* que comparten 2n = 26 y patrones muy similares de bandas C (Gallardo 1979). La otra excepción la constituyen las especies del grupo *mendocinus*: *C. mendocinus*, *C. porteousi*, *C. australis*, *C. azarae* y *C. flamarioni* comparten el mismo 2n = 48, mientras que *C. rionegrensis*, tiene 2n = 50 (Massarini *et al* 1991; De Freitas 1994; Massarini y De Freitas 2005). El resto de las especies presentan cariotipos exclusivos, con un rango, como se mencionó que va de 2n=10 a 70. Esta altísima variabilidad cariotípica ha llevado a postular tempranamente que *Ctenomys* es un ejemplo de especiación cromosómica y que esta multiplicidad de formas cromosómicas entre especies implicaría la ocurrencia también de variabilidad a nivel intra e interpoblacional (Reig y Kiblisky 1969). Dentro de los límites de una especie se pueden encontrar politipismos o polimorfismos cromosómicos como en el caso de *C. pearsoni*, con cariotipos que oscilan entre 2n = 56 y 2n = 70 (Tomasco y Lessa 2007). Otro grupo donde existe un alto grado de variabilidad cromosómica en un complejo de especies y formas es el llamado grupo Corrientes, que constituye el objeto de estudio de este trabajo.

1.1.6 El grupo Corrientes

Limitada por el río Paraná al norte y al oeste, por el río Uruguay al este, por el río Guayquiraró y el arroyo Mocoretá al sur, la provincia de Corrientes actualmente comprende un territorio cuyo perímetro está casi completamente demarcado por cuerpos de agua. Estos cursos acuáticos conectan con un sistema de esteros, bañados y lagunas que ocupan una gran proporción del territorio correntino, entre los que se cuentan los Esteros del Batel, el Estero de Santa Lucía y los Esteros del Iberá: un humedal de más de 12.000 km^2 localizado en la región

centro-norte de la provincia (Figura 14). Estos sistemas acuáticos reciben aportes periódicos de agua subterránea y pluvial que llegan a cubrir, parcial o totalmente, las lomas y planicies arenosas entre las que se intercalan (Contreras 1988). Estos sitios de suelos arenosos son aptos para el establecimiento de poblaciones de tuco-tucos, cuya distribución actual ocupa las porciones central y occidental de la provincia de Corrientes (Figura 14), pero su proximidad a los cuerpos acuáticos hace de esta región un hábitat inestable temporal y espacialmente.

Se han descripto unas 39 poblaciones de tuco-tucos en la provincia de Corrientes (Contreras *et al* 1985), algunas de las cuales han sido originalmente atribuidas a las especies: *C. roigi*, *C. dorbignyi* y *C. perrensi*; aunque la mayor parte de estas poblaciones poseen un *status* taxonómico indefinido, llamadas *Ctenomys* sp debido a esta condición. Al conjunto total de especies y formas de esta región se lo ha llamado "grupo Corrientes" en los trabajos seminales en este grupo (Ortells, Contreras y Reig 1990). La alta variabilidad cariotípica registrada en este grupo, principalmente dada por variaciones en el número diploide, que ocurren en el rango de 2n = 41 a 2n = 70, se da mayoritariamente a nivel interpoblacional mediante reordenamientos complejos; pero también hay muchas poblaciones que presentan polimorfismos cromosómicos debidos a fusiones céntricas (Ortells, Contreras y Reig 1990; Reig *et al* 1992; Ortells y Barrantes 1994; García *et al* 2000ab; Argüelles *et al* 2001; Giménez *et al* 2002; Lanzone *et al* 2007). La alta frecuencia de polimorfismos y politipismos cromosómicos indicaría que la evolución cromosómica es un proceso activo y recurrente en el grupo Corrientes.

Una de las tres especies nominales del grupo Corrientes, *Ctenomys dorbignyi*, tiene una distribución disyunta con poblaciones situadas en los extremos norte y sur de Corrientes, como también en la provincia de Entre Ríos (Ortells, Contreras y Reig 1990). La segunda especie en cuanto a la amplitud de su área de distribución es *Ctenomys perrensi* localizada el sector centro-occidental de la provincia, restringiéndose su descripción a tres poblaciones: Colonia 3 de Abril, Goya y Rincón de Ambrosio (Ortells, Contreras y Reig 1990; Giménez *et al* 2002). En una región de unos pocos km^2 se encuentra distribuido *Ctenomys roigi*, al noroeste de la provincia, especie descripta en 2 poblaciones: Costa Mansión y Colonia Brougnes (Ortells, Contreras y Reig 1990). Las localidades tipo de *C. dorbignyi*, *C. perrensi* y *C. roigi* son Mbarigüí (en la región boreal de la provincia), Goya y Costa Mansión, respectivamente (Ortells, Contreras y Reig 1990). Exceptuando *C. dorbignyi* el resto de las poblaciones de las especies nominales no fueron analizadas citogenéticamente o fue publicado únicamente el número

diploide y número fundamental (NF) (Ortells, Contreras y Reig 1990; Giménez *et al* 2002) (ver Tabla 1).

Las poblaciones de *Ctenomys* sp tienen números diploides distintos de las poblaciones adscriptas a las especies nominales, cuyos 2n son constantes a nivel inter e intrapoblacional: *C. perrensi*, 2n=50, NF 84; *C. roigi*, 2n=48, NF=80; *C. dorbignyi*, 2n=70, NF=84. En esta última especie, Argüelles y colaboradores (2001) publican un NF=88, hallado únicamente en la provincia de Entre Ríos, pero en los cariogramas respectivos se pueden contar sólo 84. Las 20 poblaciones caracterizadas desde el punto de vista citogenético que conforman el complejo *Ctenomys* sp. poseen números fundamentales en el rango de 76-84 (Ortells, Contreras y Reig 1990; Reig *et al* 1992; Ortells y Barrantes 1994; Argüelles *et al* 2001; Giménez *et al* 2002; Lanzone *et al* 2007; Jablonski 2011). Si bien se ha publicado el número de cromosomas y de brazos de la mayor parte de las poblaciones del grupo Corrientes, no todas presentan fotografías de los cariomorfos, es decir que no hay registro de cariogramas o metafases en los que se pueda constatar los 2n y NF publicados y observar la morfología (Tabla 1).

	Población	**Número diploide**	**Número fundamental**	**Fuente**
C. roigi	Colonia Brougnes	48	80	Giménez *et al* 2002
	Costa Mansión	48	80	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Lanzone *et al* 2007, Giménez *et al* 2002
	Estancia San Luis	?		
C. perrensi	**Goya**	50	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Giménez *et al* 2002
	Colonia 3 de Abril	50	84	Giménez *et al* 2002
	Rincón de Ambrosio	50	84	Giménez *et al* 2002

C. dorbignyi	**Mbarigüí**	70	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, **Argüelles *et al* 2001**, Giménez *et al* 2002, Lanzone *et al* 2007
	Paraje Angostura	70	84	Lanzone *et al* 2007
	Paraje Sarandicito	70	84	**Argüelles *et al* 2001**, Giménez *et al* 2002
Ctenomys sp.	Estancia La Tacuarita	42	76	Giménez *et al* 2002
	Contreras Cué	41-42	76	Giménez *et al* 2002
	Curuzú Laurel	42	76	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Lanzone *et al* 2007, Giménez *et al* 2002
	Loreto	42	76	Giménez *et al* 2002
	San Miguel	44	76	Lanzone *et al* 2007, Giménez *et al* 2002
	Paraje Caimán	46-47	78	Giménez *et al* 2002
	Manantiales	?		
	Mburucuyá	58	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**
	Estancia Rosarito	51-52	80	Lanzone *et al* 2007
	Loma Alta	?		
	Pago Alegre	56	84	Giménez *et al* 2002, Lanzone *et al* 2007
	Ruta Saladas-Mburucuyá Km 10-12	54-58	84	Giménez *et al* 2002
	Pago de los deseos Km 10	56	84	Lanzone *et al* 2007

	Ruta Saladas-Mburucuyá Km7	54-56-58	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Giménez *et al* 2002
	Paraje Santo Domingo	54-55	82	Lanzone *et al* 2007
	Saladas	54-55	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Giménez *et al* 2002, Lanzone *et al* 2007
	Saladas Km Sur	?		
	Santa Rosa	65-66	84	Giménez *et al* 2002, Lanzone *et al* 2007
	San Roque	62	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**, Giménez *et al* 2002
	MF Mantilla	62	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**
	Chavarría	58	84	Giménez *et al* 2002, Lanzone *et al* 2007
	Yataytí-Calle	53-54	84	**Ortells, Contreras y Reig 1990**

Tabla 1. Información cariotípica de las poblaciones los tuco-tucos del grupo Corrientes publicada hasta la actualidad. Las fuentes bibliográficas que presentan un cariograma del cariotipo descripto se resaltan con negritas. Los signos de interrogación (?) simbolizan las poblaciones para las que no se cuenta con información cariotípica.

1.1.6.1 Filogenia del grupo Corrientes

La filogenia obtenida por Parada y colaboradores (2011) es un marco tentativo para analizar la posición a grandes rasgos de los miembros del grupo Corrientes en el contexto de la filogenia del género. Esta filogenia, basada en citocromo b, permitió identificar grupos de especies y formas pero no la relación entre ellos. Los 4 miembros del grupo Corrientes incorporados en el trabajo de Parada y colaboradores (2011) quedan todos incluidos en el

grupo *torquatus*, un grupo con bajos valores de soporte y sin relación clara con los demás grupos de *Ctenomys*. En este grupo se encuentran representantes de *C. torquatus*, *C. pearsoni*, *C. lami*, *C. minutus*. Los cuatro representantes del grupo Corrientes no forman un grupo monofilético, son parafiléticos con respecto a *C. pearsoni*, y sí forman un grupo monofilético tomados todos en conjunto con este último taxón. Contrariamente, en el trabajo de Fernandes y colaboradores (2009) los haplotipos de citocromo b del grupo Corrientes, forman un grupo monofilético, hermano a *C. pearsoni*, y el clado que los agrupa resulta hermano a *C. torquatus*.

También se realizaron aproximaciones por métodos de distancia basados en alozimas (Ortells y Barrantes 1994) o en secuencias de citocromo b (Giménez *et al* 2002), así como análisis por máxima parsimonia (Mascheretti *et al* 2000) pero en todos los casos los resultados fueron poco resolutivos, y además se incluyeron sólo algunos representantes de las especies y formas caracterizadas en el grupo, y tampoco se incluyó más de un individuo por población para probar la monofilia de los taxones. Es significativo destacar que en estas filogenias las especies nominales del grupo Corrientes resultan polifiléticas.

El estudio de las especies y formas de *Ctenomys* del grupo Corrientes plantea varios desafíos: asignar las poblaciones a las especies descriptas o (o a nuevas especies o formas), describir de manera comprehensiva el escenario de evolución cromosómica en el grupo y evaluar la influencia de la variabilidad ancestral y de procesos recientes en los patrones de diferenciación genética y cromosómica. Estos aspectos se solapan parcialmente, por lo que es necesario integrar diferentes aproximaciones al problema. La dificultad en el establecimiento de los límites de especies y poblaciones reside en la baja diferenciación genética que existe entre las poblaciones en relación a la diferenciación intrapoblacional (Ortells y Barrantes 1994; Mirol *et al* 2010). De todos modos es difícil establecer si la causa de esta baja diferenciación genética entre poblaciones se debe a la ausencia de fijación de variantes ancestrales o a la ocurrencia de flujo génico entre ellas (Mirol et al 2010). Establecer la delimitación de especies y linajes, las posibles hibridaciones e introgresiones pasadas o actuales, no sólo es un marco de referencia interesante desde un punto de vista teórico, sino que resulta central para diseñar estrategias de manejo de la biodiversidad en áreas naturales protegidas de la provincia de Corrientes, como el Parque Nacional Mburucuyá, en la Reserva Provincial Esteros del Iberá, y en otras áreas naturales protegidas de la provincia de Corrientes.

1.2 Filogenias

Durante siglos los naturalistas han estudiado la diversidad en el mundo vivo. La sistemática fue la disciplina resultante del esfuerzo por la búsqueda de las causas del origen y la descripción e interpretación de la diversidad de formas vivas. Linneo en 1758 formalizó un sistema de nomenclatura jerárquico y estableció un marco teórico para esta disciplina. Sin embargo, el sistema linneano era independiente de la biología evolutiva y, más aún, los primeros evolucionistas como Buffon se opusieron a dicho sistema por mostrar ribetes del esencialismo aristotélico (Moritz y Hillis 1996).

La hipótesis de un origen único de los organismos vivientes y la idea de una asociación histórica entre ancestros y descendientes a partir de ese primer organismo fueron postuladas por Darwin en El origen de las especies, en 1859. El origen monofilético del mundo vivo y su evolución en el tiempo fueron representados entonces como un árbol de raíz única y ramas que se separaban en dos o más ramas a partir de nodos comunes. La representación de las hipótesis sobre las relaciones entre los organismos es lo que se conoce como árbol filogenético. Darwin, Lamarck y Haeckel cooptaron el sistema linneano para producir una clasificación basada en las relaciones filogenéticas. Así, la teoría evolutiva comenzaba a inmiscuirse en los sistemas de clasificación del mundo vivo dando luz a la subdisciplina de la sistemática conocida como taxonomía evolutiva o filogenética (sistema de clasificación basado en árboles filogenéticos).

Inicialmente la taxonomía no se basaba en la aplicación de métodos formales que incorporaran el estudio de la variación de caracteres dentro de un grupo de organismos. Entre las décadas de 1930-1960 se desarrollaron métodos explícitos para hipotetizar relaciones filogenéticas y ponerlas a prueba. A partir de esas aproximaciones surgen las tres principales escuelas taxonómicas. El cladismo, cuyo fundador fuera el entomólogo alemán Willi Henning, plantea que la verdadera genealogía de un grupo de organismos es la que se obtiene a partir de las sinapomorfías, o caracteres derivados compartidos, a diferencia de los caracteres ancestrales compartidos o plesiomorfías, que no dan información acerca de las relaciones dentro de ese grupo de organismos. El feneticismo se basa en un criterio de similitud global en comparaciones entre pares de taxones, sin hacer distinción entre los caracteres. Si bien estos agrupamientos no representan necesariamente genealogías, la escuela feneticista sostiene que el análisis de un gran número de caracteres producirá agrupamientos confiables que reflejen las relaciones de parentesco. La taxonomía evolutiva, fundada por Ernst Mayr,

combina elementos de las dos primeras escuelas mencionadas: esta forma de clasificación busca reflejar tanto la ancestralidad común (principal preocupación del cladismo) así como el grado de cambio entre un taxón y su ancestro. Esta escuela critica al cladismo puro ya que las especies podrían ser tomadas como más similares de lo que realmente son, dado que aunque sean hermanos dos taxones pueden haber acumulado muchas diferencias a lo largo de sus linajes.

1.2.1 Sobre la elección de los caracteres

Se ha debatido durante décadas acerca de la conveniencia de los caracteres moleculares sobre los morfológicos y viceversa, aunque ambos tipos de carácter pueden tener ventajas y desventajas relativas (como la plasticidad fenotípica en el caso de los caracteres morfológicos, o las sustituciones múltiples en el de las secuencias nucleotídicas). Los estudios que incorporen datos moleculares y morfológicos podrían proveer mejores descripciones e interpretaciones de la diversidad biológica que aquéllos que se centren en sólo una aproximación, aunque sería necesario decidir cómo se combinarán los datos, cuestión que se discutirá más abajo. Sin embargo, existen situaciones en las que sólo se puede contar con uno de ambos tipos de carácter. Por ejemplo, cuando se cuenta con fósiles antiguos únicamente se puede trabajar con caracteres morfológicos, y en otro extremo, cuando el grupo de organismos a estudiar posee una variación morfológica limitada, sólo se pueden utilizar caracteres moleculares.

En el último cuarto del siglo XX se desarrollaron técnicas para obtener secuencias aminoacídicas, polimorfismos en largos de fragmentos de restricción (RFLPs) y secuencias nucleotídicas que pueden todas ser utilizadas para inferir filogenias. El presente trabajo se basa en el análisis a nivel específico/infraespecífico, razón por la cual la utilización de caracteres de evolución rápida es crucial para obtener variación de los caracteres. Los genomas de organelas son ideales para este nivel de análisis dado que son pequeños, fáciles de estudiar (existen muchas copias por célula) y tienen tasas de sustitución altas, particularmente en mamíferos (Avise 1994).

El genoma mitocondrial de los mamíferos es una molécula circular, de doble cadena de unas 15.000-17.000 pb de largo. Contiene mayoritariamente secuencias únicas: 13 genes que codifican proteínas, 2 genes de ARN ribosomal, 22 genes de ARNts, y una región control que contiene sitios para la replicación y la regulación de la transcripción. La tasa de sustitución sinónima (sin cambio aminoacídico) en los genes mitocondriales de mamíferos ha sido

estimada en 5,7 10^{-8} sustituciones/sitio por año; esto es unas 10 veces el valor de sustituciones sinónimas de genes nucleares codificantes de proteínas. Las sustituciones no sinónimas en genes mitocondriales tienen tasas variables, pero siempre mayores que las de los genes nucleares (Li 1997). La alta tasa de sustitución del ADN mitocondrial permite inferir relaciones filogenéticas entre organismos de divergencias menores a 15 M.A., e incluso puede generar señal filogenética a nivel poblacional en períodos muy cortos de tiempo. La herencia de tipo clonal matrilineal es una característica útil de este tipo de marcador ya que la ausencia de recombinación permite una apropiada representación en un único árbol en la historia de una especie (este supuesto no siempre se cumple, como lo discuten Galtier y colaboradores, 2009).

En esta tesis se obtuvieron secuencias parciales de 3 marcadores mitocondriales: citocromo oxidasa I (COI), citocromo b (cyt-b) y la región control. En la gran mayoría de los mamíferos el gen cyt-b tiene 1140 pb de largo y codifica para una proteína de 379 aminoácidos y 8 pasos transmembrana que forma parte del complejo III del sistema de fosforilación oxidativa, situado entre la membrana interna y la matriz mitocondrial (Irwin, Kocher y Wilson 1991). La región control es el *locus* que concentra la mayor tasa de evolución del genoma mitocondrial. Esta región, que es no codificante, contiene en su dominio central una zona altamente conservada, conocida como *D-loop*, flanqueado por dos dominios hipervariables (Brown *et al* 1986). El gen de citocromo oxidasa I, de alrededor de 1540 pb de largo, codifica para la subunidad mayor del polipéptido citocromo oxidasa. Este complejo está involucrado tanto en el transporte de electrones como en la traslocación asociada de protones a través de la membrana, y la subunidad I posee una gran variedad de dominios funcionales, incluyendo sitios de unión a ligandos, componentes del canal de protones, estructuras α-hélices y bucles hidrofílicos (Lunt *et al* 1996). Estos dominios funcionales se encuentran intercalados con regiones mucho más relajadas desde el punto de vista selectivo y, por lo tanto, más variables a nivel nucleotídico, lo que le confiere a este marcador la posibilidad de ofrecer señal filogenética en distintos niveles taxonómicos.

1.2.1.1 ¿Análisis combinados o por separado?

Aún cuando se trabaja únicamente con secuencias nucleotídicas surge el interrogante acerca de cómo combinar datos de *loci* diferentes. Existen tres criterios de tratamiento de datos provenientes de fuentes distintas (*loci* diferentes, datos morfológicos y moleculares). El primero, usualmente conocido como evidencia total, consiste en combinar en cualquier análisis todas las matrices de caracteres independientemente del tipo que se trate. Este

criterio se opone al de análisis por separado, en el que lo conjuntos de datos se utilizan en inferencias filogenéticas independientes y los árboles resultantes son posteriormente combinados utilizando árboles consenso. La tercera aproximación, conocida como combinación condicional, propone adoptar la combinación de datos salvo que se evidencie un conflicto significativo entre ellos. Como se dijo en el apartado anterior, en esta tesis se analizan tres marcadores mitocondriales, que se encuentran por lo tanto ligados y tienen el mismo modo de herencia. Se adoptó entonces un criterio de combinación condicional, analizando las topologías de los árboles obtenidos con los marcadores por separado, evaluando el grado de conflicto entre ellos, y combinándolos en caso de no presentar incongruencias.

1.3 Filogenias a partir de secuencias nucleotídicas

En las últimas décadas el uso ampliamente difundido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido obtener grandes conjuntos de datos de secuencias nucleotídicas de regiones génicas y no génicas, susceptibles a ser incorporadas en análisis filogenéticos. Las secuencias nucleotídicas pueden ser analizadas mediante los mismos métodos de inferencia filogenética que los demás caracteres moleculares e incluso los morfológicos, pero poseen particularidades en cuanto a la descripción formal de su evolución. Estos aspectos serán abordados en esta sección.

1.3.1 Homología

La homología entre caracteres implica que su similitud se debe a la ancestralidad común de las secuencias comparadas. Existen varios tipos de homología de secuencias nucleotídicas que merecen ser distinguidas. La ortología implica la ancestralidad común de dos secuencias que divergieron al separarse los linajes que las contienen. Una filogenia basada en secuencias ortólogas debería reflejar las relaciones entre los organismos involucrados, debido a que los linajes más emparentados tendrán secuencias más similares (o mayor número de sinapomorfías) entre sí que con respecto a los de divergencia más antigua. La paralogía, en cambio, es el producto de eventos como la duplicación génica, por lo que la ancestralidad común de secuencias parálogas se remonta a la duplicación del gen que puede no coincidir con la divergencia de los organismos, es decir con la cladogénesis. Existe una tercera categoría de homología de secuencias que refiere a las secuencias adquiridas por transferencia horizontal (*via* retrovirus, por ejemplo), y no del ancestro que se la denomina xenología.

Es de fundamental importancia la distinción entre los distintos tipos de homología dado que sólo las secuencias ortólogas son las que pueden reflejar las relaciones filogenéticas en un grupo de organismos. Cuando se amplifican secuencias nucleotídicas, génicas o no génicas, vía PCR existe el riesgo de amplificar pseudogenes o secuencias parálogas, por lo que deben tomarse recaudos como constatar que las secuencias obtenidas sean de lectura inequívoca, que los productos de PCR resulten en una banda única del tamaño esperado, que los cebadores sean lo suficientemente largos como para aumentar la especificidad, etc.

Existe otro tipo de homología que debe ser abordada al comparar secuencias aún cuando se constate su ortología. Los eventos de inserción/deleción pueden alterar la homología posicional de los sitios nucleotídicos individuales. El establecimiento de homologías *a priori* en el análisis de secuencias nucleotídicas consiste en el alineamiento múltiple de las secuencias involucradas. Este paso es determinante en las hipótesis filogenéticas resultantes, dado que establece los caracteres que serán comparados.

La contraparte de la homología es la homoplasia, que es el parecido entre caracteres ya no por ancestralidad común sino producto de reversiones, paralelismos o convergencias evolutivas. Estas son homologías *a priori*, que se revelan como homoplasias al mapearse en una filogenia (agrupan taxones que no forman grupos monofiléticos), mientras que las homologías *a posteriori* son aquellas que no contradicen los agrupamientos que la filogenia propone.

1.3.2 Árboles de secuencias nucleotídicas y filogenias de organismos

Aún asumiendo que las secuencias comparadas son homólogas, los árboles de secuencias y la divergencia organísmica pueden diferir a causa de la retención de polimorfismos ancestrales (segregación al azar de polimorfismos ancestrales o su anglicismo *lineage sorting*, ver Figura 3), o por la reticulación entre poblaciones (flujo génico) o especies (hibridación) (Avise, 2004). En el caso de los genomas de organelas este punto es de particular importancia ya que al no haber recombinación los efectos de la reticulación pueden ser mantenidos por muchas generaciones, e incluso fijarse produciendo incongruencia entre el árbol de organismos y el de secuencias.

Las relaciones entre linajes de secuencias nucleotídicas de dos poblaciones que divergieron a partir de un reservorio común están sujetas a la siguiente progresión temporal: polifilia, parafilia y finalmente monofilia recíproca. La tasa a la que este proceso ocurre

depende de la estructuración geográfica de la variabilidad, los procesos demográficos dentro de cada población, y sobre todo del tamaño poblacional efectivo (N_e, es el número de individuos de una población ideal teórica en que la tasa de cambio por deriva -medida como la tasa de pérdida de heterocigosidad- fuera la misma que la observada en la población real). El proceso de fijación de una variante lleva aproximadamente $4N_e$ generaciones y el N_e es dependiente del tipo de herencia del marcador. Los marcadores de herencia uniparental (en mamíferos, los del cromosoma Y y los mitocondriales) tienen un N_e de aproximadamente ¼ del N_e de *loci* autosómicos. Cuando las poblaciones/especies quedan aisladas reproductivamente se pueden producir fenómenos de *sorting* o repartición al azar de los haplotipos (o alelos). El *sorting* puede ser incompleto, caso en el cual una de las poblaciones o especies retiene un polimorfismo, y se evidencia por el carácter parafilético de dicha población (Figura 3, intervalo t1-t2). En cambio, el *sorting* diferencial implica la fijación de haplotipos/alelos en las poblaciones, fenómeno que se manifiesta en la incongruencia de las filogenias obtenidas con marcadores de *loci* no ligados (Figura 3, intervalo t2-presente).

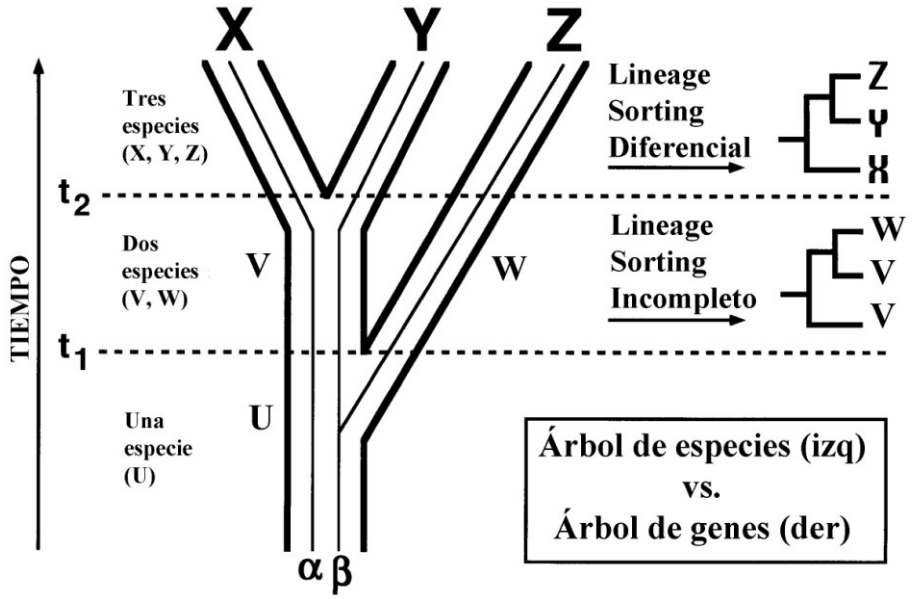


Figura 3. Procesos de *lineage sorting* que resultan en árboles de secuencias diferentes al de los organismos. Izquierda: las líneas gruesas trazan el árbol de organismos; las líneas delgadas trazan los linajes genéticos (α y β) coexistentes en una unidad reproductivamente aislada (población o especie). Derecha: árboles de secuencias inferidos en los intervalos de tiempo t1-t2 y t2-presente. En t1, una población/especie derivada de X, portadora de un único linaje genético (β), queda aislada reproductivamente y deviene en el taxón Z. Sin embargo la población/especie X retiene ambos linajes genéticos (α y β) a lo largo del internodo subsiguiente. A causa del *lineage sorting* incompleto un

muestreo de este marcador en el intervalo t1-t2 resulta en un árbol que produce patrón parafilético, e incorrecto, de la población/especie X. En t2, se produce una segunda divergencia a partir de X y deviene en el taxón Y. Nuevamente, el patrón de relaciones entre linajes genéticos es discordante con la filogenia organísmica. Sin embargo, en este caso, el *lineage sorting* es completo (también llamado *lineage sorting* diferencial): la fijación al azar de haplotipos/alelos (no se muestra) lleva a la monofilia alélica dentro de cada taxón descendiente y en consecuencia genera un árbol filogenético sin un patrón parafilético, aunque no es congruente con el árbol organísmico (Tomado de Tosi, Morales y Melnick 2003).

1.3.3 Evolución de secuencias nucleotídicas

En el tratamiento de secuencias nucleotídicas los algoritmos de inferencia filogenética desarrollados debieron incorporar descripciones matemáticas del proceso de cambio de las secuencias en el tiempo. Estas descripciones, conocidas como modelos de evolución molecular, permiten establecer parámetros de sustitución de las secuencias que pueden variar según la posición, de acuerdo al tipo de cambio nucleótido, según la disponibilidad de nucleótidos en el medio celular, etc. A continuación se describirán algunos de los factores que pueden alterar la constancia de la tasa mutacional a lo largo de una secuencia, o entre diferentes linajes.

1.3.3.1 Restricciones funcionales

La mayor parte de las regiones no codificantes suelen evolucionar a una tasa mucho más altas que las codificantes. Esto se debe a que su evolución sería neutra (o casi neutra), es decir que no estaría sujeta a presión de selección, por lo que acumularía sustituciones al azar. Por el contrario, las regiones sujetas a presión de selección podrán mutar con la misma frecuencia que las neutrales pero, si el cambio afectara negativamente al *fitness* del individuo, estas variantes tendrían menos chances de permanecer a través de las generaciones y desaparecerían de la historia de un linaje.

Sin embargo, a lo largo de una secuencia codificante no es homogénea la presión de selección. Las distintas posiciones dentro de un codón pueden tener tasas de sustitución diferentes, y esto se debe a la degeneración del código genético. Las mutaciones sinónimas, que no alteran el aminoácido resultante de su traducción, tendrían menores restricciones mutacionales que las no sinónimas. Por ejemplo, la mitad de las 3ras posiciones del codón son 4 veces degeneradas (no importando el nucleótido que la componga, queda determinado el mismo aminoácido), mientras que ninguna de las 2das posiciones del codón están

degeneradas. Los análisis de secuencias nucleotídicas han demostrado que esta predicción se cumple en la mayor parte de los genes. En los genes de globina, por ejemplo, las 3ras posiciones de los codones evolucionan aproximadamente 3 veces más rápido que las primeras posiciones (Page y Holmes 1998).

1.3.3.2 Sesgo en el uso de codones

La degeneración en el código genético implica que la mayor parte de los aminoácidos pueden ser especificados por un cierto número de combinaciones de tripletes nucleotídicos. La hipótesis nula es que todos los codones para un aminoácido en particular son utilizados con igual frecuencia. Esto fue refutado al encontrarse en un espectro amplio de especies que existía un sesgo marcado hacia el uso de algunos codones y no de otros (Page y Holmes 1998). Dos modelos principales han sido propuestos para explicar el uso de codones, los relacionados con la traducción (o selectivos) y el modelo mutacional (o neutra).

En el primer caso, se ha postulado una co-adaptación entre el uso de codones sinónimos y la abundancia de ARNts que optimizaría la eficiencia de la traducción, basado en la correlación entre el uso de codones y la expresión génica (Wong *et al* 2010). Esta correlación fue hallada en *Saccharomyces cerevisiae*, y se ha propuesto que las preferencias de codón reflejan la estabilidad de las interacciones codón-anticodón. Se ha propuesto que en los estadios latentes del virus de Epstein-Barr, el uso de codones se altera produciendo una traducción más ineficiente, de modo de no competir con la traducción de la célula huésped, y el uso de codones del virus del papiloma parece optimizar la expresión en ciertos tipos celulares. Adicionalmente, se han propuesto ajustes de la cinética de la traducción en el virus de la polio, y el de la hepatitis A.

El modelo mutacional postula que las limitaciones en la composición de los nucleótidos del ADN en el medio celular influyen en la probabilidad del tipo de mutación, y ha sido propuesto en trabajos basados en decenas de virus. Sin embargo, cabe señalar que estos modelos no son mutuamente excluyentes.

De hecho, existen evidencias que en *Escherichia coli*, organismo en el que la selección traduccional ha sido demostrada, los codones subóptimos pueden ser mantenidos debido a presiones de selección que entran en conflicto (por ejemplo, la selección de motivos de unión a los ribosomas en el comienzo de los genes) (Duret 2002). En genes eucariotas, algunos elementos regulatorios involucrados en el *splicing* o en la estabilidad de los ARNm se localizan

en los exones. La necesidad de una regulación de la expresión apropiada podría limitar la evolución de secuencias codificantes también en genomas de mamíferos (Duret 2002).

1.3.3.3 Saturación por sustituciones múltiples

La medida más simple del cambio evolutivo ocurrido entre dos secuencias nucleotídicas consiste en el recuento del número de sitios en que el par de secuencias difiere. Esta medida es llamada distancia genética. Sin embargo, esta estimación del cambio evolutivo vale únicamente para secuencias muy relacionadas, pues si un mismo sitio hubiera acumulado sustituciones múltiples, estas no serían computadas, por lo que la distancia genética entre las dos secuencias sería subestimada. A medida que pasa el tiempo el número de diferencias entre dos secuencias se vuelve menos preciso como estimador del número real de sustituciones que ocurrieron desde que esas dos secuencias divergieron de un ancestro común. Por consiguiente, la relación entre la distancia genética y el tiempo de divergencia no es lineal sino que se curva debido a la ocurrencia de múltiples sustituciones en un mismo sitio (Figura 4). Este fenómeno es conocido como saturación por sustituciones múltiples, y cuando la saturación es completa, la señal filogenética queda borrada; las secuencias ya no son informativas acerca del proceso evolutivo subyacente. La Figura 4 muestra la relación entre el número de diferencias nucleotídicas observadas y el tiempo de divergencia en secuencias del gen mitocondrial COII de bóvidos (vacas, búfalos, y linajes emparentados) y se distinguen dos tipos de sustitución; las transiciones, cambios purina-purina o pirimidina-pirimidina, y las transversiones, cambios purina-pirimidina. Se observa que las transversiones, al ser menos frecuentes que las transiciones tienen una relación lineal entre la distancia genética y el tiempo de divergencia. Por el contrario, las transiciones llegan a saturar. Los modelos de evolución molecular son también llamados métodos de corrección de distancia; su meta es corregir las distancias observadas estimando la cantidad de cambio evolutivo que se esperaría en ausencia de saturación (y de otros fenómenos, como el sesgo en el uso de codones, o las diferencias en las frecuencias nucleotídicas, que apartan la distancia genética de la linealidad).

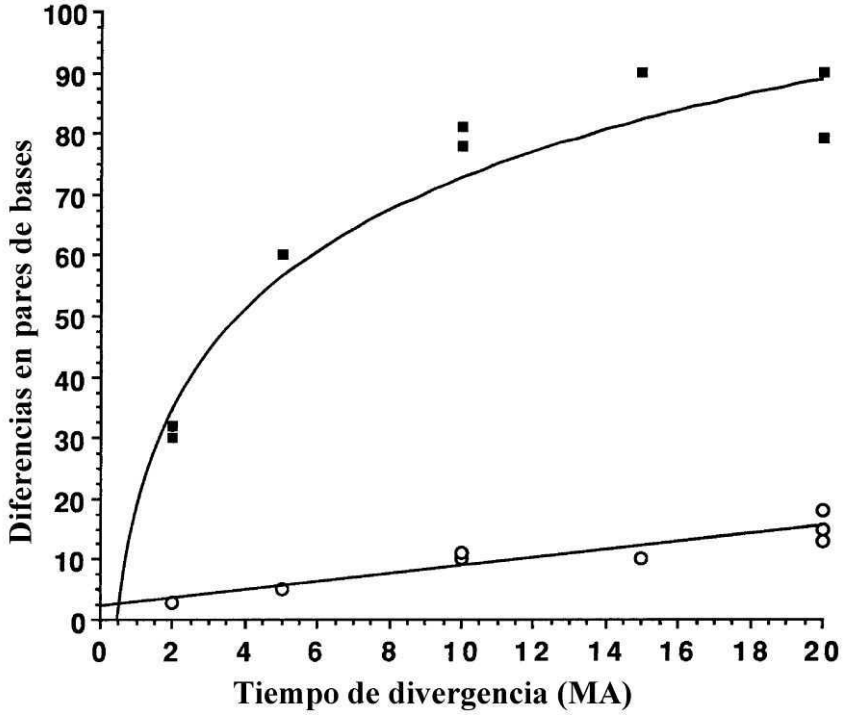


Figura 4. Número de sustituciones nucleotídicas entre pares de secuencias mitocondriales bovinas (684 pb del gen COII) en función del tiempo de divergencia estimado. El número observado de sustituciones totales (cuadrados) no es lineal, sino curvilíneo, dado que a mayores tiempos de divergencia se alcanza la saturación. Esta saturación se alcanza antes en las transiciones (más frecuentes) y esto queda evidenciado cuando se grafican únicamente las transversiones (círculos), que se acumulan de forma lineal con el tiempo de divergencia. Tomado de Janecek *et al* 1996.

Existen métodos para estimar el grado de saturación de las secuencias de modo establecer un umbral de saturación, más allá del cual las secuencias se consideran no informativas por haber sufrido múltiples sustituciones. Uno de estos métodos es el desarrollado por Xia y colaboradores (2003), fue utilizado en este trabajo, y se detallará a continuación.

1.3.3.3.1 El método de Xía

El método de Xia y colaboradores (2003) para medir saturación de sustituciones se basa en el concepto de entropía (*H*) tomado de la teoría de la información. Para un conjunto de *N* secuencias alineadas de largo *L*, la entropía en el sitio *i* es:

$$H_i = -\left(\sum_{j=1}^{4} p_j \log_2 p_j\right) \quad \textbf{(1-1)}$$

Donde *j* = 1, 2, 3, 4 correspondiendo a los nucleótidos A, C, G y T, y p_j es la proporción del nucleótido j en el sitio *i*. El valor máximo de H_i es 2 cuando las frecuencias nucleotídicas en el sitio *i* son representadas en igual frecuencia (0,25). La media y la varianza de *H* para el total de sitios *L* son:

$$\overline{H} = \frac{\sum_{i=1}^{L} H_i}{L}, \quad Var(H) = \frac{\sum_{i=1}^{L} (H_i - \overline{H})^2}{L-1} \quad \textbf{(1-2)}$$

Si una secuencia ha sufrido una saturación completa, entonces las frecuencias nucleotídicas esperadas en cada sitio serán iguales a las frecuencias globales P_A, P_C, P_G, y P_T. La distribución de las frecuencias nucleotídicas en cada sitio sigue la distribución multinomial de $(P_A + P_C + P_G + P_T)^N$, y la media y la varianza en caso de saturación completa son:

$$H_{FSS} = -\left(\sum_{N_A=0}^{N}\sum_{N_C=0}^{N}\sum_{N_G=0}^{N}\sum_{N_T=0}^{N} \frac{N!}{N_A!N_C!N_G!N_T!} P_A^{N_A} P_C^{N_C} P_G^{N_G} P_T^{N_T} \sum_{j=1}^{4} p_j \log_2 p_j\right) \quad \textbf{(1-3)}$$

$$Var(H_{FSS}) = \sum_{N_A=0}^{N}\sum_{N_C=0}^{N}\sum_{N_G=0}^{N}\sum_{N_T=0}^{N} \frac{N!}{N_A!N_C!N_G!N_T!} P_A^{N_A} P_C^{N_C} P_G^{N_G} P_T^{N_T} \left(\sum_{j=1}^{4} p_j \log_2 p_j - H_{FSS}\right)^2 \quad \textbf{(1-4)}$$

Teóricamente una prueba de saturación de sustituciones nucleotídicas podría realizarse evaluando si el valor de entropía observada $\overline{H}$ es significativamente menor al de entropía esperada H_{FSS}. Si $\overline{H}$ no resultara significativamente menor que H_{FSS} entonces las secuencias habrían sufrido una saturación severa. El índice de saturación (I_{SS}) compara la entropía observada ($\overline{H}$) con la entropía esperada (H_{FSS}) y queda definido como:

$$I_{ss} = \overline{\mathrm{H}}/\mathrm{H}_{\mathrm{FSS}} \qquad \textbf{(1-5)}$$

Debido a que la topología del árbol va a estar sensiblemente distorsionada antes de que se alcance la saturación completa ($\overline{H}$ / H_{FSS} = 1) este estimador se debe significar con un valor crítico ($I_{SS.C}$) a partir del cual las secuencias comenzarían a fallar en la recuperación de la topología verdadera. El valor crítico $I_{SS.C}$, obtenido por simulaciones (Xia *et al* 2003), depende de parámetros como el largo de las secuencias, el número de secuencias y de la simetría de la topología.

1.3.4 Modelos de evolución molecular

Como se mencionó anteriormente, los métodos de reconstrucción filogenética asumen modelos de evolución molecular que pretenden corregir las distancias genéticas observadas teniendo en cuenta el tipo de sustitución y la naturaleza de la secuencia o del sitio del que se trate.

Los métodos basados en probabilidades utilizan modelos interrelacionados que difieren básicamente en el número de parámetros que incluyen. Los parámetros que pueden modelarse son tres generales: la tasa de sustitución instantánea promedio, la tasa de mutación de una base a otra, y la frecuencia de cada uno de los nucleótidos en la totalidad de la secuencia. Estos modelos asumen cuatro supuestos básicos:

- las tasas de sustitución son constantes en el tiempo,
- las frecuencias nucleotídicas están en equilibrio (son estacionarias, no cambia la composición de A, C, T y G a lo largo del tiempo),

  y

- los sitios mutan independientemente.

A partir de la especificación de las probabilidades de los distintos tipos de sustitución nucleotídica y las frecuencias nucleotídicas esperadas, una plétora de modelos pueden ser, y han sido, generados. Algunos de ellos, los más frecuentemente utilizados, se resumen en la Figura 5 a fines de ejemplificar la combinación de parámetros libres y fijos en cada modelo. Por ejemplo, en el modelo Jukes-Cantor (JC), estos parámetros son equivalentes para todos los

tipos de sustitución y para las frecuencias de las 4 bases. En el modelo de Kimura (K2P) se asumen distintas tasas de transiciones y transversiones, mientras que las frecuencias nucleotídicas se asumen iguales para las 4 bases. A la inversa, el modelo de Felsenstein (F81) supone diferencias en las frecuencias nucleotídicas (lo que determina, a su vez, que unas sustituciones sean más probables que otras), pero asume iguales las tasas de transición y transversión (Ts=Tv). El modelo de Hasegawa, Kishino y Yano combina los modelos K2P y F81. Por último, el modelo conocido como General Time Reversible (GTR) tiene seis parámetros, tal que cada sustitución tiene su propia probabilidad.

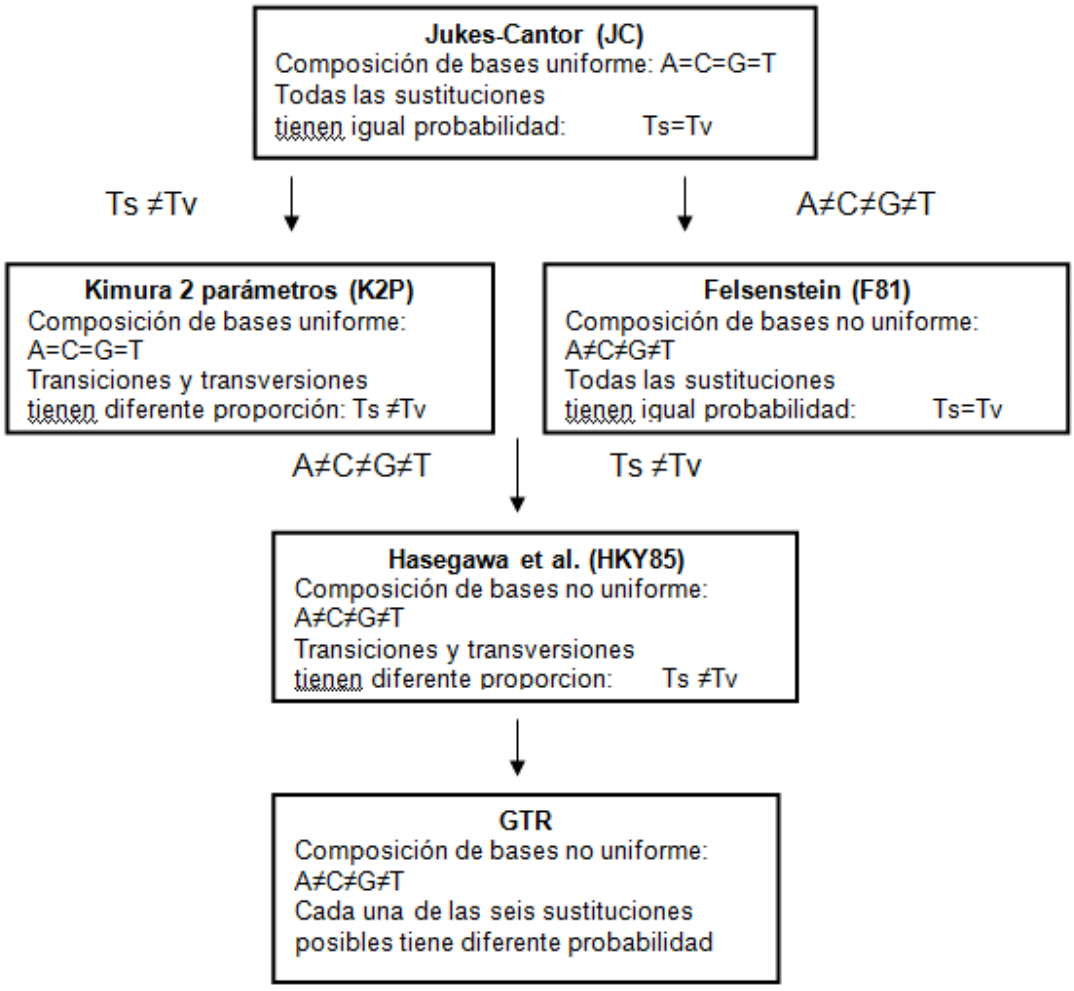


Figura 5. Cinco modelos utilizados para estimar el número de sustituciones nucleotídicas entre 2 secuencias de ADN. Los modelos JC, K2P, F81 y HKY85 pueden ser generados al dejar fijos parámetros del modelo GTR (modificado de Page y Holmes 1998).

Ahora bien, estos y muchos otros modelos han sido desarrollados para estimar las distancias genéticas entre secuencias nucleotídicas, pero debe adoptarse un criterio para elegir el mejor modelo. El criterio más utilizado sugiere que el mejor modelo es aquél que explica, con menor cantidad de parámetros libres, los datos de partida. La conveniencia de elegir el modelo con menor número de parámetros se basa en que la inclusión de parámetros aumenta la incertidumbre en las estimaciones y así se pierde la potencia estadística del método. Para la comparación entre modelos se suele utilizar su verosimilitud, que es una función de probabilidad (logarítmica, pues los valores suelen ser bajos) de obtener los datos observados, utilizando un modelo determinado.

Los modelos de evolución molecular para calcular distancias genéticas descriptos anteriormente hacen distintas suposiciones sobre la probabilidad de las sustituciones entre diferentes nucleótidos, pero asumen que todos los sitios en una secuencia tienen igual probabilidad de sufrir una sustitución. Este supuesto simplifica el cálculo, pero es poco realista desde un punto de vista biológico: las distintas regiones del ADN tienen distintas probabilidades de mutación (pueden tener la misma tasa de sustitución instantánea, pero por restricciones selectivas algunas serán eliminadas). Por ejemplo, las restricciones funcionales o el sesgo en el uso de codones (tratadas en los ítems 1.3.3.1 y 1.3.3.2 de la Introducción, respectivamente) pueden generar tasas de sustitución muy diferentes entre sitios. Para modelar las tasas de sustitución entre sitios se utiliza un ajuste a una función de distribución gamma. Esta distribución tiene un parámetro de forma α, que especifica el rango de variación en las tasas de sustitución entre sitios (Figura 6).

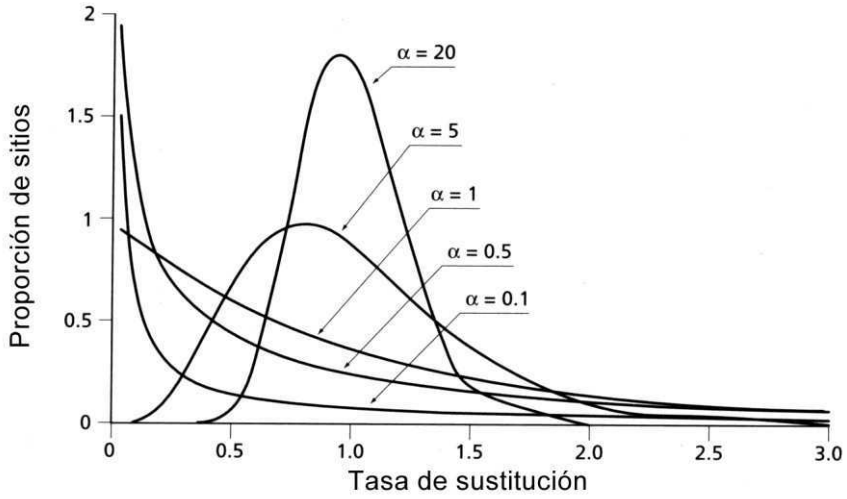


Figura 6. La distribución de las tasas de sustitución relativas correspondientes a diferentes valores del parámetro de forma **α**. Los valores bajos de α generan una amplia variación de tasas (α<1), donde la mayoría de los sitios son invariables y unos pocos tienen altas tasas de sustitución. El rango de variación de tasas disminuye con el aumento de α, que al tender a infinito se corresponde con una única tasa de sustitución.

Otro parámetro que modela la heterogeneidad en las tasas de evolución entre sitios de una secuencia es la proporción de sitios invariantes (**I**). Este parámetro estima la proporción de sitios con tasa de sustitución instantánea nula y se puede utilizar junto con el ajuste a la distribución gamma, o por separado. En una aproximación combinada, la proporción de sitios invariantes viene dado por el valor de I, mientras que los demás sitios varían de acuerdo con la distribución gamma.

1.3.5 Métodos de inferencia filogenética

Los métodos de inferencia filogenética tienen por objeto la representación gráfica de agrupamientos de taxones generados por un algoritmo matemático. Los agrupamientos generados por estos métodos, los árboles filogenéticos, son estructuras sin raíz, es decir que no poseen polaridad temporal. La relación ancestro-descendientes es determinada por el investigador, generalmente mediante el uso de uno o más grupos externos, que son taxones que se suponen ajenos al grupo en cuestión pero, a su vez, lo más relacionados posible, de modo que se maximice el número de homologías a comparar. Algunos de los métodos siguen un criterio de optimización, que es una medida del ajuste del árbol propuesto al conjunto de datos con que se obtuvo. Un método basado en un criterio de optimización permite comparar distintos árboles y elegir aquél que se ajuste mejor a los datos.

A continuación, se presentará una breve descripción de los tres métodos ampliamente utilizados actualmente en los estudios de filogenia molecular y que se han empleado en este estudio: *neighbor-joining* (NJ), máxima parsimonia (MP) y métodos bayesianos (MB).

1.3.5.1 Neighbor joining

El método del vecino más próximo o *neighbor joining* (NJ) es uno de los algoritmos más ampliamente utilizados para la construcción de árboles, y combina la velocidad computacional con la unicidad del resultado (Saitou y Nei 1987). Este es un método de agrupamiento basado en una matriz de distancias y carece de un criterio de optimización y, por lo tanto, no permite hacer comparaciones de ajuste entre árboles y datos. La matriz de distancias genéticas puede ser obtenida utilizando un modelo de evolución molecular como K2P, F81, GTR o cualquier otro. A partir de un árbol en estrella, el método genera un primer agrupamiento de dos taxones tal que se minimice la distancia global (las distancias son calculadas en base a la matriz de distancias de a pares obtenidas con el modelo de evolución molecular elegido). Una vez fijado el primer agrupamiento, y considerado a éste como un único taxón, se vuelve a buscar el segundo agrupamiento que minimice la distancia global de este segundo árbol. Así, mediante la comparación de a pares y la unión sucesiva de taxones, se obtiene una única –e incontrastable- topología por matriz de caracteres.

Este método ha sido criticado, no solo por carecer de criterio de optimización, sino también por la pérdida de información que se produce al operar con una matriz de distancias como *input* y no con las secuencias nucleotídicas. Además, los métodos de distancia no contemplan diferentes tasas de sustitución entre sitios, hecho que los vuelve poco realistas en relación a la evolución de las secuencias nucleotídicas. La ventaja de estos métodos reside en la rapidez con que es posible procesar los datos y, dado que no supone constancia en la evolución, los largos de rama resultan proporcionales al número de cambios.

1.3.5.2 Máxima parsimonia

Este conjunto de metodologías tiene su origen en la escuela cladista y se basa en el supuesto de que la hipótesis filogenética que comprenda el menor número de cambios será la que mejor refleje la filogenia real. Cuando la inferencia filogenética se basa en secuencias nucleotídicas, cada sitio permite generar un agrupamiento que involucre el menor número de pasos (sustituciones). El número total de cambios evolutivos en un árbol (su longitud) es

calculado como la suma de los cambios en cada sitio, y el árbol de mejor ajuste es el de menor longitud.

Bajo el criterio de máxima parsimonia (MP) se pueden establecer modelos de evolución molecular, pero no compararlos mediante un criterio de máxima verosimilitud. Además de las secuencias alineadas, se pueden incluir matrices de costos de transformación que permiten asignar valores a todos los tipos de sustitución nucleotídica, haciendo que unas sean más penalizadas que otras y, por lo tanto, de ocurrir, aumentarían proporcionalmente más el largo del árbol. También se pueden establecer distintos pesos, si el investigador decide dar más importancia a ciertos sitios. Por ejemplo, se puede dar mayor peso a los cambios en 1ra y 2da posición de los codones, por ser menos frecuentes; o análogamente, se puede asignar bajos pesos a los sitios con mayor probabilidad de alcanzar saturación, como las 3ras posiciones de los codones o las regiones no codificantes.

El método de búsqueda por máxima parsimonia implica evaluar el largo (pasos mutacionales) de todas las topologías posibles y elegir la más parsimoniosa. Esto tiene una limitante numérica que radica en el altísimo número de topologías posibles resultante de la combinatoria de muchos taxa. A partir de los 10 taxones no es operativo explicitar todas las topologías y debe aplicarse una metodología de búsqueda heurística que consiste en la generación de árboles al azar, utilizados como punto de partida y su posterior optimización mediante algoritmos de corte y empalme de ramas (Swofford *et al* 1996). Si bien existe, la probabilidad de no hallar el árbol más parsimonioso suele ser bastante baja gracias a la potencia de los algoritmos de búsqueda heurística. A menudo se encuentran más de un árbol de máxima parsimonia, es decir con igual número de cambios, por lo que el árbol resultante es un consenso del conjunto de árboles más parsimoniosos.

El criterio de máxima parsimonia ha sufrido diversas críticas relativas a la información resultante de su aplicación, así como a su capacidad de reflejar procesos biológicos, y también en relación con los posibles sesgos según los caracteres que se utilicen (y nivel taxonómico de estudio). Una de las críticas es la que se le hace al cladismo y subyace en que los árboles obtenidos por máxima parsimonia sólo ofrecen información acerca del orden de divergencia, y no dicen nada sobre la cantidad de cambio evolutivo ocurrido en las ramas del árbol. Otra crítica a la máxima parsimonia se centra en el supuesto que esta metodología hace respecto a que los cambios evolutivos serían raros. La baja frecuencia de los cambios implica que el árbol que minimiza los cambios es la mejor estima de la filogenia real. La crítica metodológica más

fuerte que ha recibido la máxima parsimonia es el efecto de la llamada atracción por ramas largas. Esto se produce cuando las tasas de evolución son marcadamente diferentes entre ramas. El método de MP tendería a reunir a aquellas ramas del árbol que habrían acumulado una gran cantidad de sustituciones (ramas "largas") aún cuando no estuviesen relacionadas. Esto ocurriría porque, al haber sólo 4 estados de carácter, las ramas largas pueden sufrir mutaciones convergentes y acabar agrupadas en un análisis por parsimonia. La solución a este problema consiste en incluir en los análisis todos los taxones que comprende el grupo de interés, pues la adición de taxones puede acortar esas ramas permitiendo agrupamientos intermedios. También la atracción por ramas largas puede ser evaluada en la comparación de árboles resultantes de aplicar distintas metodologías además de máxima parsimonia.

1.3.5.3 Métodos bayesianos

Thomas Bayes en 1763 enunció un teorema, que hoy lleva su nombre, basado en la probabilidad condicional y expresa la probabilidad de un evento aleatorio A dado B en términos de la distribución de probabilidad condicional del evento B dado A y la distribución de probabilidad marginal de sólo A. Esta función de probabilidad se muestra en la ecuación 1-6 donde $P(A_i)$ son las probabilidades *a priori* de A_i sucesos exhaustivos y mutuamente excluyentes; $P(B|A_i)$ son las probabilidades condicionales de un suceso B dado A_i; y $P(A_i|B)$ es la probabilidad *a posteriori* de A_i, que viene dada por la distribución de probabilidades *a priori* y las condicionales.

$$P(A_i|B) = \frac{P(B|A_i)P(A_i)}{P(B)} \qquad \textbf{(1-6)}$$

En el caso del análisis de secuencias nucleotídicas por métodos de inferencia filogenética basados en la estadística bayesiana los datos dados, o *a priori*, involucran los parámetros del modelo de sustitución (M, detallados en el ítem 1.3.4 de la Introducción), el parámetro de topologías (τ) y el largo de las ramas (v, que es una medida del cambio evolutivo acumulado). Estos parámetros están contenidos en θ, mientras que X corresponde a la matriz de secuencias nucleotídicas alineadas (ecuación 1-7).

$$f(\theta|X) = \frac{f(\theta)\, f(X|\theta)}{f(X)}$$

(1-7)

La probabilidad posterior de un árbol τ se puede obtener a partir de la probabilidad *a priori* de τ mediante el cálculo de su verosimilitud, que es (el logaritmo de) la suma del producto de las probabilidades de reconstrucción de nodos internos para una dada topología (todos los estados que pueden tomar), y para todos los sitios (el total de la matriz X), teniendo en cuenta el modelo de evolución (M) y el largo de ramas (v). Concretamente, si para un nodo dado, la probabilidad de A tiende a 1, el resultado de la multiplicación de esa probabilidad por las de C, G y T dará un número muy bajo, indicando que la verosimilitud de ese nodo es alta (ya que se aplica un logaritmo a ese producto). Por el contrario, si fuesen las 4 bases equiprobables para ese nodo, entonces el producto sería mayor, y su logaritmo (su verosimilitud) menor. Además, para cada topología, y modelo de evolución dado, existe un largo de ramas tal que maximice su verosimilitud, es decir, el ajuste de los datos X al modelo de evolución molecular establecido. La probabilidad posterior de cada topología se calcula obteniendo sus marginales, lo que implica integrar los valores de verosimilitud que producen todos los largos de rama y valores de parámetros del modelo de evolución posibles. Entonces la probabilidad posterior f(θ|X) se puede interpretar como la probabilidad de que el árbol τ es el correcto, dados los datos. Habitualmente todas las topologías son consideradas inicialmente equiprobables, lo que implica partir de una distribución de probabilidades "llana".

La probabilidad posterior máxima en relación al universo total de árboles suele ser muy baja, por lo que el objetivo de esta metodología no es encontrar el árbol de mayor probabilidad posterior, sino tomar una muestra de árboles que concentren la mayor probabilidad posterior. Esa muestra es procesada para obtener un único árbol consenso en cuyos nodos internos se indica la probabilidad posterior que reúne la muestra.

Al igual que bajo el criterio de máxima parsimonia, surge como inconveniente la imposibilidad de explicitar todas las topologías dables, para integrarlas en todos los largos de rama y parámetros posibles del modelo dado. Entonces, para proponer árboles candidatos a reflejar la verdadera filogenia en un grupo, debe aplicarse un método de búsqueda heurística. La heurística en métodos bayesianos se basa en el muestreo de Montecarlo basado en Cadenas de Markov (MCMC). El proceso de MCMC se puede resumir en 4 pasos básicos:

1) Empezar en un punto arbitrario θ (largo de ramas y topología)

2) Hacer una pequeña variación de los parámetros, θ*

3) Calcular la relación *r*= f(θ*|X) / f(θ|X)

   r>1: se acepta θ*

   r<1: el nuevo estado θ* se acepta con probabilidad *r*, o se descarta si *r* es muy chico y se mantiene θ

4) Volver al paso 2

Para buscar en el espacio total de árboles, las modificaciones topológicas se realizan utilizando métodos de corte y empalme de ramas como NNI (*nearest neighbor interchange*), SPR (*subtree prune and regraft*) y TBR (*tree bisection and reattachment*), los mismos utilizados en búsquedas por máxima parsimonia y máxima verosimilitud. Estas metodologías se implementan acopladas a un método que propone modificaciones en el largo de ramas y en los valores que adoptan los parámetros del modelo evolutivo propuesto.

Como se parte de árboles propuestos al azar, en las primeras generaciones de una cadena (iteraciones del proceso MCMC) se obtienen topologías de verosimilitud varios órdenes de magnitud mayor que el árbol -y largo de ramas- de partida. A esta fase de las iteraciones se la conoce como período de *burn-in*, que se puede pensar como un escalado constante de optimización. Las topologías correspondientes al *burn-in* son descartadas por tener muy bajos valores de probabilidad posterior y ser muy dependientes de la topología de partida (Figura 7). Luego de este período las cadenas alcanzan una fase estacionaria, en la que los valores de verosimilitud alcanzan un *plateau* y este es un signo de haberse alcanzado la distribución de interés (el conjunto de árboles que concentra la mayor probabilidad posterior).

Para llegar al árbol consenso de la búsqueda, y por razones de limitación de memoria, se debe tomar una muestra representativa de la distribución posterior (excluye las generaciones de *burn-in).* Para tal fin es conveniente, considerando los valores de M y v, muestrear árboles lo más separados en número de generaciones posible de modo de no tomar árboles muy relacionados entre sí.

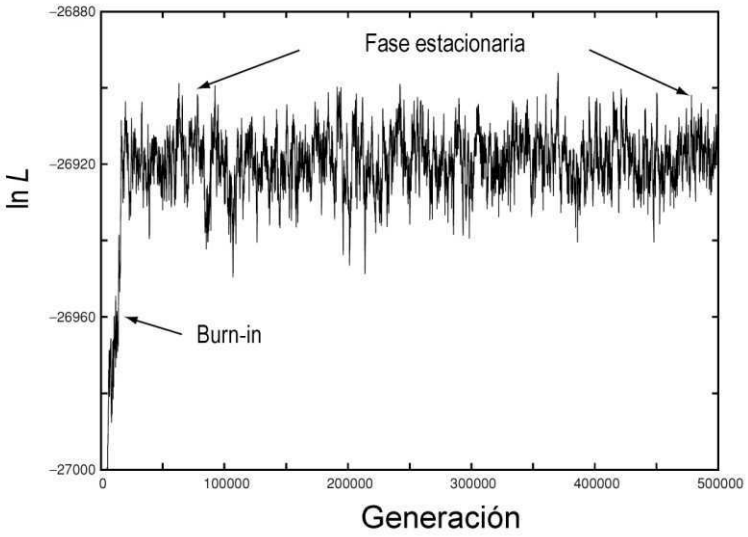


Figura 7. Valores de verosimilitud en función del número de generaciones en una cadena MCMC. Se parte de un árbol muy alejado de las regiones en el espacio de parámetros que concentran valores altos de probabilidad posterior. La fase de *burn-in* se corresponde con la etapa inicial de la corrida en la que el árbol de partida es constantemente mejorado hasta que llega a un rango tope y la cadena converge hacia la distribución de interés, en la que los valores de verosimilitud alcanzan un *plateau*. (Tomado de Ronquist, van der Mark y Huelsenbeck 2009).

Si los parámetros de búsqueda (principalmente, la velocidad con la que la cadena cubre distintas regiones del espacio de parámetros) son apropiados, las cadenas convergen siempre a la región de árboles. Para medir la calidad de la convergencia en la distribución de topologías se suele calcular el desvío estándar de los *splits* (biparticiones del conjunto de taxones) entre cadenas corridas independientemente. Una comparación similar de desvíos entre corridas diferentes se hace para estimar la convergencia de los demás parámetros (M y ν) pero consiste en comparar la varianza dentro y entre corridas (es mayor la varianza entre cadenas que no alcanzaran la convergencia, mientras que serían similares entre cadenas que estén muestreando de la misma distribución). Para asegurar un barrido amplio de las distintas regiones del espacio de parámetros (τ, M y ν), y una convergencia adecuada, se utiliza una variante de MCMC llamada muestreo de Montecarlo basado en cadenas de Markov acopladas a Metropolis (MC^3), que consiste en correr varias cadenas MCMC en paralelo. Una de ellas es llamada cadena "fría" y es aquella a partir de la cual se realizan las inferencias filogenéticas. Las demás cadenas, llamadas cadenas "calientes", pueden recorrer el espacio de parámetros de una forma más ágil que la cadena "fría" (que puede variar los parámetros en menor medida, por lo que propone en una generación topologías, largos de rama y valores del

modelo muy relacionados con los de la generación anterior). Las cadenas "calientes" pueden intercambiarse con la cadena fría si encontraran un espacio de parámetros concentrando mayor probabilidad posterior. Estas cadenas "calientes" actúan "alisando" el espacio de parámetros, de modo que permiten que la cadena "fría" pueda llegar a regiones que de otra forma no sería posible, por tener que atravesar "valles" profundos en el paisaje de la distribución de probabilidades original.

1.3.6 Medidas de apoyo de los nodos

Una de las causas de una inferencia filogenética incorrecta es la propia matriz de caracteres. Si el conjunto de datos contiene homoplasias, distintos caracteres apoyarán distintos árboles, por lo tanto el árbol resultante dependerá de qué caracteres hayan sido analizados. En consecuencia, las filogenias basadas en muestreos deben ir acompañadas de medidas de apoyo de los nodos que reflejen el error de muestreo de caracteres.

Bajo los criterios de máxima parsimonia y métodos de distancias se utiliza usualmente el método de *bootstrap*, que consiste en generar pseudorréplicas de la matriz de datos. Cada pseudorréplica se construye eliminando al azar caracteres y duplicando (o multiplicando por n, enteros) otros caracteres, de manera que el número de caracteres N de la matriz original se mantiene. Con cada pseudorréplica se inicia una búsqueda filogenética independiente, obteniéndose el o los árboles de menor distancia o menor número de pasos (según se trate de NJ o MP). A partir del conjunto de árboles de *bootstrap* se realiza un consenso de mayoría, de modo tal que en cada nodo figura el porcentaje de pseudorréplicas en las que ese grupo aparece.

El método de *bootstrap* puede ignorar grupos claramente definidos por la matriz de caracteres y carentes de homoplasia. Mientras que un alto valor de *bootstrap* indica que el grupo en cuestión tiene una alta proporción de caracteres que lo apoyan y bajos niveles de homoplasia, los grupos apoyados por una baja proporción caracteres (para los que incluso no exista carácter alguno que los contradiga) tendrán una representación baja en las pseudorréplicas generadas al azar y, por lo tanto, no tendrán altos valores de *bootstrap*. El criterio consensuado es que cuando un nodo tiene valores de *bootstrap* menores a 70⁄ , el nodo no se considera soportado y en el consenso de mayoría los taxones se representan colapsados en una politomía.

La estimación del error de muestreo está contemplada en el propio algoritmo de búsqueda por métodos bayesianos, como se detalló en la sección 1.3.5.3. A partir de la distribución posterior de árboles se puede tener un rango de largos de rama, así como la proporción de árboles muestreados en la distribución posterior que apoyan cada nodo del árbol consenso resultante.

1.4 Filogenia del género Ctenomys

La notable diversidad de especies y formas de tuco-tucos ha animado a los investigadores, desde muy temprano, a realizar numerosos intentos para obtener una clasificación de entidades infragenéricas tales como subgéneros, secciones y obviamente especies de *Ctenomys*. Mucho se ha discutido acerca del número de especies de *Ctenomys*, y hasta fines de la década de 1960 esa clasificación estaba basada en caracteres morfológicos como el tamaño corporal, el color del pelaje y la morfología craneana (autores como Tate, Rusconi, Ellerman y Cabrera, en Reig y Kiblisky 1969). Reig y Kiblisky (1969)utilizarían los cariotipos como fuente para la clasificación en muchas especies crípticas desde el punto de vista morfológico. Más adelante estudios basados en la morfología peneana (Altuna y Lessa 1985; Balbontin, Reig y Moreno 1996), en frecuencias alozímicas (Sage *et al* 1986; Ortells y Barrantes 1994), en la morfología espermática (Feito y Gallardo 1982; Vitullo, Roldán y Merani 1988) así como en la distribución geográfica tomada como un marco histórico de la radiación de los tuco-tucos (Contreras y Bidau 1999) propusieron diferentes subdivisiones del género, que formaban clasificaciones con un alto grado de conflicto recíproco.

La primera hipótesis filogenética en *Ctenomys* fue realizada en un estudio de coevolución entre tuco-tucos y un grupo de nematodes parásitos (Gardner y Duszynski 1990). Este primer estudio filogenético estaba basado en caracteres morfológicos y cariotípicos (número diploide y número fundamental) e incluía solo unas pocas especies argentinas y bolivianas. Posteriormente, Cook y Yates (1994) propondrían filogenias de especies bolivianas basadas en la variación en los patrones electroforéticos de alozimas, y Ortells (1995)propondría una filogenia en base al patrón de bandas G de algunas especies argentinas. En una etapa posterior se realizarían inferencias filogenéticas incluyendo especies argentinas, chilenas, bolivianas, brasileñas y uruguayas, basadas en secuencias de ADN como citocromo b (Lessa y Cook 1998; D'Elía, Lessa y Cook 1999; Mascheretti *et al* 2000; Slamovits *et al* 2001; Parada *et al* 2011), así como en introns de genes nucleares (Castillo, Cortinas y Lessa 2005). La cobertura taxonómica de estos estudios ha sido bastante pobre en relación al número de

especies reconocidas para el género, siendo menos de la mitad incluidas en todos los estudios salvo por el de Parada y colaboradores (2011) en el que se incluyeron representantes de 38 especies y 12 formas indeterminadas. Una modificación metodológica de crucial importancia en estudios filogenéticos que aportó el trabajo de Parada y colaboradores (2011) fue la de incluir más de un individuo por especie o forma de modo de poner a prueba la monofilia de estos taxones (aunque no lo hicieron para el total de las especies y formas analizadas). En su conjunto, los estudios basados en citocromo b permitieron definir los principales grupos de especies dentro del género, no obstante las relaciones entre ellos permanecen irresueltas, cayendo estos grupos en una politomía cerca de la base del árbol. A partir de estos resultados se discutió si el patrón tipo estrella de la filogenia de *Ctenomys* se debía a una politomía blanda (carácter dependiente) o dura (taxón dependiente). La fuerte señal filogenética debajo y por encima de la politomía (Lessa y Cook 1998) así como un patrón politómico también hallado en la filogenia basada en intrones (Castillo, Cortinas y Lessa 2005) sugieren que la radiación de los tuco-tucos habría sido virtualmente explosiva, reforzando la hipótesis de una politomía dura en la base del árbol.

1.5 Evolución cromosómica

Tras el descubrimiento de poblaciones naturales de *Drosophila pseudobscura* con numerosos reordenamientos cromosómicos constituyendo polimorfismos y politipismos, Theodosius Dobzhansky sostuvo que se trataba de una evidencia crucial para la teoría de la evolución por selección natural de Darwin ya que los reordenamientos cromosómicos podían ser las materias primas para la evolución, permitiendo que las poblaciones evolucionen rápidamente frente a variaciones en las condiciones ambientales (Coghlan *et al* 2005). Al trabajo de Dobzhansky se le sumaría un prolífico cuerpo de contribuciones en citogenética que darían sustento a la idea de que los reordenamientos cromosómicos en eucariotas serían muy frecuentes a nivel interespecífico, pero también en el nivel intraespecífico e incluso en el poblacional. Estos reordenamientos pueden implicar mecanismos y resultados genómicos diferentes, y entre ellos se cuentan las deleciones, inversiones, fusiones y fisiones, translocaciones hibridación, y duplicaciones parciales y hasta de genomas completos (poliploidización).

1.5.1 Evolución cromosómica en mamíferos

La complejidad de reordenamientos cromosómicos descriptos en los mamíferos fue *in crescendo* a medida que se desarrollaron nuevas técnicas que permitieron tener múltiples niveles de resolución para interpretar cambios cromosómicos a gran, mediana y pequeña escala.

En una fase inicial se publicaron los cariotipos de cientos de especies de mamíferos, incluyendo el número diploide, el número de brazos cromosómicos, la longitud relativa y morfología de cromosomas, la presencia de cromosomas extranumerarios o cromosomas B, y los cromosomas sexuales. El rango de números diploides en los mamíferos quedó acotado entre 2n=6-7 en el muntjac indio *Muntiacus muntjak* (hembra-macho, respectivamente) y 2n=102 en la rata vizcacha colorada *Tympanoctomys barrerae* (Ferguson-Smith y Trifonov 2007).

En una segunda etapa se desarrollaron técnicas de bandeo cromosómico, siendo los bandeos C, G y R los más ampliamente utilizados. Los métodos de bandeo G y R producen un patrón característico de bandas transversales claras y oscuras en los cromosomas. Estos bandeos hicieron posible la identificación de segmentos homólogos y reordenamientos cromosómicos específicos. Los cariotipos bandeados de unas 850 especies fueron incluidos en el Atlas de Cromosomas de Mamíferos (O'Brien, Menninger y Nash 2006).

Una fuente importante de variabilidad cariotípica en mamíferos está relacionada a la cantidad y localización de heterocromatina. La heterocromatina es frecuentemente detectable mediante la técnica de bandeo C y desde los primeros estudios en los que se la aplicó se han encontrado grandes variaciones en bloques heterocromáticos que en algunos casos podían llegar a conformar nuevos brazos cromosómicos enteros, alterando así el número fundamental de una especie. Asimismo, se ha probado que no toda la heterocromatina, formada por secuencias repetitivas de diferente composición, es revelable por bandeo C. La cantidad de heterocromatina puede alcanzar hasta un 33% del ADN nuclear en especies de *Dipodomys*, 36% en *Peromyscus*, 42% en *Ammospermophilus* y 60% en *Thomomys*, todos géneros de roedores (Graphodatsky, Trifonov y Stanyon 2011), variación que afecta al valor C (contenido de ADN por genoma haploide) cuyo mínimo valor en dicho orden es el de *Thomomys monticola* con 2,17 pg por genoma haploide, mientras *Tympanoctomys barrerae* tiene 16,8 pg por genoma haploide, siendo este el mayor valor entre todos los mamíferos (Graphodatsky 2007; Gregory 2012).

En citogenética comparativa la homología cromosómica entre especies (homeología) fue propuesta sobre la base de las similitudes en los patrones de bandeo. Las especies cercanamente emparentadas tienen usualmente patrones de bandeo muy similares, y puede generalizarse que la divergencia cariotípica en la mayor parte de los grupos taxonómicos refleja sus relaciones filogenéticas, aunque existen excepciones considerables (Graphodatsky 2007).

El siguiente paso fue la incorporación de técnicas de hibridación *in situ* al análisis cromosómico. Ahora la homología podía establecerse a nivel del ADN de una forma precisa, mediante la hibridación con sondas de ADN de distintos tamaños, desde secuencias parciales de genes hasta fragmentos cromosómicos clonados en BACs (cromosoma bacteriano artificial), YACs (cromosoma artificial de levaduras) o cromosomas enteros microdisecados. La técnica de pintado cromosómico (ZooFISH) tuvo un amplio impacto en la citogenética comparada. Esta metodología consiste en marcar separadamente cromosomas enteros de una especie determinada para hibridarlos con preparaciones metafásicas de otra especie. El pintado cromosómico permitió establecer de forma rápida y eficiente la distribución de regiones homólogas entre especies y así trazar el escenario de posibles reordenamientos ocurridos en los mamíferos. La comparación de mapas generados por ZooFISH de distintos órdenes de mamíferos permitió caracterizar los tipos de reordenamiento más frecuentes y los ritmos de evolución cromosómica en los diferentes linajes. El mapeo con BACs fue utilizado para establecer la relación entre los cromosomas X de los ornitorrincos (*Ornithorhynchus anatinus*) y varias regiones en cromosomas humanos y de pollo. La hembra del ornitorrinco tiene 5 pares de cromosomas X, mientras que el macho tiene cinco X y cinco Y, ninguno de los cuales tiene homología con el sistema XX-XY ya sea de marsupiales o placentarios. El mapeo con BACs reveló que existen varios genes ortólogos de genes del cromosoma sexual Z de pollo en los cromosomas X1 y X3 del ornitorrinco, que en humano mapean en los autosomas 5 y 9 (Rens *et al* 2007). Mientras que genes ortólogos a los situados en el cromosoma X humano, en ornitorrinco mapean en autosomas (Ferguson-Smith y Trifonov 2007), demostrando que los cromosomas sexuales del ornitorrinco tendrían un origen diferente al de los terios.

El pintado cromosómico permitió establecer homología a nivel cualitativo, con una resolución de unas 4 Mb (Ferguson-Smith y Trifonov 2007) que está limitada por el tamaño de las regiones visualizadas por microscopía, y en consecuencia hay reordenamientos pequeños que no son detectables por este método. Más aún, mediante esta metodología tampoco es

posible detectar inversiones que involucren grandes segmentos. Otra limitante es que el pintado cromosómico pierde eficiencia a medida que la distancia filogenética entre genomas hibridados aumenta. A pesar de todas estas limitaciones, el uso de sondas cromosómicas derivadas de distintas especies, combinado con mapeos genéticos posicionales han producido sinérgicamente mapas genéticos de alta resolución.

Una de las técnicas más utilizadas en conjunto con el pintado cromosómico es la del mapeo genómico de híbridos de radiación. Esta técnica, altamente eficiente, consiste en irradiar células de una especie particular de modo de cortar el genoma en un número deseable de fragmentos y luego fusionar los fragmentos a células de hamster chino. Las células somáticas híbridas resultantes contienen fragmentos individuales del genoma de interés. Luego, unos 90-100 (a veces más) clones que cubren el genoma total son seleccionados y las secuencias de interés se localizan en los fragmentos clonados vía PCR o por hibridación ADN-ADN. La distancia genética entre los múltiples marcadores analizados se mide en función del porcentaje de clones en los que dos marcadores mapean juntos.

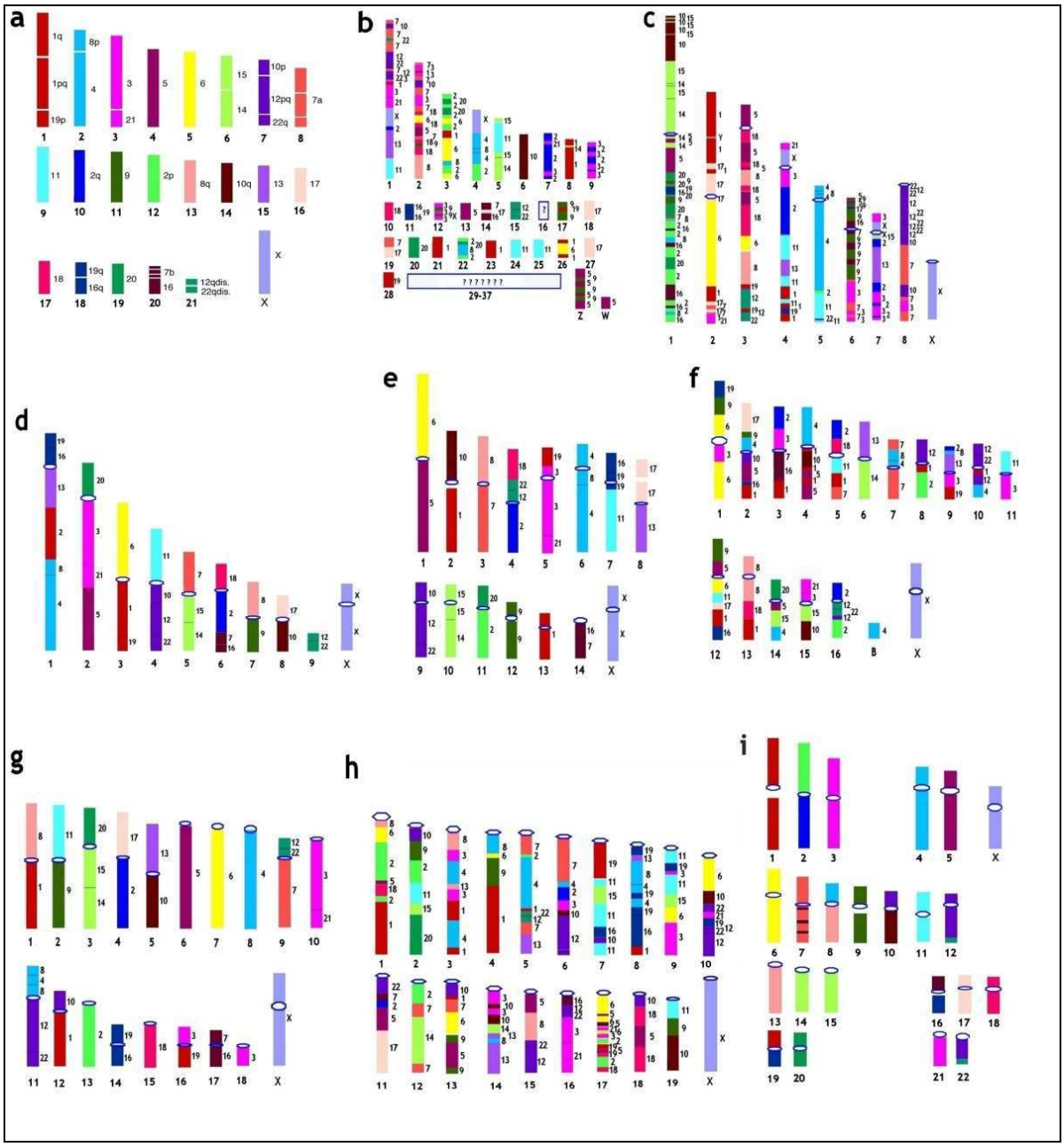


Figura 8. Mapas cromosómicos comparativos de aves y mamíferos. Los idiogramas representan en distintos colores los segmentos del cariotipo hipotético ancestral de los euterios. Las homologías respecto del cariotipo humano se muestran con números a la derecha en los idiogramas. a) Cariotipo reconstruido del genoma ancestral euteriano. b) Idiograma de cromosomas de pollo (*Gallus gallus domesticus*, 2n=78) basada en alineamientos de genomas completos de pollo y humano. c) Idiograma de la comadreja (*Monodelphis domestica* 2n=18) basada en alineamientos de genomas completos de comadreja y humano. d) Idiograma del cerdo hormiguero u oricteropo (*Orycteropus afer*, 2n = 20) basado en pintado cromosómico. e) Idiograma del visón (*Mustela vison*, 2n=30) basado en pintado cromosómico. f) Idiograma del zorro colorado (*Vulpes vulpes vison*, 2n=34 + 0-8 Bs) basado en pintado cromosómico y mapas de híbridos de radiación. g) Reconstrucción del genoma sciúrido ancestral

(Rodentia), basado en datos de pintado cromosómico. h) Idiograma del ratón doméstico (*Mus musculus*, 2n=40), basado en alineamientos de genomas completos de ratón y humano. i) Idiograma del humano (*Homo sapiens*, 2n=46). Tomado de Graphodatsky, Trifonov y Stanyon (2011).

El último paso comenzó cuando se completó el Proyecto Genoma Humano. Entonces, los investigadores se enfocarían en comparaciones evolutivas de los genomas de numerosas especies. El genoma completo de cualquier especie puede ser secuenciado completa y repetidamente para intentar obtener así un mapa comprehensivo con una resolución base a base. Éste método ha hecho posible la comparación de genomas de cualquier par de especies independientemente de su distancia filogenética. Los esfuerzos de secuenciación fueron cooptados en experimentos de pintado cromosómico, en los que se utilizaron BACs o YACs como sondas para hibridar en especies de genomas desconocidos. Los mamíferos han sido estudiados mejor que ningún otro grupo de animales en este sentido, habiéndose obtenido los genomas completos (y repetidos al menos 7 veces) en humano, ratón, rata, perro, vaca, cerdo, y chimpancé con una alta cobertura. Luego se completaron otras 24 especies de mamíferos cubriendo todos los órdenes de este grupo (Graphodatsky 2007). Si bien la genómica comparada permite obtener la mayor resolución, los proyectos genomas son empresas altamente costosas y, por lo tanto, sólo se han secuenciado genomas completos de algunos representantes de los distintos órdenes de mamíferos; al día de hoy no existen genomas completos cubran un grupo taxonómico de menor jerarquía.

Con todo, estas metodologías permitieron confirmar con una alta resolución la naturaleza homóloga de las asociaciones sinténicas. Se encontraron entre las distintas especies de mamíferos estudiadas, largos bloques de ADN llamados bloques sinténicos homólogos, que frecuentemente resultaron correspondientes a cromosomas o brazos cromosómicos enteros. Muchas de las diferencias en morfología y números cromosómicos entre especies podían explicarse por distintas combinaciones de bloques sinténicos. El pintado cromosómico comparativo con sondas de cromosomas o brazos cromosómicos enteros humanos permitió identificar bloques cromosómicos adyacentes en mamíferos placentarios, incluso en superórdenes de divergencia basal como Afrotheria o Xenarthra (Graphodatsky, Trifonov y Stanyon 2011) y así se encontraron *marcas cromosómicas* características de ciertos grupos. Estas *marcas* hacen posible la reconstrucción de características genómicas que se encontrarían en el ancestro común de los taxones considerados. En la figura Figura 8 se muestran los mapas cromosómicos de pollo, zarigüeya, y algunas especies placentarias con homologías a cromosomas humanos y al cariotipo putativo del ancestro común de los mamíferos.

Algunas *marcas cromosómicas* pueden ser el producto de convergencia o paralelismos, y una de las formas de detectarlo es identificar los puntos de ruptura genómicos, es decir, el sitio a partir del cual se escindió el bloque cromosómico en cuestión. Los puntos de ruptura son ricos en secuencias repetidas en tándem, sugiriendo un posible rol de estas secuencias en la organización a gran escala de los genomas de mamíferos (Ruiz Herrera, Castresana y Robinson 2006). En un estudio en el que se combinaron secuencias genómicas completas y mapas de híbridos de radiación de 8 especies de mamíferos, Murphy y colaboradores (2005) hallaron que un 20⁄ de las regiones con puntos de ruptura genómicos han sido reutilizadas a lo largo de la evolución de los mamíferos. Más aún encontraron que los centrómeros son más ricos en estas regiones y que los puntos de ruptura específicos de primates se encuentran flanqueados en su mayoría por segmentos duplicados que estarían involucrados en reordenamientos cromosómicos.

Otros hallazgos de la era genómica en relación a la evolución cariotípica de mamíferos, contribuyeron a un cambio de paradigma en cuanto a la naturaleza de los cromosomas B y la de los centrómeros. Los cromosomas B, hallados en algunas especies de mamíferos, pueden variar en número en diferentes tejidos, individuos y poblaciones, son más frecuentemente hallados entre los roedores, a su vez mayoritariamente en los muroideos. El caso más espectacular es el del lemming *Dicrostonyx torquatus*, 2n=40 más 1-42 Bs, seguido de *Apodemus peninsulae* con 2n=48 más 0-24 Bs, algunos de los cuales tienen un tamaño mayor que al par más grande hallado en el complemento A (Graphodatsky, Trifonov y Stanyon 2011). Mediante pintado cromosómico permitió revelar que además de heterocromatina, los cromosomas B de muchas especies de mamíferos tienen extensos segmentos autosómicos duplicados que portan genes o fragmentos génicos (Trifonov *et al* 2010). Aunque no se ha demostrado que ocurra transcripción en estos genes, el hallazgo sugiere un posible rol en estos elementos como acopiadores de duplicaciones génicas proveyendo eventualmente materias primas para la aparición de nuevos genes y combinaciones de material genético. Como se dijo más arriba, los centrómeros son verdaderos "puntos calientes" citogenéticos y se ha encontrado que ocasionalmente en la evolución de los mamíferos han surgido centrómeros *de novo* (Robinson, Ruiz-Herrera y Froenicke 2006).

1.5.1.1 Un cambio fundamental en el paradigma sobre las causas del cambio en el número de brazos cromosómicos

Históricamente las hipótesis de reposicionamiento de los centrómeros competían con hipótesis de inversiones pericéntricas, y las de fragmentación y activación de centrómeros *de novo* competían con hipótesis de duplicación de brazos enteros, o reordenamientos aún más complejos. La primera evidencia unívoca de reposicionamiento de centrómeros la dieron Montefalcone y colaboradores (1999), mediante el estudio de genomas de primates por hibridación *in situ* usando sondas de cromosomas artificiales bacterianos. A partir de ese momento quedó claro que si se tenía en cuenta la posibilidad de reposicionamiento de los centrómeros, podría hipotetizarse un escenario de reordenamientos mucho más parsimonioso que diera cuenta de las diferencias en el orden de marcadores citológicos entre especies.

El "ciclo de vida" del centrómero implicaría nacimiento, crecimiento, madurez, muerte y hasta resurrección (Figura 9). Los neocentrómeros humanos (NH) son centrómeros funcionales descubiertos en investigaciones clínicas, y que eventualmente podrían constituirse en la manifestación de la aparición de una novedad evolutiva. Hay tres tipos de NHs (Rocchi *et al* 2011). La vasta mayoría nace en fragmentos acéntricos que consisten en duplicaciones invertidas de una porción distal de un brazo cromosómico. Con la aparición del NH esos fragmentos son "rescatados" y pasan a formar cromosomas supernumerarios. Una segunda clase de NHs se origina por la formación de fragmentos acéntricos escindidos de cromosomas lineales o en anillo, generalmente ocurren en reordenamientos balanceados, que no causan (si segregan correctamente) efectos negativos en el fenotipo del parental ni en el de la descendencia. Un tercer tipo de NHs surge en cromosomas intactos y reemplazan funcionalmente al centrómero original. Este último caso implica el encendido y apagado epigenético del centrómero naciente y del que pasa a inactivarse, respectivamente. Una cuarta categoría postulada como una novedad evolutiva pero no reportada clínicamente, es la de centrómeros que surgen luego de una fisión no céntrica. En humanos los cromosomas 14 y 15 se habrían generado de este modo, a partir de la fisión de un cromosoma ancestral correspondiente al cromosoma 7 en macacos (Ventura *et al* 2007). Cuando se habla de centrómeros *de novo* desde una perspectiva evolutiva, y no en tiempo real, se los denomina centrómeros evolutivamente novedosos (CEN) (Rocchi *et al* 2011). Resulta interesante destacar que no todos los centrómeros formados *de novo* requieren la preexistencia de un tándem de secuencias repetidas. Ningún NH posee secuencias de ADN satélite (Rocchi *et al* 2011), y sugestivamente tampoco se encontraron secuencias de este tipo en los CEN de

caballos, y orangutanes. Aparentemente, podría haber determinantes epigenéticos en la formación de centrómeros funcionales, como la proteína centromérica CENP-A, que no estarían relacionados con un tipo de secuencia, sino que serían reclutados en rupturas de ADN doble cadena (Zeitlin *et al* 2009). Sin embargo, muchos autores acuerdan en que "por oportunismo o por necesidad" un nuevo centrómero debe adoptar las características genéticas y epigenéticas de un centrómero maduro: normalmente adquieren secuencias de ADN satélite que les propician un entorno epigenético favorable (Rocchi *et al* 2011; Kalitsis y Choo 2012).

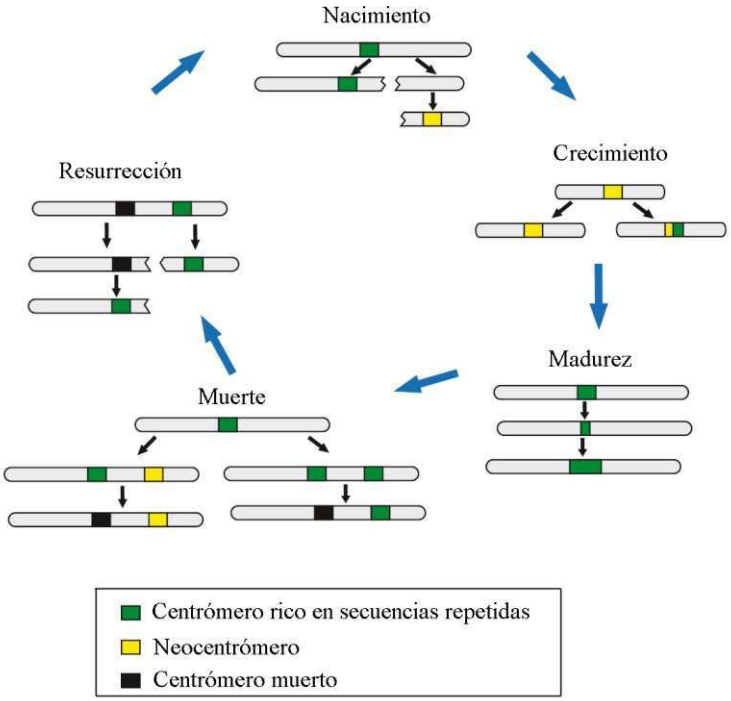


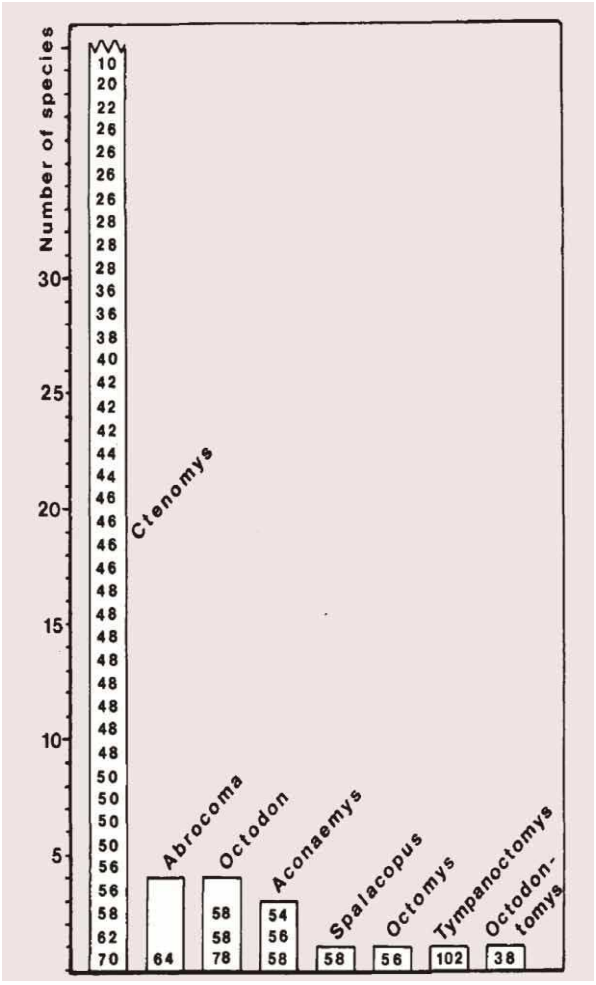
Figura 9. Ciclo de vida de los centrómeros. Nacimiento: un cromosoma con un centrómero maduro (rico en ADN repetido) atraviesa una fragmentación, seguida del ensamble de un neocentrómero en el fragmento acéntrico. Crecimiento: el neocentrómero acumula gradualmente ADN repetido, o puede mantenerse libre de estas secuencias por mucho tiempo. Madurez: el centrómero está saturado de secuencias repetidas y sufre contracciones y expansiones y una rápida evolución nucleotídica. Muerte: los reordenamientos del genoma pueden producir cromosomas dicéntricos, por el surgimiento de neocentrómeros, o por la fusión no céntrica de cromosomas. Uno de los centrómeros del cromosoma pseudodicéntrico resultante es desactivado y muere. Resurrección: un cromosoma con dos centrómeros ricos en secuencias repetidas (uno activo y el otro inactivo) se fragmenta, seguido de la "resurrección" del centrómero muerto, que "rescata" al fragmento acéntrico reincorporándolo al genoma. Modificado de Kalitsis y Choo (2012).

1.5.2 Evolución cromosómica en roedores

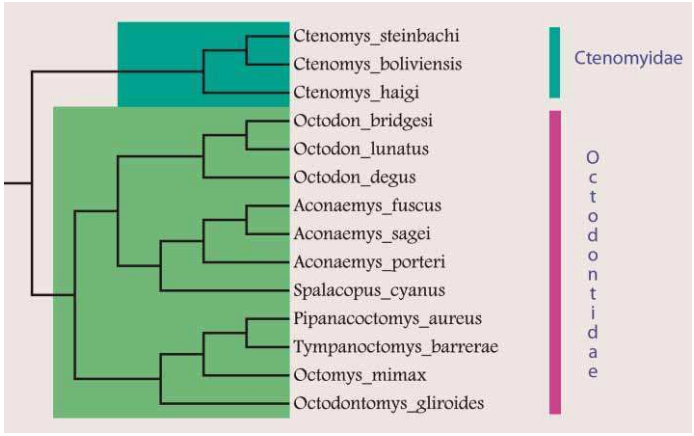
El orden Rodentia es el más prolífico de los mamíferos, comprendiendo más del 40⁄ de las especies, y también es el más diverso evolutivamente. Aproximadamente un tercio de las especies de roedores pertenecen a la superfamilia Muroidea (ratas, ratones y hamsters), y son los muroideos los que concentran la mayor variabilidad a nivel citogenético. Los muroideos tienen la mayor cantidad de especies que presentan polimorfismos cromosómicos y también tienen sistemas de determinación sexual diferentes del casi ubicuo XX-XY de los placentarios (Graphodatsky, Trifonov y Stanyon 2011). Por ejemplo, tanto hembras como machos poseen un cariotipo X0/X0 en una especie de rata topo (*Ellobius lutescens*) y un sistema XX/XX en otra (*E. talpinus*) (Volobouev, Gallardo y Graphodatsky 2006). El pintado cromosómico recíproco con sondas de cromosomas enteros de rata y ratón arrojó un resultado sorprendente: los reordenamientos entre estas dos especies tan cercanamente emparentadas superaban en diez veces a los reordenamientos ocurridos entre humano y gato (Stanyon *et al* 1999). Sin dudas las tasas de evolución cromosómica varían entre los distintos grupos de mamíferos, y entre los roedores parecería haberse disparado luego de la divergencia de los sciúridos (ardillas, perros de las praderas y marmotas, ver Blanga-Kanfi *et al* 2009; Churakov *et al* 2010). La localización de sondas cromosómicas humanas y el pintado recíproco en varias especies de ardillas mostraron que los genomas de ardillas están altamente conservados, son similares a los genomas humano y ancestral de mamíferos, y tienen varias marcas cromosómicas (combinaciones de bloques sinténicos, ver ítem 1.5.1 de la Introducción) que sugieren un origen común entre roedores y lagomorfos (Graphodatsky 2007 y referencias allí citadas).

Dentro del suborden Hystricomorpha, en la superfamilia Octodontoidea ocurren dos clados hermanos con patrones evolutivos contrastantes, los octodóntidos y los ctenominos, cuyo único género viviente de este último es *Ctenomys*. Los octodóntidos sufrieron una radiación ecológica, morfológica y fisiológica extensiva. Ocupando hábitats muy diversos los modos de vida de los octodóntidos van desde los grupos andinos y preandinos de escaladores (*Octodontomys gliroides*), fosoriales (*Aconaemys*) y formas subterráneas estrictas (*Spalacopus cyanus*), pasando por especies de superficie más generalistas(*Octodon*), que explotan matorrales y bosques, hasta las especies saxícolas y excavadoras (*Pipanacoctomys*, *Tympanoctomys* y *Salinoctomys*) altamente adaptadas a los ambientes desérticos de las cuencas salinas, dunas de arena y afloramientos rocosos (Gallardo *et al* 2007). En contraste su taxón hermano, los ctenominos, está representado por un único género viviente, *Ctenomys*, en el que sus más de 60 especies poseen un plan corporal muy conservado, especializado en la

explotación del nicho subterráneo (ver ítem 1.1.2 de la Introducción). También son contrastantes los patrones de evolución cromosómica entre estas dos familias. Los octodóntidos habrían atravesado reordenamientos cromosómicos complejos de forma saltatoria, pero manteniendo una gran homogeneidad a nivel de infragenérico (muy poco especiosos, por otra parte), mientras que los ctenominos habrían sufrido una evolución cromosómica más gradual, aunque de amplitud comparable (Figura 10).



a



b

Figura 10. a) Curva táxica de las especies vivas de los actuales géneros de Octodontoidea. Se muestran además los números cromosómicos de cada género. Se puede ver el patrón asimétrico entre las familias Octodontidae y Ctenomyidae en cuanto a número de especies y variabilidad cariotípica (Tomada de Spotorno *et al* 1995). La figura debería incluir también al género *Pipanacoctomys*, con una especie y 2n=92 (Gallardo *et al* 2007). **b)** Subclado de la filogenia de la superfamilia Octodontoidea obtenida por Upham y Patterson (2012) en base a un gen mitocondrial y 3 genes nucleares.

1.5.3 ¿Poliploidía en mamíferos?

El altísimo número cromosómico y el enorme tamaño del genoma de *Tympanoctomys barrerae* conformaron un primer cuerpo de evidencia que Gallardo y colaboradores (1999) tomaron para postular que las ratas vizcacha rojas tendrían un cariotipo tetraploide. Posteriormente Svartman, Stone y Stanyon (2005) sugerirían que el alto valor C de *T. barrerae* se debería a una amplificación descomunal de heterocromatina, evidencia que sumada a las incompatibilidades relacionadas con los efectos de dosis en el sistema de determinación sexual

de los euterios y metaterios tiraría por tierra la hipótesis de tetraploidía. Poco tiempo transcurriría para una siguiente publicación de Gallardo, González y Cebrián (2006) que reforzarían su hipótesis luego de revelar por hibridación *in situ* que varios genes de copia única estaban duplicados en el genoma de *T. barrerae*. Posteriormente Graphodatsky, Trifonov y Stanyon (2011) aplicando la técnica de pintado cromosómico con sondas de cromosomas de *Octodon degu* y de ADN repetitivo sostendrían que la ausencia de duplicaciones de segmentos genómicos largos sería prueba suficiente para descartar la condición tetraploide de este roedor. En la actualidad la hipótesis de la naturaleza cromosómica de *T. barrerae* de Gallardo y colaboradores viró hacia un posible origen alotetraploide (Gallardo *et al* 2007), producto de la hibridación entre *Octomys* y *Pipanacoctmys*, según un modelo complejo que involucra la no reducción gamética en oocitos y la doble fecundación de espermatozoides (pero que ahora traslada la polipolidización a *Pipanacoctomys*).

1.5.4 Evolución cromosómica en Ctenomys

Frente a la desconcertante variabilidad cromosómica que se manifiesta en los tuco-tucos, se realizaron numerosas contribuciones en citogenética que tenían por objeto determinar la naturaleza de los reordenamientos cromosómicos ocurridos a lo largo del linaje del género. Tempranamente Reig y Kiblisky (1969) concluyeron que de haber ocurrido fusiones/fisiones robertsonianas, éstas no serían el tipo de reordenamiento prevalente en el grupo, dado que existe una copiosa variabilidad en el número de brazos (las fisiones/fusiones no alteran el número fundamental, sino el número diploide). Sin embargo se han postulado reordenamientos robertsonianos en numerosas especies de *Ctenomys* como *C. torquatus* (De Freitas 2006), *C. minutus* (De Freitas 2006), *C. lami* (De Freitas 2006), *C. maguellanicus* (Lizarralde, Bolzán y Bianchi 2003), *C. talarum* (Bidau, Martí y Giménez 2003), y varias especies y formas del grupo Corrientes (Ortells, Contreras y Reig 1990; Lanzone *et al* 2007). También se ha propuesto en *C. talarum* y en *C. minutus* la existencia no solo de fusiones/fisiones robertsonianas sino de fusiones en tándem (De Freitas 1997; Massarini *et al* 2002), reordenamiento que afecta tanto al 2n como al NF.

Aún cuando un reordenamiento parece unívoco, no siempre es posible establecer el sentido en que ha ocurrido. La polaridad del evento puede establecerse mapeando los cambios cromosómicos en una filogenia, lo que implica inferir los estados de nodos ancestrales, o mediante el uso de indicadores citogenéticos, como es el caso de la localización de las secuencias teloméricas fuera de los telómeros. En un trabajo publicado por Lizarralde,

Bolzán y Bianchi (2003) se estudiaron las dos formas cromosómicas de *Ctenomys magellanicus*, de 2n=34 y 2n=36, ambas con el mismo NF=68. Por tinción uniforme y análisis del patrón de bandas G pudo establecerse la homología entre los brazos del cariomorfo 2n=34 y dos cromosomas telocéntricos del cariomorfo 2n=36, mientras que el resto del cariotipo resultó idéntico, de modo que ambos cariomorfos quedarían relacionados por un evento único de fusión/fisión. Un experimento concluyente de hibridación *in situ* con sondas teloméricas reveló que todos los cromosomas de ambos cariotipos tenían repeticiones teloméricas únicamente en posición terminal, incluso el par cromosómico involucrado en la fusión/fisión. A partir de este resultado, la hipótesis de fusión resultó más improbable que la de fisión, dado que no se observaron señales teloméricas intersticiales (pero ver Slijepcevic 1997 y Ocalewicz 2012, donde se documentan numerosos casos en los que las repeticiones teloméricas se pierden luego de una fusión céntrica) y por lo tanto el cariotipo 2n=36 sería derivado del 2n=34 mediante una fisión céntrica.

Novello y Villar (2006) postularon el sentido en que habría ocurrido una inversión pericéntrica en el cromosoma 1 de las tres especies uruguayas de *Ctenomys* revelada por bandeo G. El cromosoma 1 de *C. torquatus* es metacéntrico, mientras que los de *C. rionegrensis*, de todos los cariomorfos de *C. pearsoni* (posee cinco cariomorfos de 2n diferente) son acrocéntricos. Los autores establecieron que *C. torquatus* representaría el estado ancestral, ya que esta especie tiene espermatozoides simétricos, y este es considerado un estado primitivo en roedores y otros mamíferos, mientras que las especies que tienen un cromosoma 1 acrocéntrico tienen todas espermatozoides asimétricos, estado considerado derivado. Esta es una forma posible de dar polaridad a un cambio cromosómico, aunque para poner a prueba esta hipótesis sería más riguroso mapear los estados en una filogenia. De hecho, la filogenia obtenida por Parada y colaboradores (2011) muestra que *C. pearsoni* y *C. torquatus* pertenecen a un mismo grupo, mientras que *C. rionegrensis* sería externo a este, con lo cual habría que suponer una reversión o un paralelismo. Los autores del trabajo también encontraron variaciones en las cantidades de heterocromatina (por bandeo C en el cromosoma 1) entre estos cariomorfos, y éstos sí son consistentes con las relaciones filogenéticas entre las especies, dado que *C. torquatus* y *C. pearsoni* no poseen bloques C+ en el cromosoma 1, mientras que *C. rionegrensis* tiene un bloque pericentromérico conspicuo. También De Freitas (1997) describió polimorfismos para inversiones pericéntricas en *C. minutus*, causantes de la variación en el número fundamental de esta especie.

La distribución y las cantidades de heterocromatina reveladas por bandeo C en *Ctenomys* han resultado muy variables en la evolución del grupo. Reig y colaboradores (1990; 1992) establecieron 3 patrones principales para clasificar el perfil heterocromático C+ de los tuco-tucos:

I- Bandas C negativas en la mayoría de los cromosomas y de estar presentes débilmente visibles únicamente en centrómeros. Otras bandas pueden estar presentes pero nunca superando el 20⁄ del largo total de un cromosoma. Este es el caso de especies como *C. perrensi*, *C. roigi*, *C. dorbignyi* , *C. torquatus*, *C. magellanicus*, *C. tucumanus*, *C. boliviensis*, *C. sociabilis*, *C. fueguinus*, *C. argentinus* o *C. lewisi*.

II- Bandas C+ pericentroméricas bien conspicuas presentes en más del 50⁄ de los cromosomas. Este patrón es característico de especies con bajos números cromosómicos como *C. steinbachi*, *C. robustus*, *C. ocultus*, *C. opimus*, *C. fulvus*, pero también es hallado en especies con números cromosómicos mayores como *C. leucodon*, *C. conoveri* y *C. frater*. También fue hallado en *C. rionegrensis*, y *C. maulinus*.

III- Bandas C+ en brazos completos en el 50-75⁄ de los brazos cortos. En el resto de los cromosomas las bandas C+ estarían ausentes o presentes únicamente en regiones (peri)centroméricas. Este patrón de bandas es único del grupo *mendocinus*, hallado en *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. porteousi*, *C. chasiquensis* y *C. flamarioni* (estas últimas agregadas a partir de Massarini y De Freitas 2005), es decir, en todas sus especies salvo en *C. rionegrensis*:

En un trabajo posterior, Cook y Salazar Bravo (2004) describirían un patrón adicional (IV) en el que las bandas C+ ocurren en regiones teloméricas o intersticiales, y/o en combinación con los 3 patrones anteriores. Entre las especies con patrón IV se encuentran *C. hagi*, *C. coyhaiquensis*, *C. latro* y *C. talarum*, siendo esta última especie polimórfica para los patrones de distribución de heterocromatina C+ (Massarini *et al* 1995). Además tomando como marco la reconstrucción filogenética basada en secuencias de citocromo b de Slamovits y colaboradores (2001), los autores del trabajo concluyeron que los patrones de distribución y cantidad de heterocromatina habrían sufrido reversiones y paralelismos, por lo que las bandas C+ no resultan un buen carácter filogenético en *Ctenomys*, hecho que también se constata al mapear estos patrones en la filogenia obtenida por Parada y colaboradores (2011).

Como fue mencionado en la sección 1.5.1 la morfología cromosómica y el cariotipo de una especie pueden cambiar extensamente si ocurren variaciones en las cantidades de heterocromatina. El número fundamental puede variar si un cromosoma telocéntrico experimenta la adición de un brazo heterocromático o, por el contrario, si un cromosoma bibraquiado pierde un brazo heterocromático. El grupo *mendocinus* resulta un caso de evolución cromosómica muy singular en *Ctenomys*: los cariotipos de las 6 especies que lo integran son casi idénticos, manteniéndose el orden de bandas G, y mientras que el número diploide se mantuvo virtualmente invariante (2n=47-48), el número de brazos cromosómicos muestra una extensa variación, incluso a nivel intrapoblacional (NF=71-82). La variación de cantidades de heterocromatina en brazos enteros ha sido estudiada en detalle en este grupo mediante bandeo C y G (Massarini *et al* 1991). El par cromosómico telocéntrico B4 presente *en C. porteousi* es homeólogo al par submetacéntrico A11 de *C. mendocinus*, y difieren en la adición/pérdida de un brazo heterocromático. Más aún, en ambas especies se encontraron polimorfismos en el número de brazos en al menos 4 pares cromosómicos adicionales, tratándose de brazos enteramente heterocromáticos C+ (interesante resulta el hecho de que *C. flamarioni*, especie brasileña perteneciente al grupo *mendocinus* también posee polimorfismos en el número de brazos asociados a la variación en la heterocromatina C+, De Freitas 2006). Los autores de este trabajo encontraron dos reordenamientos en heterocigosis presentes en el par A1 (el par mayor, el mismo estudiado en especies uruguayas por Novello y Villar 2006) de *C. azarae*, C*. porteousi* , *C. mendocinus* y *C. chasiquensis* (Figura 11). Uno de los reordenamientos involucra la adición/pérdida de heterocromatina: el patrón de bandas G es el mismo entre los cromosomas comparados, pero en un cromosoma (A1a) el brazo corto duplica en longitud al brazo corto de su homólogo (A1b). El otro polimorfismo hallado se explicaría por un reordenamiento más complejo que involucraría la siguiente secuencia: pérdida del brazo heterocromático - inversión pericéntrica - fusión con un cromosoma telocéntrico grande (B2) (Massarini *et al* 1991). La ausencia del par metacéntrico producto del reordenamiento complejo, así como la ocurrencia simultánea de este polimorfismo en poblaciones de cuatro especies distantes geográficamente abrió la pregunta acerca del origen y la persistencia de este polimorfismo: podría ser un reordenamiento recurrente en las distintas poblaciones, o podría tratarse de un polimorfismo ancestral mantenido por tener un alto valor adaptativo en heterocigosis.

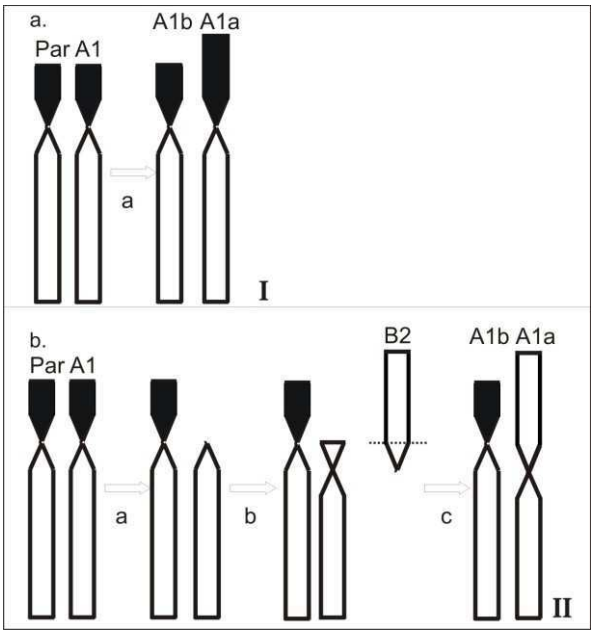


Figura 11. Reordenamientos hipotéticos involucrados en el polimorfismo del par mayor (A1) en especies del grupo *mendocinus*, tomado de Massarini y colaboradores (1991). Las flechas indican la dirección propuesta del cambio cromosómico; las líneas punteadas indican rupturas cromosómicas. a. Aumento de tamaño del brazo heterocromático de uno de los cromosomas homólogos. b. Pérdida del brazo corto heterocromático en uno de los homólogos (a), seguida de una inversión pericéntrica del cromosoma telocéntrico resultante (b) y posterior fusión con un cromosoma telocéntrico mediano B2 (c).

Las hibridaciones o contactos secundarios entre especies o poblaciones con cariomorfos diferentes, también resultan una fuente de variación cromosómica en *Ctenomys*. Gava y De Freitas (2003) describieron una zona híbrida entre distintos cariomorfos de *C. minutus* (2n=42-50), y entre *C. minutus* y *C. lami* (2n=54-58). Otra zona híbrida es la del llamado "complejo *pundti*" en la que ocurren cariomorfos intermedios entre *C. talarum* y *C. pundti* (Braggio *et al* 1999).

La dinámica cromosómica de *Ctenomys* ha emanado una profusa variedad de cariomorfos de relaciones, por lo general, inciertas. La complejidad de reordenamientos, sumada a las hibridaciones que pudieron haber ocurrido entre distintos cariomorfos, dificulta la posibilidad de reconstruir la historia cromosómica del género. Sin embargo, como se ha manifestado en esta sección, dentro de grupos determinados los reordenamientos de un tipo sí parecen prevalecer sobre otros, y en esos casos es posible proponer relaciones explícitas entre los cariomorfos estudiados. El grupo *mendocinus* constituye el citado caso de cariotipos muy relacionados (con excepción de la adición/pérdida de brazos heterocromáticos enteros)

en un grupo de especies, al que se le oponen los reordenamientos extensos que pueden estar dentro de los límites de especies, o formando complejos de especies. Uno de estos casos tipo es el de *C. pearsoni*, en el que se mantiene un NF=84 mientras que el 2n varía entre 56 y 70 cromosomas, lo que sugiere una prevalencia de reordenamientos de tipo robertsonianos, aunque las relaciones cromosómicas aún se mantienen inciertas en esta especie (Tomasco y Lessa 2007). El otro caso de extrema variabilidad cromosómica, es el grupo Corrientes, cuyas hipótesis de evolución cromosómica se detallarán a continuación.

1.5.5 Evolución cromosómica en el grupo Corrientes

En un trabajo seminal que estudió 11 poblaciones del grupo Corrientes, y poblaciones de *C. conoveri* (Boquerón, Paraguay), *C. pearsoni* (Entre Ríos, Argentina; Colonia, Canelones y Maldonado, Uruguay) *C. rionegrensis* (Paraná y Ubajay, Entre Ríos), *C. argentinus* (Colonia Benítez, Chaco) y *C. yolandeae* (Las Palmas, Santa Fe), Ortells, Contreras y Reig (1990) encontraron nueve cariotipos diferentes en las 11 poblaciones correntinas, dos de las cuales eran polimórficas para reordenamientos de tipo robertsoniano. Esta variabilidad fue inicialmente desconcertante ya que en lugar de cariotipos especie-específicos se trataba de cariotipos población-específicos, lo que revelaba una tasa de evolución cromosómica descomunal. Igualmente sorprendente resultó que nueve de las 11 poblaciones estudiadas compartían el mismo número fundamental, observación que llevó a los autores del trabajo a postular que los diferentes cariotipos en este subgrupo se habrían originado principalmente por reordenamientos robertsonianos. La discontinuidad de los cariomorfos 2n=70 NF=84 atribuidos a poblaciones disyuntas de *C. dorbignyi* sumada a su condición monomórfica , y el hecho de que estos cariomorfos resultaron indistinguibles por tinción uniforme del cariotipo 2n=70 NF=84 de *C. pearsoni* (Conchillas, Colonia, Uruguay), llevó a los autores a proponer un escenario en el cual el ancestro común a todas estas poblaciones habría tenido este cariotipo. Este ancestro habría tenido una distribución prácticamente continua ocupando, al menos el rango actual de las poblaciones correntinas y *C. pearsoni* (región costera de Uruguay y Entre Ríos). Mediante eventos independientes, mayoritariamente de tipo robertsoniano, el número diploide habría ido reduciéndose en diferentes demos. Este proceso habría sido estocástico debido al tamaño poblacional reducido que estos demos alcanzan periódicamente (al menos en Corrientes) y al flujo génico restringido entre ellos. Algunas poblaciones, como consecuencia de estos procesos estocásticos quedarían aisladas reproductivamente. Esta sería la explicación del origen de linajes independientes que eventualmente formarían nuevas especies como *C. perrensi*. Además habría en Corrientes un linaje independiente del de *C.*

dorbignyi, y lo constituirían todas las formas de NF<84. De este modo *C. roigi* (2n=48, NF=80) y *C*. sp de la población de Curuzú Laurel (2n=42, NF=76) pertenecerían a un linaje relacionado a *C. torquatus*.

El escenario evolutivo antes descripto resultó una hipótesis de trabajo muy fértil y, aunque con el tiempo acumuló una serie de anomalías, produjo muchas contribuciones a favor y en contra del escenario propuesto. Posteriormente, Ortells (1995), comparando el patrón de bandas G de ocho cariomorfos del grupo Corrientes (incluidas las 3 especies nominales) concluyó que las fusiones/fisiones céntricas, incluso entre los de NF=84, no serían el tipo de reordenamiento exclusivo, ni el más importante, dada la falta de homología en muchos brazos cromosómicos. Además propondría que las inversiones pericéntricas serían un reordenamiento frecuente en el grupo.

Pero no fueron sólo anomalías las que produjo el escenario evolutivo propuesto por Ortells, Contreras y Reig (1990). García y colaboradores (2000b) compararon bandas G y C de *C. pearsoni* y *C. dorbignyi* y concluyeron que desde un punto de vista citogenético no había razones para considerarlos taxones distintos, lo que reforzó la hipótesis del cariomorfo ancestral 2n=70 NF=84 de amplia paleodistribución. Propusieron que el reordenamiento que diera origen a ese cariomorfo sería principalmente la fisión céntrica acompañada de una disminución en la heterocromatina C+.

Recientemente, Fernandes y colaboradores (2009) publicaron un trabajo donde se realizó un análisis citogenético y filogeográfico de poblaciones brasileñas y uruguayas de *C. torquatus*. En este trabajo se incluyeron individuos de Curuzú Laurel y de otras poblaciones de especies y formas del grupo Corrientes, y resultaron monofiléticas recíprocamente respecto de *C. torquatus*. Además de pertenecer a linajes mitocondriales diferentes, la morfología cromosómica también resultó distinta entre el cariomorfo de Curuzú Laurel y uno de igual 2n y NF perteneciente a *C. torquatus*. Entonces, los cariomorfos de NF<84 eran candidatos a haber surgido en el seno del grupo Corrientes, y habría que proponer algo más que reordenamientos robertsonianos.

Las causas de la variabilidad cromosómica interpoblacional en el grupo Corrientes pueden deberse a las invocadas en el modelo de Ortells, Contreras y Reig (1990), que son de carácter demográfico. Pero además, muchas de las poblaciones estudiadas en el grupo Corrientes resultaron polimórficas para reordenamientos robertsonianos (Ortells, Contreras y

Reig 1990; Ortells 1995; Giménez *et al* 2002; Lanzone *et al* 2007). Es menester destacar que no se publicaron polimorfismos de ningún otro tipo en demos correntinos, por lo que este tipo de reordenamiento resulta ser el más frecuente en la escala poblacional.

Las causas de la elevada inestabilidad cromosómica de los tuco-tucos, condición necesaria para el surgimiento y posterior fijación de variantes independientes en los demos semiaislados del grupo Corrientes, si bien no han sido elucidadas al momento, parecen tener su origen en lo que hasta la década de 1980 se conocía como ADN basura. Hoy, el principal ADN satélite de los tuco-tucos, denominado SRPC (secuencia repetida PvuII de *Ctenomys*) (Rossi, Reig y Zorzópulos 1990) es sospechoso de recombinación ilegítima entre cromosomas no homólogos, pudiendo estar implicado en los reordenamientos cromosómicos descriptos en *Ctenomys*.

1.6 ADN satélite

Los genomas eucariotas contienen mucho más ADN que el involucrado en la codificación de proteínas. La mayor parte de estas secuencias no codificantes tienen una característica común: están repetidas en cientos, miles o millones de copias dentro de un genoma. Las secuencias repetidas se subdividen en dos clases principales según su organización genómica, que a su vez es consecuencia de sus modos de evolución: ADN repetido disperso y ADN repetido en tándem. A la primera clase corresponden los elementos transponibles, llamados así por su habilidad de traslocar en distintas regiones del genoma, pudiendo en esos saltos interrumpir secuencias génicas o afectar la transcripción de genes debido a que contienen secuencias regulatorias (Slamovits y Rossi 2002). El segundo tipo, las secuencias repetidas en tándem, están virtualmente presentes en todos los genomas eucariotas y suelen hallarse en mayor número de copias que los elementos transponibles. Tres clases distintas, según la longitud de la unidad de repetición, propiedades y distribución genómica se distinguen entre las secuencias repetidas en tándem. Las unidades de repetición o monómeros de los microsatélites son de 2-6 pares de bases (pb) de longitud, mientras que los monómeros de los minisatélites son de 15-60 pb de longitud (Charlesworth, Sniegowski y Stephan 1994). Ambos tipos de secuencia se suelen hallar en un número moderado de copias y se localizan predominantemente en regiones cromosómicas eucromáticas, aunque algunos arreglos de microsatélites han sido detectados en regiones heterocromáticas (Gindullis *et al* 2001; Plohl *et al* 2008). El tercer tipo de secuencias repetidas en tándem fue denominado *ADN satélite* por razones históricas: estas secuencias fueron inicialmente aisladas a partir de

bandas satélite en experimentos de centrifugación en gradientes, debido a las diferencias en el contenido AT de estas secuencias en relación al resto del ADN genómico (Slamovits y Rossi 2002). Los monómeros de ADN satélite pueden tener desde decenas de pares de bases hasta 1 Kb, y los tándemes de repeticiones pueden llegar hasta 100 Mb. El alto número de repeticiones en los arreglos de ADN satélite, y su co-localización con la heterocromatina constitutiva (regiones de los cromosomas eucariotas que se mantienen condensadas a lo largo de todo el ciclo celular) lo distinguen de los micro y minisatélites.

Mucho se ha discutido acerca de la funcionalidad del ADN satélite. Tempranamente se consideró a estas secuencias como elementos genómicos inútiles o ADN "basura" (Ohno 1972), o alternativamente, como "parásitos" genómicos que proliferarían en virtud de su capacidad de replicarse exitosamente en los genomas "huéspedes" (Orgel y Crick 1980). Una visión contraria a las expuestas sugeriría que los ADN satélites estarían involucrados en numerosas funciones tales como la organización y estructura cromosómica, afectando el metabolismo celular y también como agente promotor de la especiación (John y Miklos 1979). La postura funcionalista se vio reforzada con resultados de trabajos ulteriores en los que se asoció al ADN satélite con características complejas de los cromosomas eucariotas. Las secuencias de ADN satélite son las principales constituyentes de la heterocromatina centromérica y pericentromérica, dos regiones determinadas epigenéticamente responsables del correcto apareamiento y disyunción de los cromosomas eucariotas en la división celular (Henikoff, Ahmad y Malik 2001; Lam *et al* 2006; Plohl *et al* 2008). Además se ha asociado al ADN satélite a fenómenos como la determinación de la estructura de la heterocromatina (Henikoff y Dalal 2005; Grewal y Elgin 2007), regulación de la expresión génica (Shestakova *et al* 2004) y evolución cromosómica (Frönicke y Scherthan 1997; Li *et al* 2000; Slamovits *et al* 2001; Hartmann y Scherthan 2004; Capanna y Castiglia 2004). Es necesario aclarar, en línea con lo que sostienen Plohl y colaboradores (2008) que a pesar de la acumulación progresiva de información, aún no se cuenta con evidencias directas de las funciones atribuidas a los ADN satélites y ni de los mecanismos de acción en procesos determinados, puesto que en muchos casos las conclusiones provienen más de ejercicios deductivos que de evidencias experimentales.

A pesar de estar presentes en la mayoría de los genomas eucariotas, existe una extensa heterogeneidad de secuencia en los ADN satélites. Una familia de ADN satélite comprende un conjunto de monómeros de origen común, que divergen en no más de un 15⁄

en identidad de secuencia (en algunos casos puede llegar a 30⁄ , ver Plohl *et al* 2008 y referencias dentro). Las familias de ADN satélite suelen estar presentes en rangos taxonómicos acotados pero, a su vez, grupos relacionados suelen tener familias de ADN satélite muy divergentes (de origen independiente). Más aún, en un mismo genoma pueden coexistir varias familias de ADN satélite no relacionadas. Notablemente, la longitud de los monómeros de los ADN satélites parece haber convergido hacia dos modas halladas tanto en plantas como animales: una entre 150-180 pb y la otra en el rango de 300-360 pb, hecho que se ha interpretado como un reflejo de los requerimientos del largo del bucle que el ADN tiene alrededor de uno o dos nucleosomas, estructura en la cual estas secuencias están implicadas (Henikoff, Ahmad y Malik 2001).

1.6.1 Evolución en concierto (y modos de evolución del ADN satélite)

Como se dijo, dentro de una misma familia de ADN satélite, aún cuando está presente en varios miles o millones de copias por genoma, la divergencia de secuencia entre monómeros es generalmente muy baja. Los monómeros que componen los ADNs satélites mantendrían una homogeneidad de secuencia mayor que la esperada, lo cual llevó a formular el concepto de evolución en concierto. Este fenómeno es consecuencia de un proceso a dos niveles en que las mutaciones son homogenizadas a lo largo de los monómeros de una misma familia, y concomitantemente fijadas dentro de un grupo de organismos reproductivamente vinculados (Dover 1982; Dover y Tautz 1986). La evolución en concierto implica la ausencia de independencia en la evolución de los monómeros que conforman estas secuencias.

La homogenización de secuencias de ADN satélite se produciría mediante diversos mecanismos moleculares de intercambio no recíproco tales como el intercambio desigual, la conversión génica, la replicación por círculo rodante y el intercambio mediado por transposones (Stephan 1986; Dover 2002; Glinka, De Lorenzo y Stephan 2006).

Los intercambios desiguales pueden ocurrir entre cromátidas hermanas, entre arreglos en tándem correspondientes a un mismo *locus* o entre *loci* no homólogos. Son fenómenos que ocurren en forma recurrente y producen amplificaciones y deleciones, y son responsables de las fluctuaciones más dramáticas en el número de copias de los ADN satélites (Walsh 1987; Elder y Turner 1995; Plohl *et al* 2008 y referencias allí citadas).

La conversión génica ocurre en secuencias repetidas mediante mecanismos de reparación del ADN que involucran recombinación. En este mecanismo se forma un

heteroduplex de ADN, se toma una cadena como molde y se "repara" la restante por complementariedad con la cadena molde. Este proceso no afecta al número de copias, pero sí tiene efecto en la homogenización de los monómeros. Existen evidencias de conversión génica en plantas, hongos, animales y ciliados (Duret y Galtier 2009) y, si bien puede ocurrir entre regiones génicas no ligadas, la homogenización es mayor a nivel de un mismo tándem, luego dentro de un cromosoma y tiene menor alcance entre cromosomas (Dover y Tautz 1986).

La transposición duplicativa involucra la duplicación y movimiento de una secuencia a través del genoma, aumentando su número de copias en un individuo, y por lo tanto, la probabilidad de expandirse en una población.

La amplificación por círculo rodante es un mecanismo disparado por la recombinación intracromátida entre monómeros de un tándem. Ésta produce círculos extracromosómicos, o episomas que generalmente se pierden, y rara vez se integran por recombinación a otro arreglo de ese ADN satélite en el genoma. Si el episoma posee un origen de replicación, podría entonces sufrir ciclos de amplificación y recombinación (incluso independientemente del resto del genoma), aumentando abruptamente el número de copias del ADN satélite en el genoma. Este proceso puede generar tanto amplificaciones (entrecruzamiento intracromátida seguido de círculo rodante) como deleciones (entrecruzamiento intracromátida y pérdida del episoma) de grandes porciones heterocromáticas, y explicaría la naturaleza saltatoria de la heterocromatina en los genomas eucariotas (Walsh 1987; Rossi, Reig y Zorzópulos 1990; Hamilton, Honeycutt y Baker 1990; Slamovits 2002a). Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan la existencia de este mecanismo de amplificación: el virus polymona suele integrarse en múltiples copias agrupadas en tándem, y puede escindirse del arreglo en el que se encuentra inserto por recombinación homóloga; también se han encontrado plásmidos circulares formados únicamente por secuencias repetidas en tándem, como el ADNr de levaduras o ADN alfoide humano (Walsh, 1987).

Se ha postulado que los ADN satélites pueden conformar estructuras repetidas de orden superior (*HORs*, por *higher-order repeats*, ROS en castellano) en las que los monómeros adyacentes se convierten en subunidades o subrepeticiones (Plohl *et al* 2008 y referencias allí citadas). Estas repeticiones de orden superior se convierten en unidades de homogenización, por lo que la divergencia puede ser mayor entre las subunidades que las constituyen que entre ROS distintas. Por ejemplo, en el satélite alfoide de los humanos, los ROS son muy homogéneos y son típicamente 97-100⁄ idénticos, mientras que las subunidades dentro de un

ROS son en promedio ~70⁄ idénticas. En la misma línea, un monómero de 234 pb de ADN satélite de ratón se basa en un motivo de 9 pb (Hörz y Altenburger 1981), un satélite bovino de 1715 pb está conformado por una subrepetición divergente de 31 pb (Jobse *et al* 1995), los satélites del género de insectos *Diadromus* derivan de un motivo básico de 20 pb (Rojas-Rousse, Bigot y Periquet 1993), y en el insecto *Tribolum madens* el origen de un ADN satélite involucró rearreglos de una repetición y posterior inserción de un segmento de ADN (Ugarkovic, Durajlija y Plohl 1996).

Mientras que la homogenización depende de mecanismos a nivel intragenómico, la fijación de variantes es la resultante de la repartición aleatoria de cromosomas en la reproducción sexual a través de la meiosis y la anfimixia, que depende de factores demográficos como por ejemplo el tamaño poblacional. El efecto de la evolución en concierto, actuando a nivel intragenómico y poblacional es una mayor homogeneidad de ADN satélite dentro de los linajes (líneas, poblaciones, subespecies, especies, etc.) que entre ellos (Dover 1982; Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007; Plohl *et al* 2008).

1.6.2 ADN satélite y evolución cromosómica

La remodelación cromosómica es uno entre los diferentes, aunque indirectos, roles potenciales atribuidos al ADN satélite. La ocurrencia de bloques de ADN satélite en cromosomas no homólogos, sumada a los mecanismos recombinacionales involucrados en la dinámica de estas secuencias han servido como plataforma para postular su intervención en reordenamientos de tipo robertsonianos, translocaciones, fusiones en tándem, variaciones en las cantidades de heterocromatina, el origen de cromosomas B y la diferenciación de cromosomas sexuales heteromórficos (Wichman *et al* 1991; Slamovits *et al* 2001; Vicari *et al* 2010). Mediante técnicas de pintado cromosómico con sondas cromosómicas humanas e hibridación *in situ* con sondas de ADN satélite del muntiac chino, Frönicke y Scherthan (1997) estudiaron las fusiones en tándem de la especie con mayor número de translocaciones en tándem postuladas y menor 2n entre los mamíferos, el muntiac Indio (2n= 6-7). Veintiséis *loci* de ADN satélite intersticiales fueron detectados en el genoma haploide del muntiac indio. Se halló que estos bloques de ADN satélite co-localizan con los márgenes de los bloques sinténicos conservados entre hombre y muntiac, lo que sugiere una íntima relación entre estas secuencias y los reordenamientos cromosómicos ocurridos en esta especie. Estos resultados son coincidentes con los de Ruiz Herrera, Castresana y Robinson (2006), que en un análisis de bloques sinténicos comparando los genomas de distintas especies de mamíferos (humano,

ratón, rata, vaca, perro, cerdo, gato, caballo) y pollo, encontraron que los puntos de ruptura genómicos están enriquecidos en ADN satélite.

Como se dijo en el párrafo anterior, el rol clave del ADN satélite en el origen de las remodelaciones cromosómicas dependería principalmente de su habilidad para moverse a través del genoma. Partiendo de esa premisa, varios autores postularon que dentro de un grupo de organismos, los linajes de rápida evolución del ADN satélite (aquéllos en los que el número de copias varíe abruptamente) deberían sufrir una mayor inestabilidad cromosómica, que aquéllos linajes en los que la evolución del ADN satélite sea menos pronunciada. Estas hipótesis derivan de estudios en équidos (Wichman *et al* 1991), en el roedor *Peromyscus* (Hamilton, Hong y Wichman 1992) y en el género de murciélagos *Macrotus* (Bradley y 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. En consonancia con lo hallado por Frönicke (1997), Ruiz Herrera (2006) y sus colaboradores, estos investigadores señalan que dichos reordenamientos tendrían poco efecto sobre el genoma eucromático, ya que los bloques sinténicos se mantendrían intactos, dado que las rupturas afectarían sólo a los bloques de ADN satélite.

También se ha relacionado al ADN satélite con la inestabilidad cromosómica y con la reestructuración genómica durante el desarrollo en diferentes organismos. Se ha descripto el proceso de disminución de cromatina en la ontogenia de distintos organismos, como nematodos, copépodos y en una especie de lamprea. La cantidad de ADN que se pierde puede llegar al 94⁄ , y está principalmente compuesto por ADN satélite (Stanley, Kasinsky y Bols 1984; Coghlan *et al* 2005; Drouin 2006).

1.6.3 Hipótesis de una biblioteca ancestral

En muchos grupos taxonómicos se determinó la existencia de varias familias de ADN satélite, de composición nucleotídica y/o longitudes monoméricas diferentes, cuyas cantidades resultaron variables incluso entre especies cercanamente emparentadas. Estas cantidades variables de ADN satélite de diferentes familias (o incluso monómeros distintos de una misma familia) determinan el perfil de una especie. Tempranamente Fry y Salser (1977) propusieron que en linajes cercanos existiría un repertorio compartido o biblioteca de ADN satélite, compuesta por distintas familias o variantes monoméricas, presente en el ancestro común de estos linajes, y mediante los procesos que rigen la evolución de este tipo de secuencias,

pueden amplificarse o eliminarse variantes particulares a expensas de las demás, originando perfiles de ADN satélite específicos de un linaje (Figura 12). En las décadas subsiguientes el modelo de la biblioteca ganó sustento en base a datos experimentales. En coleópteros del género *Palorus* (Mestrovic *et al* 1998) cuatro especies se caracterizan por poseer un ADN satélite mayoritario diferente. A su vez, cada especie mantiene en proporción minoritaria los satélites que son mayoritarios en las restantes especies, hecho interpretable como la generación de perfiles diferentes a partir de las fluctuaciones en el número de copias de ADN satélites compartidos. En *Bacillus rossius*, insectos del orden Phasmatodea (bichos palo) se encontró que distintas variantes monoméricas de una misma familia de ADN satélite están distribuidas en el genoma en forma de una biblioteca (Cesari *et al* 2003). En nematodos también se corroboró la existencia de una biblioteca en la que, aparte de los eventos estocásticos, la selección natural podría representar un factor limitante en la persistencia de secuencias determinadas (Meštrovic, Castagnone-Sereno y Plohl 2006). En plantas del género *Curcubita*, dos ADN satélites diferentes fueron encontrados en todas las especies estudiadas: un satélite de 350 pb de número de copias variable entre especies, y uno satélite de 170 pb presente en un número estable de copias (King, Jobst y Hemleben 1995). Dos familias de ADN satélite inicialmente detectadas en el genoma de centeno, fueron también halladas en todas las especies dentro de la tribu Triticeae, pero con amplias fluctuaciones del número de copias entre especies (Vershinin, Alkhimova y Heslop-Harrison 1996). Pese a que la divergencia entre las especies bovinas es reciente, entre 0,2 a 5 MA, se detectaron fluctuaciones pronunciadas en la cantidad de familias de ADN satélite así como en la cantidad de variantes nucleotídicas (Nijman y Lenstra 2001).

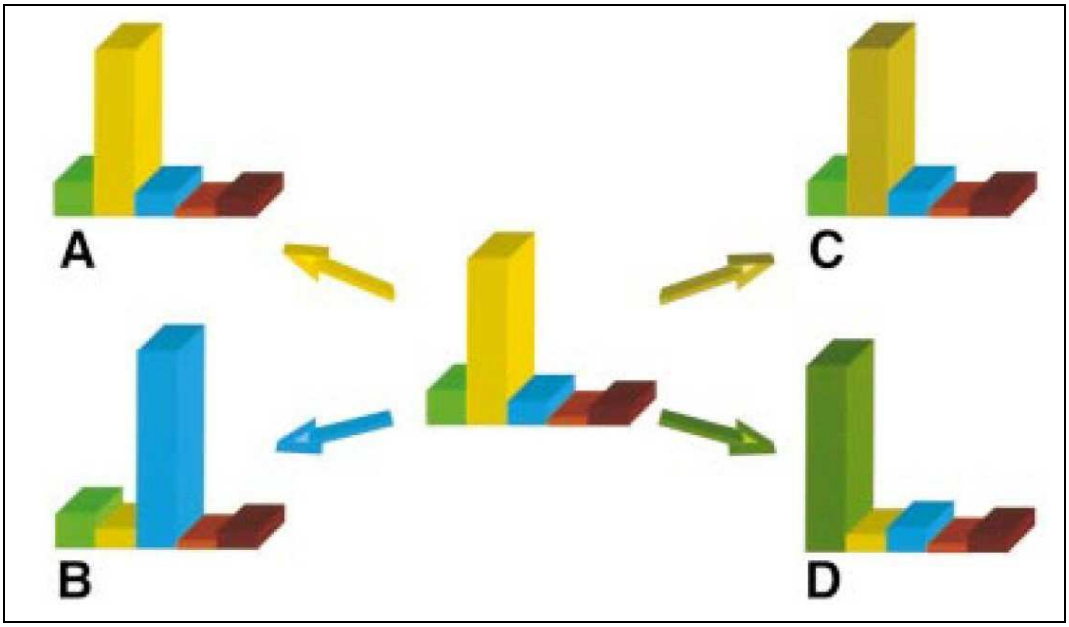


Figura 12. Representación esquemática de una biblioteca de ADN satélite compuesta por cinco satélites que se muestran en diferentes colores. La altura de cada columna denota el número de copias, mientras que el cambio en color representa la divergencia en la secuencia. (A) en la especie (o población) ancestral hipotética se encuentra el repertorio nucleotídico y de número de copias a partir del cual divergen las restantes. (B) La variación en el perfil de ADN satélite se consigue por un cambio en el número de copias de una o más variantes, variando 2 en este caso. (C) El perfil de ADN satélite cambia debido a la divergencia en la secuencia nucleotídica de una variante y posterior homogenización, mientras que el número de copias se mantiene invariante. (D) Variación en el perfil de ADN satélite causada por la concurrencia de fluctuaciones en el número de copias y de la secuencia nucleotídica en una o más variantes de la biblioteca. Tomado de Ugarkovic y Plohl (2002).

1.6.4 SRPC: principal ADN satélite de los tuco-tucos

La línea de investigación en la que se inscribe el presente trabajo de tesis tiene su inicio en el trabajo de Rossi (1990) en el que caracterizó el principal ADN satélite de los tuco-tucos. El satélite fue llamado Secuencia Repetida *Pvu II* de *Ctenomys* (SRPC, o RPCS en inglés, Rossi, Reig y Zorzópulos 1990), debido a que fue aislada por presentar un típico patrón en escalera en experimentos de *Southern blot* cortando ADN genómico con la enzima de restricción *Pvu II*. A través de análisis de *Southern* y *dot blot* se determinó que esta secuencia estaba presente en *C. porteousi*, *C. mendocinus*, *C. azarae*, *C. australis*, *C. talarum* y *C. latro* en

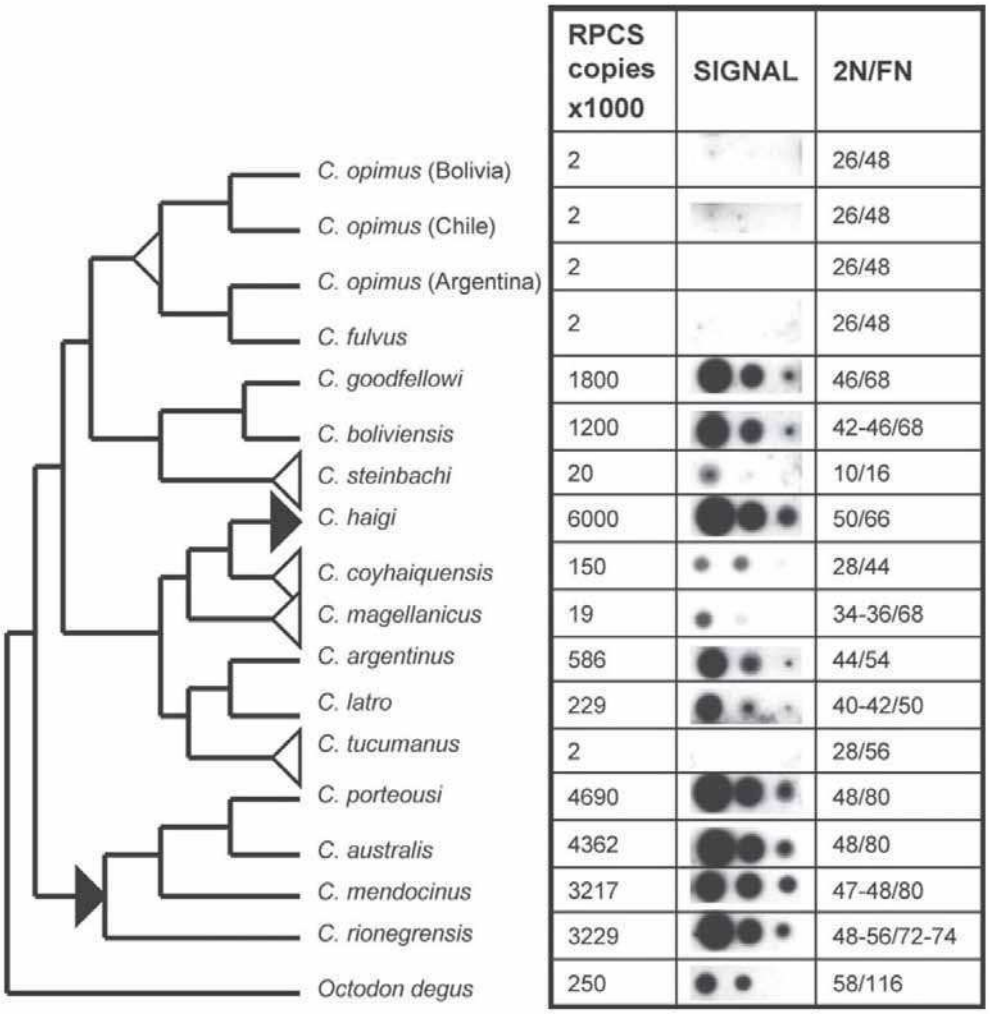
alto número de copias, en *C. tuconax* y *C. occultus* en bajo número de copias, mientras que en *C. opimus* fue indetectable (Rossi, Reig y Zorzópulos 1990). Una secuencia con una identidad mayor al 40⁄ con SRPC está presente en el genoma de los octodontinos *Octodontomys gliroides* y *Octodon degus*, sólo detectable en hibridaciones utiizando el monómero de SRPC como sonda en condiciones de baja rigurosidad (6X SSC, 60°C) (Rossi, Reig y Zorzópulos 1990). También en condiciones de baja rigurosidad *C. opimus* produjo señal detectable, lo que podría indicar la presencia de otra familia de ADN satélite, relacionada a SRPC, tanto en esta especie como en los géneros del grupo hermano a *Ctenomys* (Rossi *et al* 1995a).

Las unidades de repetición de SRPC tienen 348 pb de largo, y el análisis de la secuencia nucleotídica reveló una alta identidad de secuencia con las *long terminal repeats* retrovirales (LTR), en particular con la región U3 del LTR del virus del Sarcoma de Rous, incluyendo su promotor, y otras secuencias regulatorias de la transcripción (Rossi *et al* 1995a). Si bien SRPC no produciría transcriptos detectables por *Northern blot*, algunas regiones de la secuencia son capaces de unir factores de transcripción, lo que sugiere que esta secuencia podría tener efectos sobre la expresión de genes cercanos (Pesce *et al* 1994; Rossi *et al* 1995a). Notablemente SRPC contiene una subsecuencia con un 73⁄ de identidad con una secuencia consenso de 11 pb presente el origen de replicación de los cromosomas de levaduras: ARS (*Atonomous Replication Sequence*) (Raghuraman *et al* 2001). Si bien la naturaleza exacta de los orígenes de replicación en eucariotas es dudosa (Aladjem y Fanning 2004), la presencia de una secuencia que pueda actuar como origen de replicación funcional en SRPC puede conferirle a un episoma hipotético originado por entrecruzamiento intracatenario la posibilidad de amplificarse por círculo rodante (Rossi, Reig y Zorzópulos 1990; Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007).

De un total de ocho especies estudiadas de *Ctenomys*, en todas salvo en *C. opimus*, SRPC es el principal componente de la heterocromatina constitutiva, como revelaron estudios de hibridación *in situ* (Rossi *et al* 1995b) en los que el patrón de distribución de SRPC coincide globalmente con el de las bandas heterocromáticas C+. El ADN satélite SRPC está distribuido en regiones teloméricas, en brazos enteros, en bloques pericentroméricos y bandas intersticiales. En el grupo *mendocinus*, los polimorfismos en las cantidades de heterocromatina (Massarini *et al* 1991) fueron corroborados por FISH utilizando sondas de monómeros de SRPC. Este grupo es el que tiene mayores cantidades de heterocromatina entre los tuco-tucos (ver

ítem 1.5.4 de la Introducción), y también es el de mayores cantidades de SRPC (después de *C. haigi*) (Rossi, Reig y Zorzópulos 1993).

La evolución del número de copias de SRPC fue analizada en el contexto de la filogenia y contando con la información cariotípica de la mayor parte de los grupos de especies de *Ctenomys* (Slamovits *et al* 2001). En un árbol obtenido a partir de citocromo b, se mapeó el número de copias de SRPC obtenido por *dot blot*, y se reconstruyeron los estados de los nodos ancestrales tratando al número de copias como carácter continuo. A partir de la reconstrucción del número de copias de SRPC a lo largo del árbol de *Ctenomys*, se evidencia que SRPC habría sufrido múltiples expansiones y contracciones independientes a lo largo de la filogenia de los tuco-tucos, y que estas fluctuaciones habrían sido acompañadas por reestructuraciones cariotípicas. El análisis permitió identificar dos patrones contrastantes de evolución de SRPC en relación a la variabilidad cromosómica en los distintos linajes del género: un patrón caracterizado por una alta variabilidad en el número de copias en especies cercanamente emparentadas, acompañada por una sustancial variabilidad cariotípica. El otro patrón se caracteriza por mostrar una menor amplitud en el rango de número de copias de SRPC, patrón observado en clados cariotípicamente estables (Figura 13). Estos patrones llevaron a los autores del trabajo a postular que un satélite activo, independientemente de su número de copias, es decir, un satélite que aún en bajo número de copias esté involucrado en procesos de expansión, contracción y movilización a través del genoma, puede promover reestructuraciones cromosómicas. En un trabajo ulterior, Cook y Salazar Bravo (2004) analizaron especies bolivianas y encontraron que los patrones de variabilidad de SRPC se corresponden con las variaciones en los patrones de distribución de la heterocromatina, y a su vez con la variabilidad cromosómica, ampliando el rango de especies en los que se cumplen los patrones descriptos por Slamovits y colaboradores (2001).



RPCS copies x1000	SIGNAL	2N/FN
2		26/48
2		26/48
2		26/48
2		26/48
1800		46/68
1200		42-46/68
20		10/16
6000		50/66
150		28/44
19		34-36/68
586		44/54
229		40-42/50
2		28/56
4690		48/80
4362		48/80
3217		47-48/80
3229		48-56/72-74
250		58/116

Figura 13. Árbol filogenético de especies de los principales grupos de Ctenomys y evolución del número de copias de SRPC. Los triángulos blancos y negros representan deleciones y amplificaciones extensivas, respectivamente. En las primeras dos columnas de la tabla se muestra el número de copias de SRPC, numéricamente, por genoma, y los resultados de las autorradiografías de experimentos de dot blot. En la tercera columna se muestran los números cromosómicos y fundamentales. Modificado de Slamovits y colaboradores (2001).

La presencia de SRPC en casi todas las especies de *Ctenomys*, indicaría que esta secuencia debió estar presente en el ancestro común de los tuco-tucos (Rossi, Reig y Zorzópulos 1990). Esta premisa llevó a Ellingsen, Slamovits y Rossi (2007) a preguntarse si las variantes actuales de SRPC pertenecen a una biblioteca ancestral, o si por el contrario, mediante procesos de mutación, homogenización y fijación las variantes persistentes son posteriores a los eventos de cladogénesis dentro del género. En un análisis que involucró 10

especies de *Ctenomys* de grupos filogenéticamente diferenciados, Ellingsen, Slamovits y Rossi (2007) obtuvieron secuencias genómicas consenso de SRPC, mediante amplificación por PCR con cebadores específicos anclados en los monómeros, y posterior secuenciación del producto de la amplificación con los mismos cebadores. Estas secuencias revelan el perfil nucleotídico global de SRPC en un genoma, y los sitios con variables dentro de un mismo genoma, denominados *polimorfismos intragenómicos* (*ip*s) eran evidenciados por la presencia de más de un pico en una posición determinada de los electroforegramas. A través de la comparación de los perfiles genómicos globales de SRPC, los autores del trabajo reforzaron la hipótesis de la existencia de una biblioteca ancestral de SRPC común a *Ctenomys* sobre la base de dos resultados:

1) ninguna de las posiciones variables exhibe completa fijación, cuando 2 especies poseen diferentes variantes fijadas, otra/s especies poseen *ip*s con ambas variantes.

2) los polimorfismos intragenómicos (*ip*s) compartidos entre especies no reflejan en todos los casos la relación filogenética entre ellas.

1.7 Propuesta, hipótesis y objetivos del trabajo

El presente trabajo de tesis pretende integrar aspectos filogenéticos, cromosómicos, y de la dinámica de la principal secuencia de ADN satélite en la evolución del grupo de especies de roedores del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) de la provincia de Corrientes.

Las hipótesis de este trabajo son:

Hipótesis I: Los linajes del grupo Corrientes constituyen un grupo monofilético.

Hipótesis II: Las especies nominales del grupo Corrientes (*C. roigi, C. perrensi y C. dorbignyi*) son monofiléticas.

Hipótesis III: El flujo génico actual o reciente entre las poblaciones del grupo Corrientes sería mínimo o nulo, y se vería reflejado en la monofilia recíproca de todas las poblaciones, producto de una estructuración completa.

Hipótesis IV: La evolución cromosómica está asociada con la dinámica de expansión/contracción del satélite SRPC. Las especies del grupo Corrientes que presentan estabilidad cariotípica (*C. roigi, C. perrensi y C. dorbignyi*) presentan estabilidad en el número

de copias de SRPC, mientras que en las formas del complejo *Ctenomys* sp, que presentan alta variabilidad cariotípica, muestran diferencias en el número de copias.

Hipótesis V: Los reordenamientos más frecuentes ocurridos en la evolución del grupo Corrientes serían de tipo robertsoniano.

Hipótesis VI: Los cambios en el número fundamental (NF) se habrían producido principalmente por inversiones pericéntricas.

Hipótesis VII: Los cambios en el número fundamental (NF) no habrían sufrido reversiones o paralelismos en el grupo Corrientes. Esta hipótesis predice que los cariomorfos con NF derivados formarán grupos monofiléticos.

Hipótesis VIII: La variantes actuales de la secuencia SRPC estaban presentes en una "biblioteca" de variantes ancestrales, que sufrió expansiones y contracciones independientes, por lo que SRPC presentará niveles mayores de variabilidad en los genomas con menor número de copias e inversamente, secuencias más homogéneas en genomas con mayor número de copias.

Objetivos

Los objetivos de esta tesis son estudiar la filogenia del grupo Corrientes utilizando secuencias mitocondriales (región *D-loop*, citocromo b y citocromo oxidasa I), completar los estudios cromosómicos de las poblaciones para las que no hubiera datos y obtener los cariogramas de todos los individuos a incluir en la filogenia, y estimar la evolución del número de copias y de la secuencia nucleotídica del ADN satélite SRPC en las poblaciones de este grupo. La integración de estos tres niveles -filogenético, genómico-molecular y cromosómico- es fundamental para comprender aspectos claves de la evolución de este complejo de especies y formas. Particularmente se pretende evaluar la monofilia del grupo Corrientes, así como de las tres especies descriptas en el grupo. La combinación de estos aspectos permitirá no sólo conocer los procesos ocurridos en la evolución de este grupo de tuco-tucos, sino también aportará a la delimitación de especies y linajes, aún no resuelta en este grupo, que, sumados a estudios a nivel ecológico y morfológico, puedan ser útiles para definir unidades de conservación en el territorio correntino.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Individuos examinados

Se estudiaron 73 individuos colectados entre octubre de 2007 y octubre de 2010 utilizando trampas cepo en 23 localidades correntinas que se detallan en la Tabla 2. Adicionalmente, en octubre de 2010 se colectaron 4 individuos de la localidad de Médanos (33° 25' 18.4' S; 59° 06' 15.6''W), Entre Ríos, Argentina, descriptos como *C. pearsoni* (Reig y Kiblisky 1969; Ortells, Contreras y Reig 1990; García *et al* 2000b) . Además de 2 individuos de Médanos, en los análisis filogenéticos se incluyeron 8 individuos correspondientes a 7 especies de *Ctenomys* candidatas a grupo externo: *C. rionegrensis*, *C. conoveri*, *C. torquatus*, *C. minutus*, *C. argentinus* y *C. pearsoni* (de la localidad tipo, Colonia, Uruguay). De estos 8 individuos se utilizaron tejidos conservados en etanol 100⁄ y forman parte de dos conjuntos de muestras incluidas en Slamovits y colaboradores y referencias (2001), y Parada y colaboradores (2011) (individuo EV1454).

En este trabajo de tesis se pretendió tener una correspondencia completa de los individuos incluidos en los análisis cromosómicos, filogenéticos y de evolución de SRPC. Sin embargo no fue posible que tal correspondencia fuera total, debido a la secuenciación cronológica de los experimentos (análisis de SRPC, cromosomas y filogenia), a que los viajes de campaña fueron realizados en el transcurso de la tesis, y a que no todas las muestras de tejido de un individuo fueron procesables.

Un total de 50 individuos correntinos de 18 poblaciones fueron incluidos en los análisis de evolución nucleotídica y del número de copias de SRPC. La filogenia mitocondrial se basó en 2 individuos por población de 23 poblaciones correntinas y los 10 candidatos a grupo externo mencionados más arriba. En los análisis cromosómicos se estudiaron 33 individuos pertenecientes a 11 localidades correntinas.

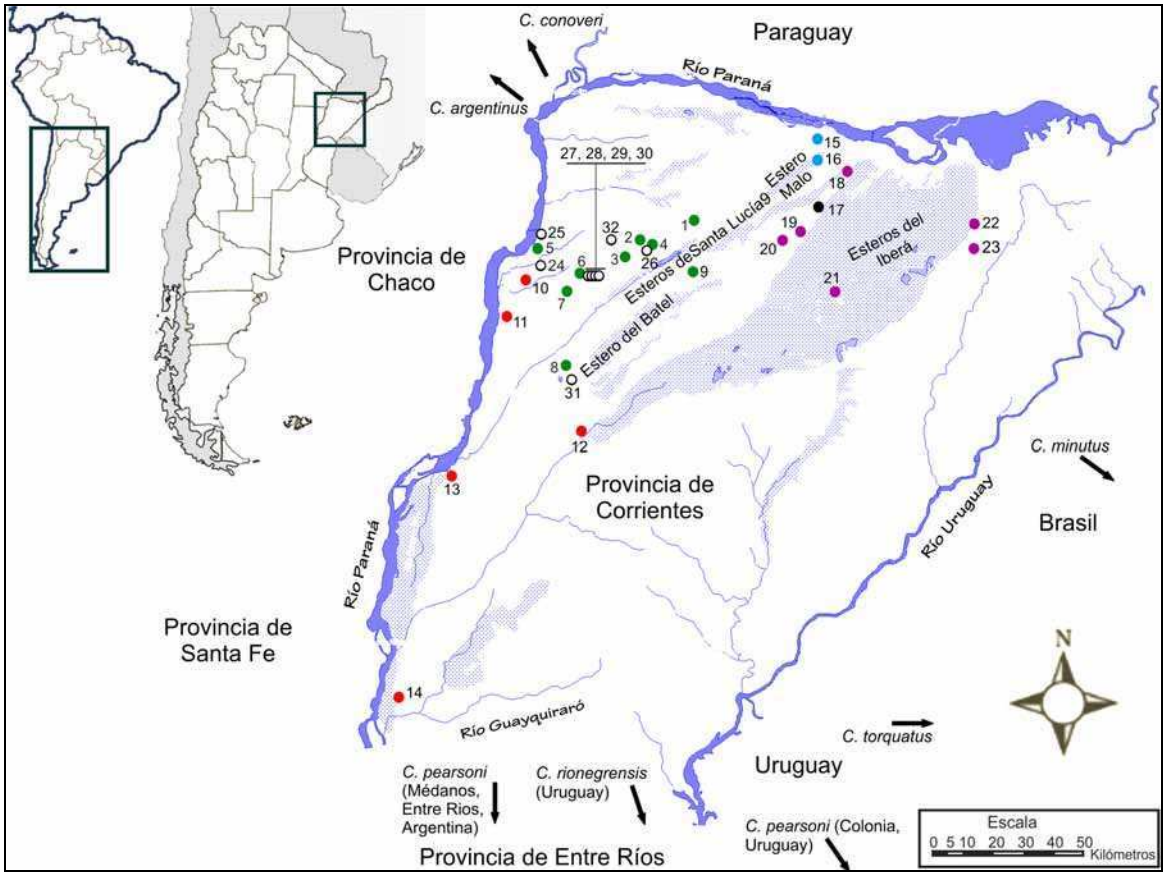


Figura 14. Mapa que muestra las localidades donde se describieron cariotipos de tuco-tucos en Corrientes. Los círculos en color y el negro se corresponden con los colores asignados a los principales clados en la filogenia mitocondrial obtenida en este trabajo. Los círculos con centro blanco son poblaciones no muestreadas en este trabajo. Los nombres de las localidades son: (1) Manantiales, (2) Loma Alta, (3) Pago Alegre, (4) Mburucuyá, (5) Estancia San Luis, (6) Saladas, (7) Saladas Km-Sur, (8) San Roque, (9) Santa Rosa, (10) Rincón de Ambrosio, (11) Colonia 3 de abril, (12) Chavarría, (13) Goya, (14) Paraje Sarandicito, (15) Mbarigüí, (16) Paraje Angostura, (17) Curuzú Laurel, (18) Loreto, (19) San Miguel, (20) Paraje Caimán, (21) San Alonso, (22) Estancia La Tacuarita, (23) Contreras Cué, (24) Colonia Brougnes, (25) Costa Mansión, (26) Estancia Rosarito, (27) Paraje Santo Domingo, (28) Ruta Saladas-Mburucuyá Km7, (29) Pago de los deseos Km 10, (30) Ruta Saladas-Mburucuyá Km 10-12, (31) M.F. Mantilla, y (32) Yataytí-Calle. La dirección hacia la distribución geográfica de los grupos externos utilizados en la filogenia está demarcada con flechas negras. Los principales cuerpos de agua, como ríos y esteros, se muestran en azul.

Localidad	Latitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Código de mapa	Individuos incluidos en		
				Análisis cromosómicos	Análisis filogenéticos	Análisis SRPC
Chavarría	28° 58'	58° 35'	12	151, 152 (hembras) 149, 150, 153 (machos)	149, 153	149, 150, 151, 152, 153
Colonia 3 de Abril	28° 23' 26.9''	58° 53' 37.5''	11	-	065, 066	065, 066
Contreras Cué	28° 05' 28.6"	56° 33' 53.7''	23	-	199, 211	199
Curuzú Laurel	27° 55' 24.4''	57° 29' 23.5''	17	220, 221 (hembras) 222 (macho)	221, 222	086, 092
Estancia la Tacuarita	27° 58' 42.7"	56° 33' 40.6''	22	-	204, 205	203, 204, 205
Estancia San Luis	28° 06' 43.7''	58° 51' 48.1''	5	236, 237 (hembras) 238, 239 (machos)	238, 239	018, 023, 053, 054
Goya	29° 11' 17.2"	59° 12' 36.7''	13	183, 184 (hembras) 181, 182 (machos)	181, 183	181, 182, 183, 184
Loma Alta	28° 05' 02.5"	58° 19' 29.9''	2	-	177, 179	177, 179
Loreto	27° 44' 43.7''	57° 14' 35.2''	18	-	156, 223	076, 156
Manantiales	27° 57' 54.5"	58° 07' 20.9''	1	-	012	-
Mbarigüí	27° 33'	57° 31'	15	174 (hembra)	174	174
Mburucuyá	28° 05' 51.4"	58° 16' 38.6''	4	-	005	-
Pago Alegre	28° 08' 53.0''	58° 21' 44.8''	3	-	041, 043	038, 041, 043, 044
Paraje Angostura	27° 33'	57° 31'	16	-	161	161

Localidad	Latitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Código de mapa	Individuos incluidos en		
				Análisis cromosómicos	Análisis filogenéticos	Análisis SRPC
Paraje Caimán	28° 03' 03.1"	57° 40' 38.4''	20	225, 226, 228 (hembras) 227 (macho)	227, 228	-
Paraje Sarandicito	30° 14' 43.1"	59° 33' 46.1''	14	212 (hembra) 213 (macho)	212, 213	-
Rincón de Ambrosio	28° 15' 05.2"	58° 53' 40.9''	10	-	175, 176	175, 176
Saladas	28° 14' 20.3''	58° 37' 40.4''	6	128, 129 (hembras)	128, 129	128, 129
Saladas Km Sur	28° 17' 37.5''	58° 41' 19.2''	7	134 (hembra)	131, 132	131, 132, 133, 134
San Alonso	28° 17' 06.3"	57° 24' 45.0''	21	-	186, 187	186, 187, 188, 190
San Miguel	28° 00' 58.6"	57° 36' 19.2''	19	-	214, 217	-
San Roque	28° 41'	58° 42'	8	135, 136 (hembras) 137 (macho)	135, 136	135, 136, 137
Santa Rosa	28° 10' 47.4''	58° 08' 11.5''	9	229, 231 (hembras) 230, 232 (machos)	229, 230	122, 125, 180

Tabla 2. Resumen de localidades de muestreo, coordenadas geográficas, ubicación en el mapa (Figura 14), y código de los individuos incluidos en los análisis cromosómicos, filogenéticos y de SRPC.

2.2 Preparación de las muestras para posterior extracción de ADN

Se cortó una falange de una extremidad posterior por individuo, y en algunos casos se tomó una muestra de una porción de oreja, que resultó igualmente efectiva en cuanto a la cantidad e integridad del ADN extraído. Los animales fueron liberados, luego de que se les tomara la muestra de tejido, en la boca de la misma tuquera de la que fueran extraídos. En el caso de los animales destinados a los análisis citogenéticos, al ser sacrificados, se colectaron

otros órganos como patas enteras, colas y el hígado. Todos los tejidos fueron fijados en etanol 100⁄ en el campo y se cambió el fijador al llegar al laboratorio y se conservaron a 4°C.

2.3 Preparación de las muestras para análisis citogenéticos

Se inyectó a los individuos con una solución de colchicina (1µg/g de peso corporal). Al cabo de 1:30 hs los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron inmediatamente ambos fémures. Las apófisis de los fémures se removieron y se lavó la médula ósea con una jeringa cargada con 2,5 ml de una solución hipotónica de KCl 0,075 M (cada fémur). Los 5 ml totales de médula en solución hipotónica fueron colectados en tubos plásticos de 15 ml y mantenidos en el puño de la mano durante 15 minutos. Luego, se centrifugaron los tubos con una centrífuga de campo a unas 800 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó fijador Carnoy compuesto por metanol:ácido acético en proporciones 3:1, frío y preparado el mismo día. Se repitió el procedimiento de centrifugación y cambio de fijador dos veces más en el campo, y una última vez al llegar al laboratorio. Se conservaron las médulas fijadas de esta forma a 4°C hasta la confección de preparados citogenéticos.

2.4 Extracción y purificación de ADN genómico

Para obtener ADN genómico se tomó una muestra de aproximadamente 30 mg de tejido fijado en etanol (hígado o falanges) y se la lavó con solución fisiológica. La fracción de tejido cortada y lavada se introdujo en un tubo plástico de 1,5 ml y se disgregó utilizando una tijera de disección. Utilizando kits de extracción de ADN (Promega) se obtuvo ADN purificado resuspendido en 50 a 100 µL de agua ultrapura (agua destilada, desionizada grado MiliQ®) autoclavada. Los tratamientos del kit de purificación se resumen a continuación:

- Incubación a 65° en solución de lisis 30 por min. Incubación con 17,5 µl de proteinasa K (20mg/ml) a 55°C por 2 hs, mezclando por inversión cada 30 min. Incubación con 3 µl de RNAsa (4mg/ml) a 37°C por 30 min. Precipitación de proteínas, recuperando sobrenadante. Precipitación de ADN con alcohol isopropílico y 3 lavados con etanol 70⁄ . Secado y resuspensión en agua ultrapura.

Cuantificación del ADN

Las muestras de ADN extraídas fueron cuantificadas con un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Se consideraron puras las muestras que tenían una relación de absorbancias 260 nm/ 280 nm mayor o igual a 1,8, para asegurarse que los valores de absorbancia a 260 sólo reflejaran la concentración de ADN y no sumara la de proteínas contaminantes.

2.5 Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa 0,8／ y 1,2／ para correr ADN genómico total y productos de PCR respectivamente. Los geles se prepararon con una solución de bromuro de etidio y buffer TBE. Se utilizó fago lambda cortado con la enzima de restricción HindIII (Invitrogen) como marcador de peso molecular en los geles de ADN genómico, mientras que para los de productos de PCR se utilizó el marcador 100 bp ladder (Promega). Los geles se observaron en transiluminador UV con cámara e impresora incorporadas (modelo Eclypse, Fotodyne Inc.).

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction)

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar secuencias del principal ADN satélite presente en el genoma de *Ctenomys* (SRPC) y obtener la mezcla de amplicones de SRPC utilizada en los experimentos de hibridación en puntos (*dot blot*), así como para obtener la secuencia nucleotídica completa de SRPC. También se amplificaron por PCR los 3 *loci* mitocondriales utilizados como marcadores filogenéticos: región control (*D-loop*), citocromo oxidasa I (COI) y citocromo b (cyt-b). En el diseño de todos los cebadores incluidos en este trabajo se procuró que el extremo 5’ comenzara con C o G dado que producen un apareamiento más estable que A o T. Se contempló además que los pares de cebadores tuvieran temperaturas de apareamiento similares y no formaran heteroduplex, ni homoduplex, ni estructuras secundarias de más de 3 bases utilizando el programa Oligo Analizer (Integrated DNA Technologies). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador de tapa caliente Mastercycler Pro S vapoprotect (Eppendorf), en microtubos de 200µl utilizando un volumen de reacción de 50µl.

2.6.1 Diseño de cebadores específicos de SRPC

El objetivo de amplificar SRPC por PCR fue obtener secuencias en las que se recuperara la mayor cantidad de variantes de los monómeros existentes en un genoma. Al secuenciar en

simultáneo el conjunto de variantes amplificadas a partir del genoma de un individuo se obtiene una secuencia que posee polimorfismos debidos a la variabilidad existente entre monómeros de un mismo genoma. A esta secuencia se la llamó *secuencia genómica consenso* (*sgc*) (se siguió una metodología análoga a la de Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007) y se obtuvo una única *sgc* por individuo (que resultó polimórfica en todos los casos). La *sgc*, entonces, corresponde a la secuencia superpuesta de los monómeros mayoritarios en el genoma de un individuo.

Se diseñaron cebadores específicos de SRPC ubicados en regiones conservadas de secuencias preliminares obtenidas con los cebadores SRPC17U y SRPC325L descriptos por Ellingsen, Slamovits y Rossi (2007). A partir de este par de cebadores utilizados para otras especies de *Ctenomys*, se obtuvo una *secuencia genómica consenso* para 10 individuos pertenecientes a 10 poblaciones correntinas. Con el segundo par de cebadores se obtuvieron nuevas *sgc* y se rediseñó el par original de cebadores de modo que contemplaran la totalidad de la variabilidad revelada en las *sgc*.

Los amplicones obtenidos con los dos pares definitivos de cebadores fueron llamados A (U-175 y L-157) y C (U-48 y L-346). Estos amplicones se superponen parcialmente y en conjunto abarcan el largo total del monómero de SRPC (348pb). A fin de recuperar la mayor cantidad de variantes de SRPC en las amplificaciones, incluso las variantes relativamente minoritarias, se emplearon posiciones degeneradas en el extremo 3' de dos de los cebadores así como bajas temperaturas de apareamiento y concentraciones medias de $MgCl_2$ (2,5 mM) en el protocolo de PCR. Combinando los cebadores U-175 y L-346 se obtuvo un tercer amplicón B, pero al no agregar nueva variabilidad en los análisis preliminares, no se lo amplificó para el conjunto total de muestras, y por lo tanto fue excluido de los análisis.

Cebadores específicos de SRPC de Corrientes:

U-175: 5' CAACTTYGCMTATACTTTCTCTT3'

L-157: 5'CAAAAGAGATACAGGCACAWN3'

U-48: 5' GASCACAAGMAATBMCMTCTTG3'

L-346: 5' GCTCCAGCTTCWTTGGGAAN3'

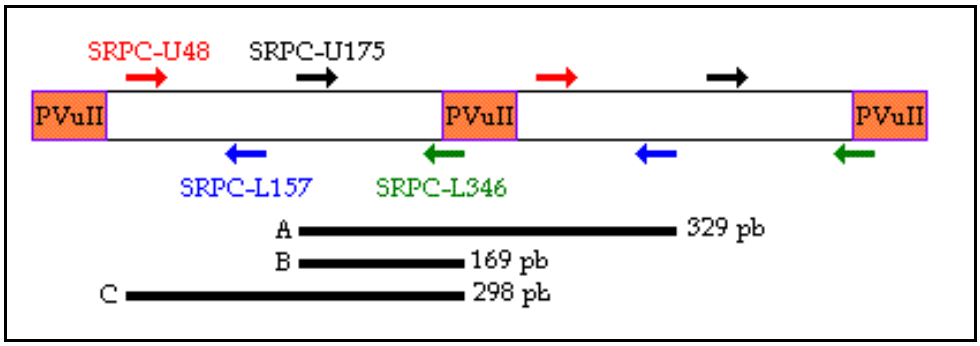


Figura 15. Esquema de las posiciones relativas de los cebadores específicos de SRPC. Los pares U-175, L-157 y U-48, L-346 definen los amplicones A y C, respectivamente y engloban la longitud completa de un monómero de SRPC. El amplicón B fue excluido por no aportar variabilidad extra al análisis. Los sitios PvuII fueron elegidos arbitrariamente como origen de la secuencia.

2.6.2 Protocolo PCR SRPC

Se utilizó el mismo protocolo para la obtención de los amplicones A y C.

Componentes de la reacción	Concentración final (1X)
$MgCl_2$	2,5 mM
Buffer PCR	20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl
Taq Polimerasa	0,05 Unidades/µl
dNTPs	0,2 mM
Cebador directo	2 µM
Cebador reverso	2 µM
Muestra de ADN	0,2 ng/µl

El programa de termociclado fue el siguiente:

1- Desnaturalización inicial por 5 min a 94 °C.

2- Desnaturalización a 94 °C por 1 min.

3- Apareamiento a 48°C por 1 min.

4- Elongación a 72 °C por 45 seg.

5- Repetición 34 ciclos más desde paso 2 hasta paso 4.

6- Elongación final a 72 °C por 5 min.

7- Finaliza a 15 °C.

En los casos en que los productos de PCR eran escasos, se llevaron a cabo 55 ciclos de repetición de los pasos de 2 a 4, en lugar de 35.

2.6.3 Diseño de cebadores específicos de loci mitocondriales

Se siguió la misma estrategia general en el diseño de los cebadores específicos para los 3 *loci* mitocondriales incluidos en este trabajo. Se alinearon las secuencias de los grupos taxonómicos más cercanos a *Ctenomys* de Corrientes y se eligieron regiones conservadas de alrededor de 20 pb que cumplieran con los criterios detallados en la sección 2.6. Luego se realizaron amplificaciones de prueba con 5 a 10 muestras y se corrieron geles de productos de PCR en los que se constató la obtención de una única banda del tamaño esperado. Esta banda debía coincidir con el número de bases flanqueadas por los cebadores en los alineamientos. Consecutivamente, los productos de PCR fueron purificados y secuenciados, corroborándose la identidad de secuencia con aquéllas alineadas.

Los pares de cebadores resultantes, para los tres marcadores mitocondriales se resumen en la siguiente tabla:

Locus	Cebador	Secuencia
D-loop	TUCO-Dloop-F	5’ TTCTAATTAAACTATTTCTTG 3’
	TDKD*	5’ CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3’
Citocromo b	TUTU-F	5’ CCTTCATAGGCTACGTAC 3’
	TUTU-R	5’ CTTCATTTGAGTAGTTTAT 3’
Citocromo oxidasa I	COI CT F	5’ CTGTNYTTAGATTTACAGTCTAA 3’
	COI CT R	5’ GGGTGNCCRAARAATCARAA 3’

Tabla 3. Nombres de los cebadores específicos de *loci* mitocondriales y sus secuencias. Todos los cebadores fueron diseñados en este trabajo salvo TDKD, diseñado por Kocher y colaboradores (1989).

Con estos cebadores se amplificó un fragmento parcial de 482 pb de la región 5’ de *D-loop* (TUCO-Dloop-F y TDKD), un fragmento de 760 pb del extremo 3’ de la secuencia

codificante del gen de citocromo b (TUTU-F y TUTU-R), y un fragmento de 775 pb involucrando 53 pb de la secuencia no codificante flanqueante y 722pb del extremo 5' de la secuencia codificante del gen de COI (COI CT F y COI CT R).

2.6.4 Protocolos de amplificación por PCR loci mitocondriales

En la siguiente tabla se resumen las condiciones de reacción de PCR para la amplificación de *D-loop*, cyt-b y COI:

Componentes de la reacción	Concentración final (1X)
$MgCl_2$	2,5 mM
Buffer PCR	20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl
Taq Polimerasa	0,05 Unidades/µl
dNTPs	0,2 mM
Cebador directo	0,4 µM
Cebador reverso	0,4 µM
Muestra de ADN	0,5 -2 ng/µl

El programa de termociclado de *D-loop* fue el siguiente:

1- Desnaturalización inicial por 1 min a 94 °C.

2- Desnaturalización a 94 °C por 30 seg.

3- Apareamiento a 52°C por 30 seg.

4- Elongación a 72 °C por 30 seg.

5- Repetición 29 ciclos más desde el paso 2 hasta el 4.

6- Elongación final a 72 °C por 5 min.

7- Finaliza a 15 °C.

El programa de termociclado de cyt-b fue el siguiente:

1- Desnaturalización inicial por 5 min a 94 °C.

2- Desnaturalización a 94 °C por 1 min.

3- Apareamiento a 49°C por 1 min.

4- Elongación a 72 °C por 1 min.

5- Repetición 29 ciclos más desde el paso 2 hasta el 4.

6- Elongación final a 72 °C por 5 min.

7- Finaliza a 15 °C.

El ciclado térmico del programa para amplificar COI fue el mismo que el utilizado para cyt-b, salvo que la temperatura de apareamiento fue de 53°C.

2.7 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa 1,2⁄ y aquéllos que dieran bandas en cantidades esperadas fueron purificados de dNTPs, Taq polimerasa y cebadores, utilizando Purelink Purification Kit (Invitrogen) para su posterior secuenciación (SRPC, *D-loop*, cyt-b y COI) y en el caso de SRPC, además para ser utilizados como sondas y curvas de calibración en experimentos de hibridación.

2.8 Secuenciación

Los amplicones purificados fueron enviados en las concentraciones requeridas, junto con los cebadores utilizados en la amplificación, a dos secuenciadores automáticos operados por terceros: al Servicio de Secuenciación y Genotipado, USFCEyN, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y cuando éste no estuvo disponible, a la empresa Macrogen (Corea del Sur).

En el caso de SRPC se secuenciaron ambas cadenas para cada amplicón en todos los individuos. Para los marcadores mitocondriales se secuenciaron ambas cadenas en 10 individuos y como no revelaron diferencias en los *contigs* obtenidos, se prosiguió secuenciando una única cadena por individuo.

2.9 Lectura de las secuencias

Los electroforegramas obtenidos fueron leídos con el programa Contig Express (Vector NTI 10.3.0 Invitrogen) y el alineamiento manual fue realizado con el programa Bioedit (Hall 1999). Las secuencias de *D-loop*, COI y cyt-b obtenidas en este trabajo fueron depositadas en GenBank con los números de acceso JX275502-JX275655.

2.10 Obtención de secuencias genómicas consenso

Una vez obtenidas las secuencias complementarias para un amplicón de SRPC en un individuo, se generó el complemento reverso de la cadena obtenida con el cebador L y se la alineó a la obtenida con el cebador U utilizando el programa Contig Express (Vector NTI 10.3.0 Invitrogen). De esta manera se podía comparar, base a base, la secuencia de un amplicón leyendo los electroforegramas obtenidos con los cebadores U y L. Llamamos *polimorfismo intragenómico* (*ip*) a la ocurrencia de 2 (raramente 3) picos en la misma posición de la secuencia. Los *ip*s revelan la existencia de monómeros con diferentes nucleótidos en una posición dada, mientras que la altura relativa de los picos que componen cada *ip* es indicadora de la cantidad relativa de esas variantes en un genoma individual (Figura 16). Los *ip*s sólo se tuvieron en cuenta si se corroboraban en ambas cadenas. Se anotaron en la secuencia del amplicón con la nomenclatura IUPAC. Las secuencias definitivas de los amplicones A y C, que abarcan el total de la secuencia monomérica de SRPC, fueron alineadas utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999), y mediante la generación de un consenso estricto de ambas secuencias se obtuvo la *secuencia genómica consenso* (*sgc*) para un individuo. La *sgc* representa, por lo tanto, las variantes de monómeros de SRPC en un individuo.

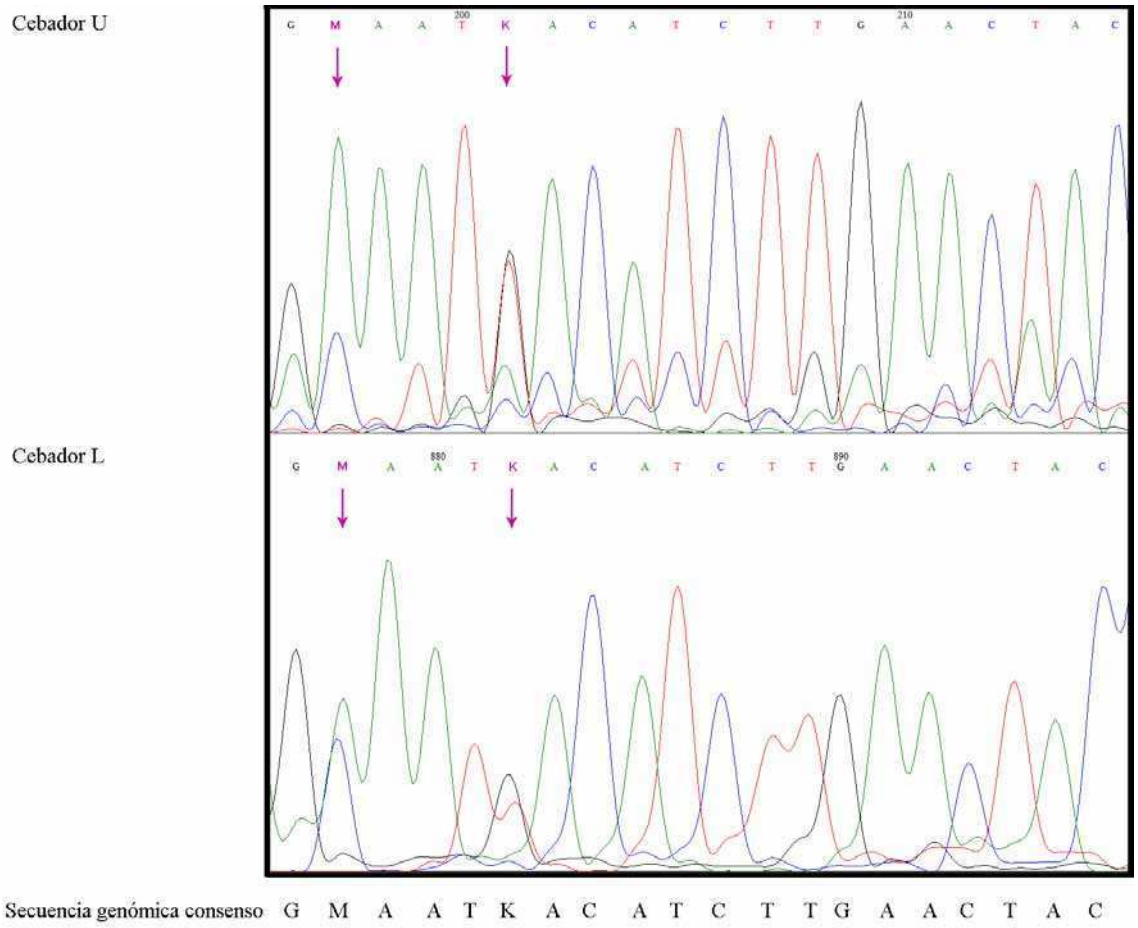


Figura 16. Identificación de *polimorfismos intragenómicos* (*ips*). En las secuencias de ambas cadenas (la de arriba corresponde a la lectura directa con el cebador U, y complemento inverso con el cebador L se muestra en la secuencia de abajo) se observan dos picos para una posición determinada. En el primer caso se corrobora la presencia de A y C, y en el segundo caso se corrobora la presencia de C y T. Ambos casos son *ip*s y son anotados con el código IUPAC en la *secuencia genómica consenso*: M y K, respectivamente. También se pueden observar picos menores en la posición anterior a cada base en la secuencia obtenida con el cebador U (arriba) pero son considerados un artefacto de la técnica, y no se obtienen en la lectura con el cebador de la cadena L (abajo).

2.11 Análisis de la variabilidad de los perfiles de SRPC entre y dentro de las poblaciones

La conversión génica fue testeada mediante un AMOVA utilizando el programa Arlequin 3.0 (Excoffier, Laval y Schneider 2005), asumiendo un único nivel de estructuración genética (cada población es independiente y engloba únicamente individuos, y no subgrupos), corriendo 20.000 permutaciones. Se utilizó el modelo de Jukes Cantor (1 parámetro) para los cálculos de distancias genéticas, dado que no asume diferentes costos de transformación.

Dado que no existen programas que computen distancias genéticas con caracteres de secuencias de ADN distintos de A, C, G y T, y en las secuencias genómicas consenso los ips incluyen más de una variante, debió elegirse sólo una de ellas. Como se dijo, en la mayor parte de los casos los *ip*s se compone de dos variantes. Casi todas las *sgc* (excepto el individuo 199 en la posición 9, Figura 35 en Resultados). Comparten la variante mayoritaria de los *ip*s; por ende, si se mantuvieran las variantes mayoritarias para todos los ips, se estaría subestimando la variabilidad global de las *sgc*. Por esta razón, se consideró la segunda variante en abundancia para los cálculos de distancia genética y el análisis de AMOVA. Los datos ingresados en Arlequin 3.0, secuencias genómicas consenso en las que los ips fueron reemplazados por la segunda variante en abundancia, emergen del consenso de miles de secuencias monoméricas, en los que los cambios en los perfiles mutacionales no ocurren por sustituciones nucleotídicas puntuales, sino por reemplazo de monómeros (o grupos de monómeros) enteros, debido a las ganancias y pérdidas de tándems de SRPC. Por esta razón, se eligió el modelo de menor número de parámetros.

2.12 Análisis de secuencias y búsquedas filogenéticas

2.12.1 Alineamiento y análisis de saturación de sustituciones

Las secuencias obtenidas con cada marcador mitocondrial fueron alineadas utilizando el programa Clustal X2 (Larkin *et al* 2007).

Las tres matrices resultantes fueron sometidas a pruebas de saturación utilizando el programa DAMBE (Xia y Xie 2001), llevando a cabo el test de Xia y colaboradores (2003), para evaluar si las secuencias retienen la señal filogenética. Como se explica en la introducción, este test se basa en el concepto de entropía, que es una función de la proporción de nucleótidos en cada carácter. El índice de saturación (I_{SS}) compara la entropía observada ($\overline{H}$) con la entropía esperada (H_{FSS}) (ver ítem 1.3.3.3.1 en Introducción). Se significó el índice de saturación ($I_{SS} = \overline{H} / H_{FSS}$) con el valor crítico ($I_{SS.C}$) tomando diferentes conjuntos de datos:

D-loop: sin distinción posicional.

Cyt-b: 1° y 2° posición de los codones, por un lado, y 3ra posición por otro.

COI: 1° y 2° posición de los codones, por un lado, y 3ra posición por otro.

Para realizar el test de Xia y colaboradores, el programa construye un árbol preliminar por métodos de distancia y se le debe ingresar un modelo de sustitución y la proporción de sitios invariantes, así como seleccionar un taxón como grupo externo. Los parámetros del modelo de evolución molecular que se ingresaron son los que arrojó como resultado el programa ModelTest 3.7 (Posada y Crandall 1998). El grupo externo que se eligió fue el individuo CA 426 perteneciente a *Ctenomys rionegrensis*.

2.12.2 Elección de modelo de sustitución nucleotídica

En las inferencias filogenéticas por métodos bayesianos fue necesario explicitar un modelo de evolución molecular que ajustara a los datos (la matriz de secuencias nucleotídicas) y fuese lo más simple posible (menor número de parámetros) de modo de disminuir tanto el error en la estimación, como el tiempo computacional empleado. Para elegir el modelo de sustitución nucleotídica que cumpliera con estas condiciones se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC; 1974) utilizando el programa ModelTest 3.7(Posada y Crandall 1998). Este abordaje metodológico compara simultáneamente todos los modelos (en contraposición con los tests que ensayan uno a uno modelos de complejidad creciente y de relación jerárquica). El AIC es un estimador que indica la cantidad de información que se pierde cuando se usa un modelo simple en comparación con uno más complejo, al tiempo que se penaliza el mayor número de parámetros. El modelo con menores valores de AIC es el que corresponde al modelo más simple que mejor ajusta a los datos. Se estimaron los modelos de evolución molecular mediante el AIC para los 3 marcadores por separado y también para la matriz de los 3 marcadores concatenados.

2.13 Inferencias filogenéticas

Se realizaron búsquedas filogenéticas con las matrices de secuencias alineadas de *D-loop*, cyt-b y COI, por separado y con una matriz de las 3 secuencias concatenadas, por 3 metodologías diferentes: análisis de distancias, máxima parsimonia y métodos bayesianos. Las búsquedas por máxima parsimonia y métodos de distancia se llevaron a cabo utilizando el programa PAUP 4.0 (Swofford 2003), y las búsquedas por métodos bayesianos con el programa MrBayes 3.1 (Ronquist y Huelsenbeck 2003).

2.13.1 Análisis de distancias

En las búsquedas por criterio de distancias se utilizó el algoritmo de construcción de árboles *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou y Nei 1987). El soporte de los nodos fue calculado mediante la realización de 10.000 réplicas por el método de *bootstrap*.

2.13.2 Análisis por máxima parsimonia

Debido a la imposibilidad de realizar búsquedas exactas cuando el número de taxones supera los 25-30, en las búsquedas realizadas por máxima parsimonia se utilizaron métodos heurísticos. Las búsquedas fueron realizadas con los mismo parámetros de memoria en todos los casos: 1000 RAS (árboles construidos por adición al azar de taxones utilizando el algoritmo de Wagner), hold=10 y TBR como algoritmo de permutación.

Se utilizaron 2 esquemas de pesado para las búsquedas por máxima parsimonia: pesos de caracteres y costos de transformación iguales para todas las posiciones; y pesos 2, 5 y 1 para las 1ra, 2da y 3ra posición del codón respectivamente (COI y cyt-b) y una tasa de transición/transversión = 6.

En los análisis con la matriz de secuencias concatenadas *D-loop*, al igual que en los respectivos a la secuencia no génica de COI, fueron pesados como la primera (2) y la tercera (1) posición de los codones de las secuencias codificantes. Se realizaron búsquedas tratando los *gaps* como dato faltante y como 5to carácter.

El soporte de los nodos fue calculado corriendo 1000 réplicas de *bootstrap* en las distintas condiciones de búsqueda detalladas y luego se resumieron los resultados computando un consenso de mayoría.

2.13.3 Análisis por métodos bayesianos

En los análisis bayesianos de los tres *loci* mitocondriales por separado se corrieron 4 cadenas de Markov por 300.000 generaciones y se muestrearon árboles cada 100 generaciones.

También se llevaron a cabo 2 corridas con la matriz de los 3 marcadores concatenados, por 1.000.000 generaciones y muestreando cada 100 generaciones:

-aplicando modelos de sustitución nucleotídica independientes para cada marcador. Los modelos en este caso son los mismos que se utilizaron en los análisis de los marcadores

por separado, que se eligieron por el criterio de información de Akaike (AIC) utilizando ModelTest 3.7 (Posada y Crandall 1998; ver ítem 2.12.2 en Materiales y Métodos).

-aplicando un único modelo de sustitución nucleotídica, obtenido también por la misma metodología que en el caso anterior, a partir de la matriz concatenada completa como si fuera una única partición de datos.

Para determinar cuándo las cadenas de Markov entraban en fase estacionaria se analizó la desviación estándar de las frecuencias de las particiones y se descartaron las muestras del periodo de *burn-in* (las generaciones previas a la fase estacionaria). El criterio que se eligió fue interrumpir los análisis cuando el desvío estándar de las frecuencias de particiones fuera menor a 0,01 y cuando la fase de *burn-in* correspondiera a lo sumo a 1/3 del total de generaciones. Se computó un consenso de mayoría con la distribución de árboles de la fase estacionaria, y donde la probabilidad posterior de un nodo se corresponde con la fracción de árboles de la distribución posterior que apoyan a ese nodo.

2.14 Análisis cromosómicos

Se realizaron preparados citogenéticos a partir de las células de médula ósea arrestadas en metafase y fijadas en solución de Carnoy, para su posterior procesamiento (ver ítem 2.3 en Materiales y Métodos). La obtención de preparados cromosómicos se realizó en el Laboratorio de Citogenética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,

2.14.1 Obtención de preparados cromosómicos

Los preparados se obtuvieron por método de goteo y shock térmico. Este método tiene por objeto conseguir la ruptura de la membrana celular y la maximizar la separación de los cromosomas evitando superposiciones de células y cromosomas.

Las suspensiones de células de médula ósea fijadas en solución de Carnoy fueron transferidas a hielo durante 10 minutos. Se utilizaron portaobjetos lavados sucesivamente con acetona, HCl 1 N, etanol 96⁄ y agua ultrapura. El protocolo del método de goteo que se siguió fue:

1. pipetear 25-35 ul de la suspensión de células con una pipeta plástica,
2. exponer por 1-3 segs la cara inferior del portaobjetos (la que no tendrá contacto con las células) al vapor de un baño de agua a 100°C,

3. con el portaobjetos en contacto con el vapor dejar caer 3-4 gotas de la suspensión de células fría desde una distancia de alrededor de 30 cm, y finalmente,

4. dejar secar los portaobjetos al aire.

Los preparados fueron revisados en un microscopio de contraste de fases (Leica DME) y se tomó registro de la ubicación de células en metafase mitótica con cromosomas definidos y separados. Finalmente se los guardó en cajas plásticas a 4°C para su posterior tinción.

2.14.2 Tinción con Giemsa

El recuento y análisis de la morfología cromosómica se realizó a partir de preparados cromosómicos teñidos en una solución 5⁄ Giemsa en agua destilada. La tinción se llevó a cabo en *coplins* de 100 ml, en agitación por 15 minutos. Luego los preparados fueron lavados con agua corriente para detener la coloración y eliminar restos de precipitados que pudiera producir el colorante. Los preparados teñidos se conservaron en cajas plásticas a 4°C.

2.14.3 Confección de cariogramas

Se fotografiaron al menos 25 metafases por individuo utilizando un microscopio Leica DMLB equipado con una cámara digital Leica DFC350 FX con programas de análisis de imágenes. Se concluía el fotografiado si en las 25-30 metafases se contaba el mismo número diploide y fundamental. En caso de haber variaciones en el recuento se agregaban 5 células más por cada discordancia. El objetivo de esta estrategia fue discriminar si la causa de la varianza en el recuento era instrumental o real, es decir, si se debía a un mosaicismo en el individuo o si, por el contrario, se contaba diferente número de cromosomas por superposición entre ellos o entre distintas metafases.

Las imágenes digitales se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA). Se recortaron los cromosomas y se ordenaron en dos grupos, bibraquiados y monobraquiados, y dentro de cada grupo, en orden decreciente de tamaño. Se confeccionó un mínimo de 5 cariogramas por individuo.

2.15 Estimación del número de copias de SRPC por método de dot blot

Para tener una estima del número de copias de SRPC se llevó a cabo la técnica de d*ot blot* o hibridación en puntos, consistente en hibridar sondas del ADN satélite con ADN genómico sembrado con una grilla de puntos circulares y fijado a un soporte mediante

crosslinking por irradiación con luz ultravioleta. Luego de la hibridación, se lava el soporte y se revela por exposición a una placa autorradiográfica. El número de copias de SRPC es proporcional a la cantidad de sonda hibridada y esta a su vez lo es en relación a la intensidad de los puntos de la placa.

2.15.1 Diseño de los experimentos

En cada experimento de *dot blot* se incluyeron tres pseudoréplicas de cada muestra de ADN genómico de modo de sembrar 20, 200 y 2000 ng totales respectivamente, obtenidos por diluciones seriadas 1:10 a partir de la más concentrada.

Además de las muestras de ADN genómico, se sembraron dos curvas de calibración: una a partir de ADN de una muestra de ADN genómico de un individuo de *Ctenomys* cuyo número de copias de SRPC había sido estimado en trabajos previos (ver ítem 2.15.1.2 de Materiales y Métodos) y la otra a partir de diluciones de una mezcla de amplicones A y C de SRPC obtenidos separadamente por PCR (ver ítem 2.15.1.1 de Materiales y Métodos). Ambas curvas abarcan el mismo rango de número de copias: $3{,}06x10^{10}$; $9{,}18x10^{09}$; $3{,}06x10^{09}$; $9{,}18x10^{08}$; $3{,}06x10^{08}$; $9{,}18x10^{07}$; y un blanco de 2µg ADN de esperma de salmón.

2.15.1.1 Curva de calibración con amplicones A y C

La curva de calibración de amplicones A y C se realizó por duplicado. Se amplificaron ambos amplicones por separado en un total de 6 individuos de poblaciones correntinas (Estancia San Luis, Estancia La Tacuarita, Goya, Chavarría, Saladas, Mbarigüí). Se mezclaron todos productos de amplificación A por un lado y C por el otro, en igual concentración para cada individuo.

La obtención del amplicón C rinde exclusivamente monómero, de manera que la estimación del número de copias a partir de la masa (medida por espectrofotometría) y el largo de la secuencia resulta precisa. La obtención del amplicón A, en cambio, rinde en general una banda de monómero muy mayoritaria, pero también otra minoritaria de dímero. En este caso, se procuró trabajar con productos de PCR en los que los dímeros fuesen especialmente minoritarios. A partir del valor de masa promedio por base ($1{,}0793769x10^{-12}$ng) y el largo de la secuencia monomérica de cada uno, se estimó la masa de ambos amplicones. Luego se calculó la masa que debía sembrarse de cada amplicón de modo que estuviesen igualmente representados en masa en la curva de calibración; ésta se obtuvo por diluciones seriadas.

2.15.1.2 Curva de calibración con ADN genómico de una muestra conocida

A partir de una muestra correspondiente a un individuo de *C. tuconax* (rótulo 294), cuantificada por Claudio Slamovits (Slamovits *et al* 2001; Slamovits 2002a), para la que se estimaron unas 250.000-300.000 copias por genoma, estimado en 7 pg para *Ctenomys* (Ruedas *et al* 1993), se hizo una curva de calibración, por diluciones seriadas, con puntos en el rango de número de copias descripto más arriba.

2.15.2 Transferencia y fijación a membranas

2.15.2.1 Preparación de las muestras

Todas las diluciones de ADN genómico y amplicones A y C preparadas para las siembras en d*ot blot* fueron preparadas con ADN *carrier*: se utilizó ADN de esperma de salmón con el objeto de que en todos los casos se sembraran 2 µg totales de ADN en un volumen final de 330 µl, igual que el blanco. Las diluciones fueron preparadas en EDTA 10 mM para evitar la acción de nucleasas. Al momento de la siembra las muestras fueron desnaturalizadas llevándolas a 0,4 NaOH e incubadas a 100°C por 5 minutos. Luego fueron centrifugadas durante 5 segundos y puestas rápidamente en hielo.

2.15.2.2 Configuración de la unidad microfiltradora con bomba de vacío

Se cortó una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences), se la humedeció con agua destilada y se la incorporó a la unidad microfiltradora (The Convertible Filtration Manifold System, GIBCO). Se enjuagó cada pocillo con 350 µl agua utilizando una micropipeta multicanal y se encendió la bomba de vacío a 15 mmHg para vaciar los pocillos. Luego se agregaron 400 µl de SSC 2X en cada pocillo.

2.15.2.3 Siembra

Se sembraron las muestras de ADN desnaturalizado en los pocillos que contenían SSC 2X y se accionó la bomba de vacío hasta agotar los pocillos. Luego se lavó la membrana con 300 µl de SSC 2X y se accionó nuevamente la bomba hasta secar la membrana.

2.15.2.4 Fijación del ADN a la membrana de nylon

Se expuso la membrana a luz de una lámpara UV, en un horno de crosslinking UV, a 1200 J, a una distancia de 20 centímetros aproximadamente, durante 60 segundos. *Se* guardó la membrana con el ADN fijado, envuelta en papel Whatman® a 4°C.

2.15.3 Obtención y marcación de sondas

Se obtuvo una sonda radiactiva mediante *random priming*, utilizando el kit *Prime-a-Gene* (Promega). Se marcó la mezcla de amplicones A y C utilizada para hacer la curva de calibración descripta en la sección 2.15.1.1**.** Se utilizaron entre 10 y 20 microCuries de dCT^{32}P alfa. Luego de la marcación de la sonda se la precipitó con etanol 100⁄ y acetato de amonio en frío para eliminar los nucleótidos marcados que no hayan sido incorporados a la sonda.

2.15.4 Hibridación de ADN y lavados

La membrana con ADN fijado se preincubó en un tubo de vidrio a 60°C, en agitación suave por 1’ 45 hs con 25 ml de una solución acuosa con SSC 5X, solución Denhardt 5X, 0,5⁄ SDS y 2.500 µg de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado (2 minutos a 95-100°C), en un horno de hibridación. Luego se disminuyó el volumen de prehibridación hasta 7-10 ml, se desnaturalizó la sonda (a 100°C por 5 minutos) y se la diluyó en 500 µl de SDS 0,1⁄ (en agua) y se la agregó al tubo de hibridación con la membrana.

Luego de 18 hs de incubación a 60°C en un horno de hibridación en constante rotación, se retiró el tubo y se lavó la membrana con una solución de lavado a alta (SSC 6X, 0,1⁄ SDS, 60°C) y baja (SSC 0,1X, 0,1⁄ SDS, 60°C) astringencia por 20 minutos, según el caso. Se efectuaron 5 lavados sucesivos con 50 ml de solución de hibridación.

2.15.5 Detección

La membrana lavada fue envuelta en film de polietileno y se incubó a temperatura ambiente con 5 placas radiográficas. Las placas fueron retiradas y reveladas consecutivamente al cabo de 40 minutos, 35 horas, 48 horas, 1 semana y 11 días de exposición.

2.15.6 Tratamiento de los datos

Las placas reveladas fueron digitalizadas utilizando un escáner (Snap Scan Touch, AGFA) y salvadas en formato tiff. Las imágenes obtenidas fueron recortadas y transformadas a escala de grises con el programa ImageJ (Abràmoff, Magalhães y Ram 2004). Las señales de hibridación fueron estimadas usando el programa d*ot blot* Analyzer para ImageJ (Carpentier 2008). No se sustrajo el *background* dado que este era variable en las distintas regiones de la placa, en lugar de ello se restó la densidad integrada de los puntos blanco (sin SRPC) y se utilizó el radio de menor tamaño para muestrear pixeles (5 (10)) que es el que mostró menor

dispersión (≤1%) al compararse series de mediciones independientes. El programa devuelve una planilla con las densidades integradas para cada punto.

Con los valores de densidad integrada de las curvas de calibración se realizaron regresiones lineales de al menos 3 valores de concentración consecutivos: no más de 3, porque en la diferencia de concentración entre puntos hacía que o bien alguno fuese saturante o que tuviese una densidad tan baja como los blancos. Los valores de la curva de ADN genómico y de las curvas obtenidas a partir de amplicones A y C no diferían significativamente, por lo que se unieron las 3 series para inferir una única función lineal.

A partir de las funciones de densidad vs número de copias se infirió el número de copias de cada punto sembrado. Al igual que para las regresiones lineales se procuró que los puntos no estuviesen saturados así como se tomó el mayor tiempo de exposición para aquéllos puntos de muy baja densidad. El número absoluto de copias se estimó asumiendo que el valor C para *Ctenomys* y para roedores en general es 7 pg (Ruedas *et al* 1993).

2.16 Análisis de aislamiento por distancia

Se realizó el test de Mantel para evaluar la hipótesis de aislamiento por distancia, evaluando la correlación entre dos matrices: una de distancias genéticas y una de distancias geográficas. Para ello se utilizaron los paquetes *pegas* (Paradis 2010), *ape* (Paradis, Claude y Strimmer 2004) y *proj4*, del entorno R (R Development Core Team 2005).

La matriz de distancias genéticas se computó utilizando el modelo de sustitución molecular TN93, con parámetro de forma α=0,8632 para la distribución *gamma* de las tasas de sustitución. Se optó por este modelo ya que el paquete *pegas* no incluye GTR, y TN93 es el modelo siguiente a GTR obtenido por ModelTest con la matriz concatenada.

3 RESULTADOS

3.1 Filogenia molecular del grupo Corrientes

Con el objetivo de indagar en las relaciones entre los linajes del grupo Corrientes, así como poner a prueba su monofilia, y al mismo tiempo contar con un marco que permita establecer hipótesis de evolución cromosómica y su relación con la dinámica de SRPC, se realizaron análisis filogenéticos. Se incluyeron individuos de 23 de poblaciones correntinas y 7 especies candidatas a grupo externo, de los cuales se obtuvieron secuencias de 3 *loci* mitocondriales: citocromo b, *D-loop* (región control) y citocromo oxidasa I.

3.1.1 La variabilidad nucleotídica es comparable entre cyt-b, D-loop y COI

No se observaron deleciones o inserciones en el alineamiento de secuencias de cyt-b, ni codones *stop* prematuros para los 51 individuos que dieron producto de PCR, hecho que, sumado a la lectura de picos únicos inequívocos en los electroforegramas, excluye la posibilidad de amplificación de pseudogenes nucleares de este gen encontrados en *Ctenomys* (Mirol, Mascheretti y Searle 2002). Las secuencias de 688 pb de largo no habrían sufrido una saturación severa, ya sea para las 1ra y 2da posición de los codones tomadas en conjunto (I_{ss} = 0,0620 < I_{ssc} = 0,6974 DF = 116 y p < 0,0001), o para la 3ra posición (I_{ss} = 0,1752 < I_{ssc} = 0,6848 DF = 136 y p < 0,0001). La muestra correspondiente a *C. argentinus* no dio productos de amplificación para cyt-b (ni tampoco para COI), probablemente debido a la degradación parcial del ADN genómico total observada en electroforesis en geles de agarosa.

El largo total del fragmento de *D-loop* varió entre 406 y 409 pb, y consecuentemente el alineamiento de las 52 secuencias contiene *gaps*, que reflejan posibles inserciones/deleciones. Sin embargo, el alineamiento resultó unívoco. No se reveló saturación por el test implementado (I_{ss} = 0,115 < I_{ssc} = 0,691 DF = 119 y p < 0,0001), validándose así este marcador para su uso en inferencias filogenéticas.

No se observó variación en el largo de secuencias en el alineamiento de 693 pb correspondiente al fragmento de COI obtenido para 51 individuos. Este gen tampoco evidencia saturaciones severas, ni en 1ra y 2da posición (I_{ss} = 0,0026 < I_{ssc} = 0,698 DF = 111 y p < 0,0001), ni en 3ra posición y la región 5' no codificante (I_{ss} = 0,152 < I_{ssc} = 0,685 DF = 151 y p < 0,0001).

La divergencia media (medida como el promedio de las distancias no corregidas de a pares, es decir, sin asumir un modelo de evolución) en los miembros del grupo Corrientes

(*ingroup*), en los miembros del grupo externo (*outgroup*), y entre miembros de ambos grupos se muestran en la Tabla 4. También se muestra el número de sitios variables y potencialmente informativos, ambos mayores en cyt-b y COI, respecto de *D-loop*.

Región genómica	***D-loop***	**Cyt-b**	**COI**
Longitud del alineamiento (pb)	409	688	693
Número de sitios variables (/)	68 (17/)	145 (21/)	137 (20/)
Número de sitios informativos (/)	30 (7/)	70 (10/)	55 (8/)
Modelo de sustitución elegido (Inferencia bayesiana)	GTR + I + Γ	HKY + Γ	TVM + I + Γ
	Modelo seleccionado para la matriz concatenada: GTR + I + Γ (pinvar = 0.5765; α = 0.8579)		
Divergencia media			
Ingroup	1.24±0.55/	1.14±0.53/	0.94±0.43/
Outgroup	4.37±1.98/	6.00±3.07/	4.71±3.94/
Ingroup-Outgroup	3.59±1.58/	4.46±2.57/	3.85±2.65/

Tabla 4. Largo total del alineamiento (expresado en pares de bases), número (y porcentaje /) de sitios variables y de sitios potencialmente informativos, modelos de sustitución elegidos (en inferencia bayesiana), y medidas de distancia entre miembros del *ingroup*, *outgroup* e *ingroup* vs *outgroup*, son resumidos para los 3 marcadores filogenéticos incluidos en esta tesis.

El número de haplotipos obtenidos para los tres marcadores resultó comparable, siendo 32 para cyt-b, 36 para *D-loop* y 34 en el caso de COI. La matriz concatenada (cyt-b + *D-loop* + COI) contiene 1790 caracteres de los cuales 350 son variables, quedando definidos 44 haplotipos entre los 42 individuos del grupo Corrientes y los 10 individuos candidatos a grupo externo.

3.1.2 Árboles obtenidos en base a los marcadores por separado y a la matriz concatenada

En todas las búsquedas, las topologías resultaron congruentes utilizando los distintos esquemas de costos de transformación, pesado de caracteres y tratamiento de gaps, en el caso de análisis por máxima parsimonia, y también analizando los datos con cualquiera de los dos modelos de evolución molecular que mejor ajustaran a los datos obtenidos utilizando ModelTest 3.7.

Las diferencias entre los árboles obtenidos por máxima parsimonia, métodos bayesianos y métodos de distancia, residen en el apoyo estadístico de ciertos grupos pero no

en las topologías. Las búsquedas por métodos bayesianos típicamente arrojaron valores de apoyo de los nodos más altos que los otros algoritmos. En MP y NJ el apoyo estadístico se obtuvo por *bootstrap*, una medida de remuestreo que no es sensible a grupos con baja proporción de sinapomorfías, aunque no exista conflicto entre caracteres para definir al grupo. Más aún, en los consensos estrictos computados para las búsquedas por MP, se recuperan los mismos grupos que los que apoyan los métodos bayesianos.

La decisión de forzar *C. rionegrensis* como grupo externo se basa en que esta especie pertenece al grupo *mendocinus*, que resulta externo al grupo que incluye a algunas especies y formas correntinas que fueron incluidas en filogenias previas (Parada *et al* 2011). De cualquier modo, la relación entre las especies y formas correntinas no cambió cuando otras especies fueron elegidas como grupo externo (Figura 20). Especies como *C. pearsoni* y *C. torquatus* no fueron inicialmente forzadas como grupos externos de modo de poner a prueba la monofila del grupo Corrientes, dado que éstas poseen un ancestro común más reciente con las correntinas, y *C. pearsoni* en particular se intercala con algunas especies correntinas en el trabajo de Parada y colaboradores (2011).

3.1.2.1 Las filogenias obtenidas con los marcadores por separado son congruentes entre sí

Los árboles obtenidos utilizando los 3 marcadores por separado no resuelven completamente la relación entre los linajes del grupo Corrientes, pero son congruentes entre sí.

3.1.2.1.1 Filogenia obtenida con D-loop

El marcador con el que se obtuvo la menor cantidad de sitios informativos resultó *D-loop*, siendo -como es esperable-, el de menor poder resolutivo en la filogenia del grupo Corrientes. Si bien divergen de la mayor parte de especies candidatas a grupo externo, las especies y formas correntinas caen en una gran politomía que incluye también todas los haplotipos de *C. pearsoni* (Figura 17). Es probable que habiendo tan pocos caracteres informativos, algún carácter homoplásico para el grupo Corrientes influya sobre los valores de apoyo en la topología obtenida por métodos bayesianos, por lo que los grupos robustos de la filogenia obtenida con *D-loop* serán aquellos que además tengan apoyo por MP.

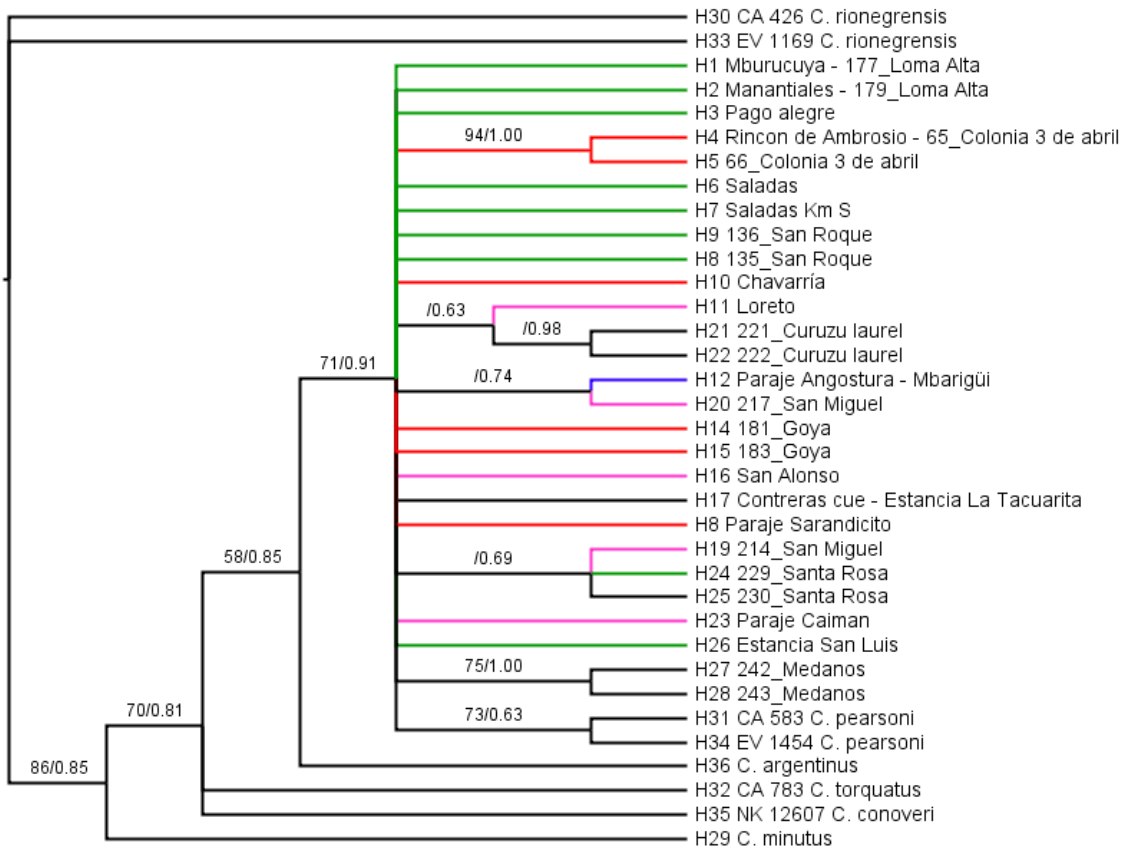


Figura 17. Árbol consenso del grupo Corrientes, de los haplotipos obtenidos utilizando *D-loop* como marcador filogenético. Los números encima de los nodos internos indican los valores de apoyo de *bootstrap* por máxima parsimonia (⁄), y probabilidad posterior (métodos bayesianos). Sólo los valores mayores al 50⁄ y/o a 0,6 de *p*, son mostrados, mientras que los nodos con valores menores fueron colapsados. El código de color de las ramas se corresponde con los grupos principales de la filogenia obtenida con la matriz de los 3 marcadores concatenados (Figura 20).

3.1.2.1.2 Filogenia obtenida con COI

La topología resultante de las inferencias realizadas con COI se muestra en la Figura 18. A diferencia de la topología obtenida con *D-loop*, el grupo Corrientes resulta monofilético y hermano a *C. pearsoni*. Además dentro del grupo Corrientes se separan dos linajes con altos valores de apoyo: el que agrupa a las poblaciones asociadas a *C. perrensi* (Goya, Rincón de Ambrosio y Colonia 3 de abril) y Chavarría, hermanas a la población de Paraje Sarandicito (aunque esta última asociación tiene bajos valores de apoyo), y el otro grupo que recibe apoyo agrupa a las poblaciones periféricas a los Esteros del Iberá (San Alonso, San Miguel, Paraje Caimán, Loreto, Contreras Cué y Estancia La Tacuarita), con excepción de Curuzú Laurel (Figura

14). Es remarcable el hecho de que los haplotipos de todas las poblaciones salvo 3 de ellas (San Miguel, Loma Alta, Colonia 3 de abril) resultaron idénticos o formaban grupos monofiléticos.

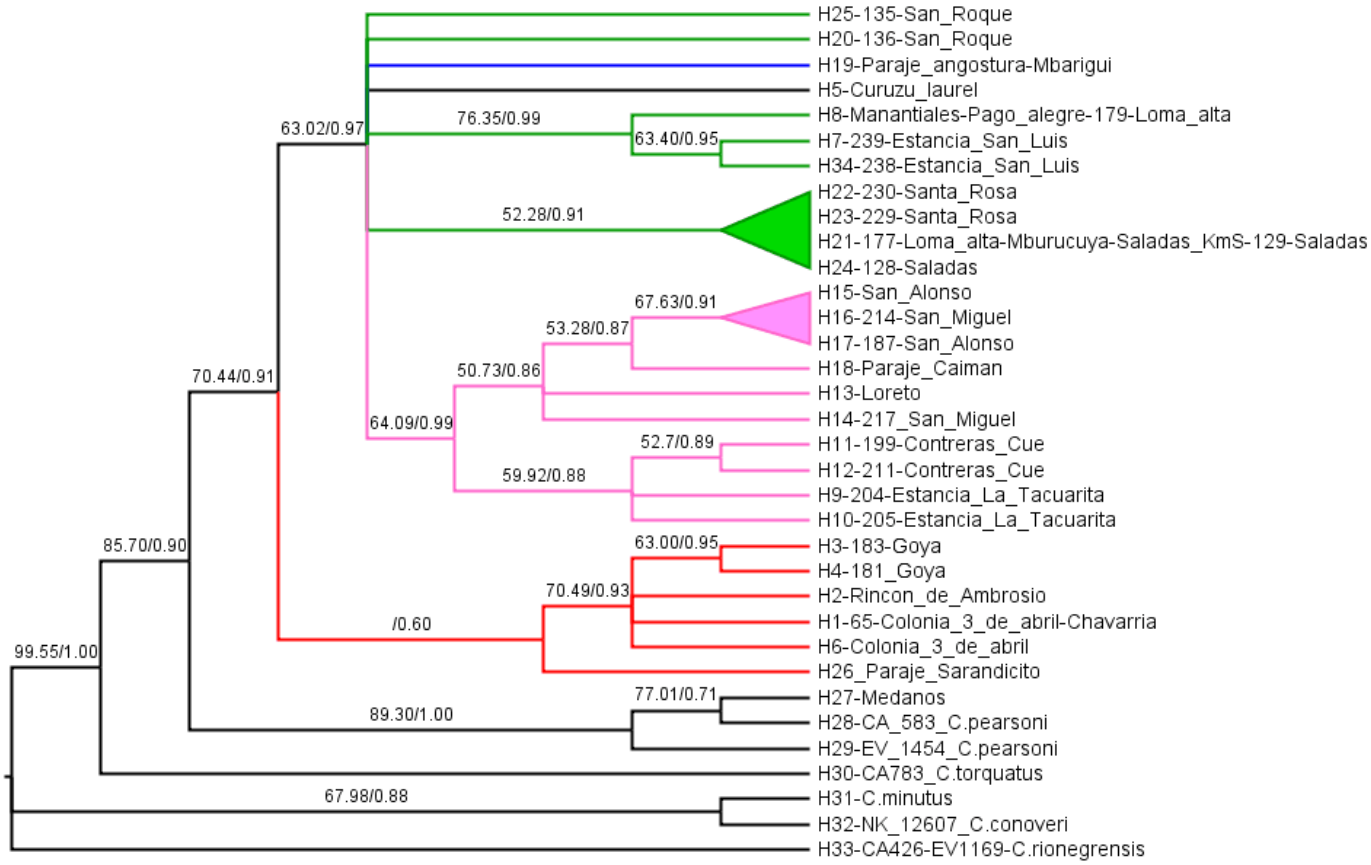


Figura 18. Árbol consenso del grupo Corrientes de los haplotipos obtenidos utilizando COI como marcador filogenético. Los números que figuran por encima de los nodos internos indican los valores de apoyo de *bootstrap* por máxima parsimonia (⁄), y probabilidad posterior (métodos bayesianos). Sólo los valores mayores al 50⁄ y/o a 0,6 de *p*, son mostrados, mientras que los nodos con valores menores fueron colapsados. El código de color de las ramas se corresponde con los grupos principales de la filogenia obtenida con la matriz de los 3 marcadores concatenados (Figura 20). Los triángulos indican grupos monofiléticos totalmente politómicos.

3.1.2.1.3 Filogenia obtenida con cyt-b

A pesar de ser la matriz con número mayor de caracteres informativos, el alineamiento de secuencias de cyt-b produjo una filogenia con poder de resolución comparable a la obtenida utilizando COI. El grupo Corrientes tiene valores de apoyo muy bajos, y si se desestiman los nodos con probabilidad posterior menor a 0,6, quedaría colapsado en una politomía junto con *C. pearsoni* (Figura 19). Los nodos más terminales tienen mayor valor de apoyo que los nodos más profundos, y se definen nuevos grupos congruentes con la filogenia obtenida con COI, al tiempo que se pierden algunos de los grupos que resultaban de ese análisis (Figura 18, Figura 19). Este hecho estaría indicando que estas secuencias producen señal filogenética en tiempos evolutivos diferentes lo cual implicaría que las tasas de evolución de ambos marcadores no son constantes a lo largo de la filogenia y/o de los linajes. Se mantiene el grupo *C. perrensi* (Goya, Rincón de Ambrosio y Colonia 3 de abril) y Chavarría, hermano a la población de Paraje Sarandicito, pero se pierde el grupo de poblaciones periféricas a los Esteros del Iberá, que caen en una politomía en la base del grupo Corrientes. A su vez, un nuevo grupo, que incluye poblaciones de la zona de influencia del Estero de Santa Lucía (Figura 14) y la población de Estancia San Luis (posiblemente *C. roigi, ver* ítem 4.7, en Discusión), gana apoyo, si bien las relaciones dentro del grupo no tienen valores altos de soporte.

Como ocurriera con la filogenia obtenida con COI, los haplotipos de todas las poblaciones salvo 3 de ellas (San Miguel, Loma Alta, Rincón de Ambrosio) resultaron idénticos o formaban grupos monofiléticos.

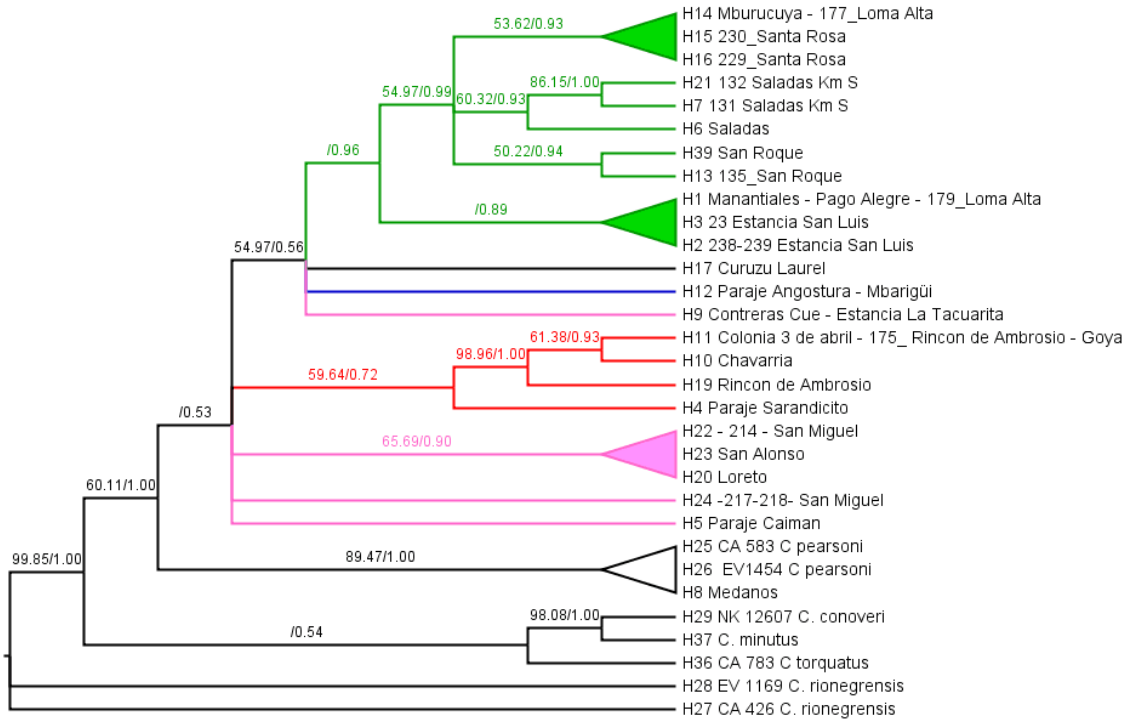


Figura 19. Árbol consenso del grupo Corrientes de los haplotipos obtenidos utilizando cyt-b como marcador filogenético. Los números encima de los nodos internos indican los valores de apoyo de *bootstrap* por máxima parsimonia (⁄), y probabilidad posterior (métodos bayesianos). Sólo los valores mayores al 50⁄ y/o a 0,5 de *p*, son mostrados, mientras que los nodos con valores menores fueron colapsados. El código de color de las ramas se corresponde con los grupos principales de la filogenia obtenida con la matriz de los 3 marcadores concatenados (Figura 20). Los triángulos indican grupos monofiléticos totalmente politómicos.

3.1.2.2 La matriz concatenada aumenta la resolución del árbol

Además de las matrices de los tres *loci* mitocondriales por separado se ensayaron búsquedas concatenando de a pares, las tres combinaciones de marcadores posibles, y se concatenaron los tres alineamientos en una sola matriz. Todas las búsquedas mejoraron la resolución del árbol respecto de las obtenidas con los marcadores por separado, pero con la matriz de los tres marcadores concatenados se obtuvieron los mayores valores de apoyo de los nodos. La filogenia resultante se muestra en la Figura 20.

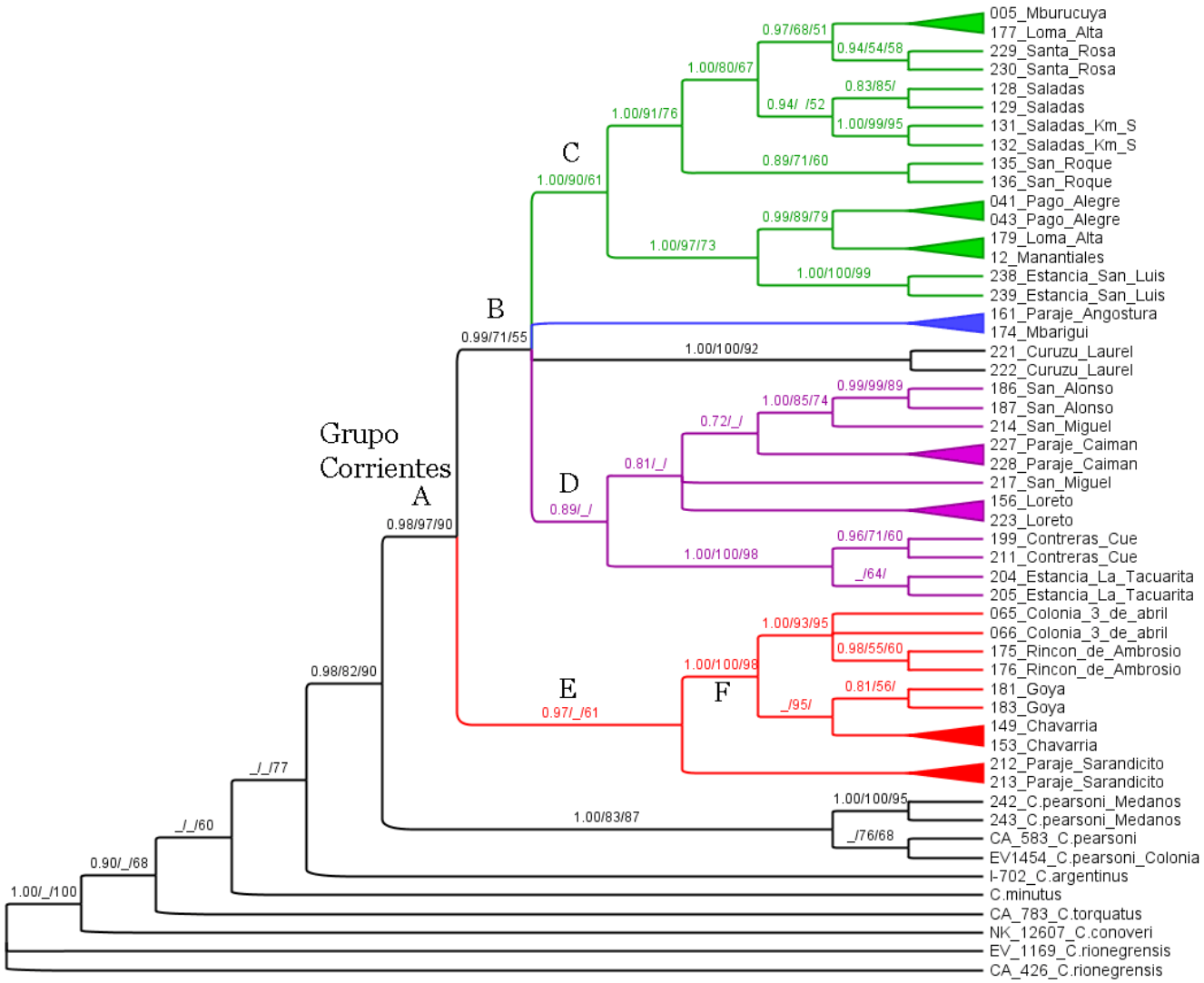


Figura 20. Árbol filogenético obtenido utilizando una matriz concatenada de 3 marcadores mitocondriales: cyt-b, COI y *D-loop*. El código de campo o número de catálogo y la población de procedencia se muestran en los nodos terminales. Los números arriba de los nodos internos indican el apoyo de probabilidades posteriores (métodos bayesianos), *bootstrap* por máxima parsimonia (⁄) y *bootstrap* por *neighbor joining* (⁄) (MB/MP/NJ). Sólo los valores mayores al 50⁄ de *bootstrap* por MP o NJ y/o mayores a 0,7 del valor de *p* (MB), se muestran, mientras que los nodos con valores menores fueron colapsados. Los haplotipos idénticos fueron son esquematizados con triángulos, y los principales clados dentro del grupo Corrientes se muestran con diferentes colores y/o letras mayúsculas (A-F).

3.1.2.2.1 El grupo Corrientes es monofilético. Principales linajes

El análisis filogenético de los tres marcadores concatenados apoya la condición monofilética del grupo Corrientes con altos valores de apoyo, en congruencia con las filogenias obtenidas con los marcadores por separado (Figura 20, nodo A). Las poblaciones tanto uruguayas como entrerrianas de *C. pearsoni* forman un grupo monofilético, bien soportado, hermano al grupo Corrientes (Figura 20).

Dentro del grupo Corrientes, los haplotipos de todas las poblaciones resultaron monofiléticos o idénticos (éstos últimos se muestran como triángulos en la filogenia de la Figura 20), salvo por las poblaciones de Loma Alta y San Miguel, mientras que en los casos de Paraje Angostura, Mbarigüí, Mburucuyá y Manantiales se incluyó un único haplotipo en la filogenia. Se definieron 5 nodos principales en el grupo Corrientes: B, C, D, E, y F (Figura 20). El nodo C agrupa a la población de Estancia San Luis, distante por 9,8 km de Costa Mansión, la localidad tipo de *C. roigi* (Contreras 1988), con varias poblaciones de *status* taxonómico indeterminado: Manantiales, Loma Alta, Pago Alegre, San Roque, Saladas, Saladas Km Sur, Santa Rosa y Mburucuyá. Estas poblaciones están en el área de influencia del Estero de Santa Lucía, un humedal formado por esteros y lagunas cuyo flujo hidrológico depende mayoritariamente de los regímenes de lluvias (Bohn y Campo 2010). Todos los nodos derivados del nodo C tienen altos valores de apoyo por los tres métodos de búsqueda ensayados. Como se mencionó, el único caso en este grupo en que los haplotipos de una misma población caen en diferentes grupos es el de Loma Alta, siendo un haplotipo idéntico al hallado en Mburucuyá y el otro idéntico al hallado en Manantiales.

El nodo D tiene un alto valor de apoyo estadístico en los análisis bayesianos, pero no bajo MP o NJ. Sin embargo, como se mencionó más arriba (ver ítem 3.1.2 de Resultados), los bajos valores de *bootstrap* no serían producto de conflicto entre caracteres. El hecho de que este nodo persista al computarse el consenso estricto de los árboles más parsimoniosos es congruente con la ausencia de conflicto entre caracteres. El agregado de más caracteres debería resultar en un aumento de los valores de *bootstrap* para este grupo. El nodo D incluye varias poblaciones de *status* taxonómico indefinido (Ortells, Contreras y Reig 1990). Este clado agrupa poblaciones ubicadas en las márgenes oriental (Contreras Cué y Estancia La Tacuarita) y occidental (San Miguel, Paraje Caimán, Loreto) de los Esteros del Iberá, así como la población de San Alonso, recientemente descubierta en una isla dentro de los Esteros. Curuzú Laurel es la única población localizada en la periferia de los Esteros del Iberá cuya pertenencia

a este grupo no recibió suficiente apoyo (aunque en el árbol obtenido utilizando *D-loop* esta población aparece relacionada a Loreto aunque con bajos valores de apoyo, ver Figura 17).

El otro grupo con altos valores de apoyo, cuyo nodo basal es el nodo F, incluye la población de Goya, localidad tipo de *C. perrensi*, así como las poblaciones de Colonia 3 de Abril, Rincón de Ambrosio, clasificadas por otros autores como pertenecientes a la misma especie (Giménez *et al* 2002). Este grupo también incluye dos haplotipos idénticos de la población de Chavarría que conforman un grupo monofilético con la población de Goya. Sin embargo, esta agrupación tiene bajos valores de apoyo, y sólo los alcanzan en MP, y entra en conflicto con las filogenias obtenidas a partir de los *loci* por separado (Figura 17, Figura 18, Figura 19, Figura 20).

3.1.2.2.2 ¿Las especies nominales son monofiléticas?

Estudios previos describieron dos conjuntos de poblaciones como representantes de la especie *C. dorbignyi*: las poblaciones de Paraje Angostura y Mbarigüí (localidad tipo) en el norte, y Paraje Sarandicito al sur de la provincia de Corrientes. Esta asignación tomó como criterio la homogeneidad cariotípica entre los cariomorfos hallados en las tres poblaciones, todas con 2n=70 y NF=84 (Ortells, Contreras y Reig 1990; Argüelles *et al* 2001). Sin embargo el árbol filogenético obtenido en esta tesis propone que *C. dorbignyi* sería una entidad polifilética: las poblaciones del norte y del sur se separan en nodos con altos valores de apoyo, los nodos B y E, respectivamente (Figura 20).

Como se señaló en el apartado anterior, el haplotipo hallado en la población de Chavarría se intercala entre los adscriptos a *C. perrensi*, por lo que esta especie podría ser considerada un grupo natural si se incluyera a Chavarría en esta entidad.

Por último, Estancia San Luis, la única población asociada a *C. roigi* (Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012) que se incluyó en este trabajo de tesis, resultó monofilética.

3.2 Análisis de la variabilidad cromosómica del grupo Corrientes

En la literatura, gran parte de la información citogenética de las poblaciones estudiadas en este trabajo incluye solamente los valores de 2n y el NF y no muestra los cariogramas en base a los cuales se habrían realizado los cómputos (ver Tabla 1). Además el valor de NF fue computado siguiendo dos criterios diferentes: algunos autores sólo incluyen el número de brazos autosómicos, y otros recuentan el número de brazos de todo el complemento diploide. Dado que en muchos casos no se explicita cuál de los dos criterios fue adoptado, el valor numérico de NF puede no ser comparable entre trabajos de diferentes autores. Los números cromosómicos y fundamentales publicados sin su contraparte fotográfica representan una gran pérdida de información, y no permiten tener certeza sobre los datos cromosómicos necesarios para la elaboración de hipótesis de evolución cromosómica. Más aún, la coincidencia en 2n y NF puede ser producto de paralelismos, como sucede con los cariotipos hallados en la población correntina de Curuzú Laurel y el de *C. torquatus* hallado en la población de Alegrete, al sur de Brasil, dos poblaciones no relacionadas filogenéticamente (Fernandes *et al* 2009). Con doble objetivo de realizar una comparación de morfología y número cromosómico, que permita formular hipótesis de evolución cromosómica, así como el de tener una correspondencia entre los cariomorfos estudiados y los individuos incluidos en la filogenia y en los análisis de evolución de SRPC, se obtuvieron los cariogramas de 33 individuos pertenecientes a 11 poblaciones del grupo Corrientes.

La nomenclatura cromosómica se realizó según Levan, Fredga y Sandberg (1964), y en el recuento del NF se tuvieron en cuenta tanto autosomas como cromosomas sexuales, siendo 1 para cromosomas telocéntricos y 2 para cromosomas bibraquiados. Los cromosomas se agruparon según el número de brazos: monobraquiados (telocéntricos) y bibraquiados, mientras que dentro de cada grupo los pares homólogos fueron ordenados de manera decreciente según su tamaño. El sistema de determinación sexual XX-XY fue caracterizado para los tuco-tucos del grupo Corrientes por Lanzone y colaboradores (2002), por lo que además, los cromosomas X e Y, que resultaron bibraquiados en todas las poblaciones estudiadas, fueron incluidos en un tercer grupo.

A continuación se presentan cariogramas representativos de los cariomorfos hallados.

3.2.1 Curuzú Laurel

Las dos hembras (220 y 221) y el macho (222) analizados provenientes de la población de Curuzú Laurel resultaron homocigotas, con 2n=42 y NF=76, con 17 pares bibraquiados y 4

pares telocéntricos. El complemento de autosomas consiste en 10 pares submetacéntricos, uno mediano que porta la constricción secundaria, 2 pares acrocéntricos (uno grande y uno mediano), 4 pares metacéntricos y 4 pares teocéntricos pequeños de tamaño gradualmente decreciente (Figura 21). Dos pares, uno acrocéntrico y otro submetacéntrico son los mayores del complemento, seguidos por 11 pares bibraquiados medianos, y 3 pares sub/metacéntricos pequeños. El cromosoma X es un submetacéntrico grande y el Y es un submetacéntrico de menor tamaño. Este cariomorfo coincide con el publicado por Ortells, Contreras y Reig (1990) correspondiente a esta misma población, y resulta indistinguible del hallado en Estancia La Tacuarita (ejemplares: 203, 204 y 205), Loreto (ejemplares: 156, 223 y 224) y Contreras Cué (ejemplares: 199, 207, 208, 210 Y 211) (Jablonski 2011)[1], que además revelaron bandas DAPI/CMA_3 homólogas para todos los brazos de cromosomas grandes y medianos, sugiriendo que este cariomorfo se habría mantenido invariante en estas poblaciones. En Contreras Cué se halló además un individuo heterocigota para la fusión de dos cromosomas telocéntricos pequeños (ejemplar 199), resultando el número diploide más bajo del grupo Corrientes 2n=41, NF=76.

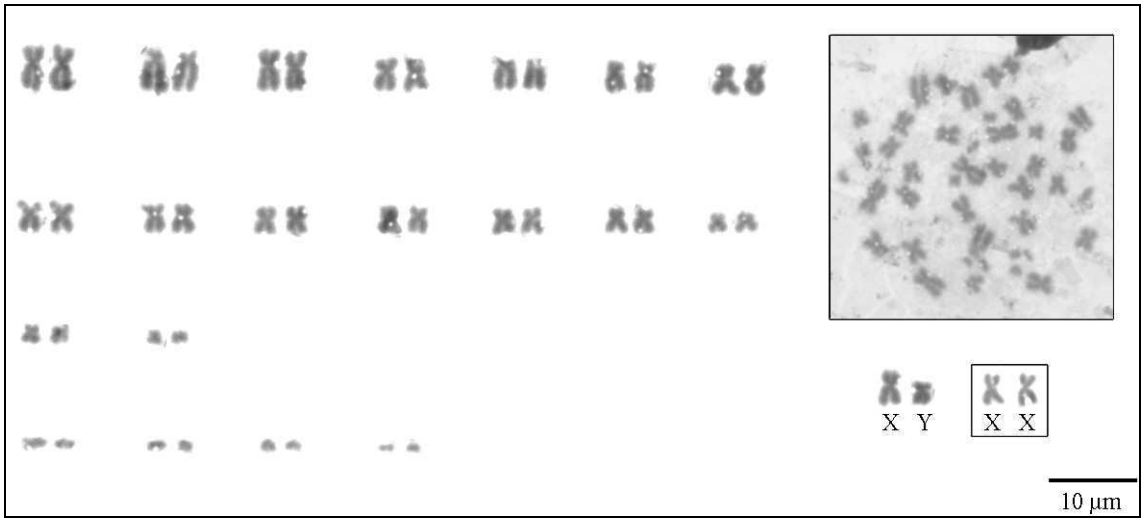


Figura 21. Cariograma del individuo 222, de la población de Curuzú Laurel, 2n=42, NF=76, indistinguible de los individuos 220 y 221 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen

[1] Los cariomorfos de las poblaciones de Estancia La Tacuarita, Contreras Cué, Loreto, San Miguel y San Alonso fueron analizados por la Lic. Paola Jablonski en su tesis de licenciatura (Jablonski 2011). Los datos de dicha tesis que se presentan en este trabajo con el acuerdo explícito de la Lic. Paola Jablonski (autora), el Dr. Pablo Rebagliati (director) y mío (director asistente).

en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

El cariomorfo de 2n=42 NF=76 posee la misma cantidad de brazos cromosómicos que el cariomorfo presente en la población de San Miguel 2n=44 NF=76, es decir que podrían estar relacionados por un evento de fusión/fisión céntrica. Esta hipótesis se planteó inicialmente al hallarse que la única diferencia revelada por tinción con Giemsa entre estos cariomorfos era la presencia de dos pares telocéntricos extra (los dos mayores) en la población de San Miguel y, su contraparte, un par bibraquiado menos en su complemento autosómico (Figura 22). Posteriormente la comparación de bandas DAPI/CMA_3 reveló que los pares telocéntricos extra hallados en San Miguel tenían homología completa con los brazos del cromosoma bibraquiado resultante, hallado en el cariomorfo 2n=42 NF=76.

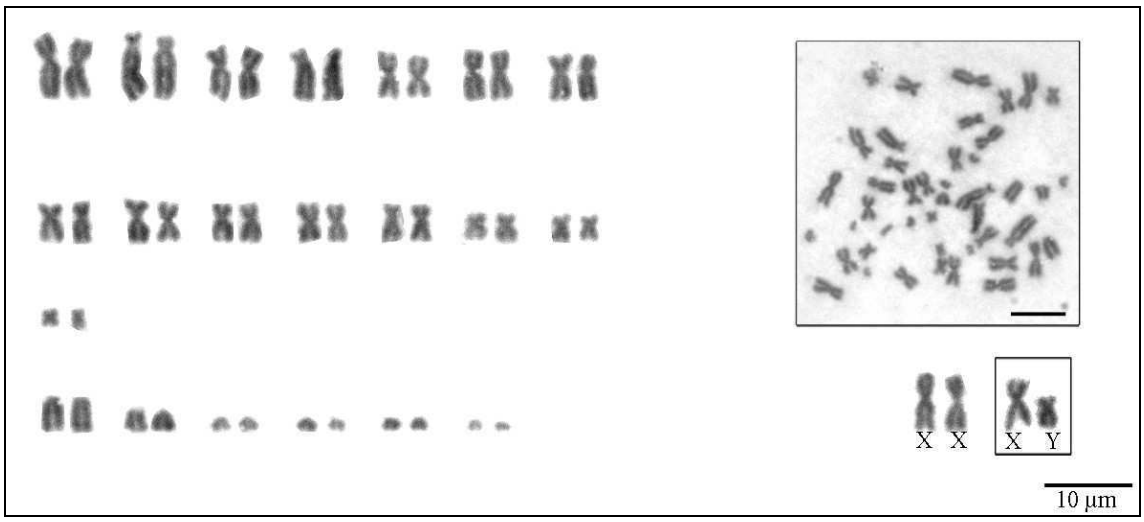


Figura 22. Cariograma del individuo 216 (hembra), de la población de San Miguel, 2n=44, NF=76, indistinguible de los individuos 214 y 217 (machos) de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm. Este cariograma fue confeccionado por la Lic. Paola Jablonski (2011)[2].

[2] Los cariomorfos de las poblaciones de Estancia La Tacuarita, Contreras Cué, Loreto, San Miguel y San Alonso fueron analizados por la Lic. Paola Jablonski en su tesis de licenciatura (Jablonski

3.2.2 Paraje Caimán

En la población de Paraje Caimán, de los 4 individuos analizados, 2 hembras (225 y 228) poseían 2n=45 y 1 hembra (226) y un macho (227) 2n=46, todos con NF=78. El cariomorfo 2n=46 tiene 16 pares bibraquiados y 7 pares telocéntricos. El complemento autosómico consta de 9 pares submetacéntricos, 1 par acrocéntrico grande y uno mediano, 4 pares metacéntricos, y 7 pares telocéntricos. El par cromosómico sexual es heteromórfico; el cromosoma X es submetacéntrico de tamaño grande, mientras que el cromosoma Y es submetacéntrico mediano/pequeño. El sexto par bibraquiado, submetacéntrico mediano, porta la constricción secundaria (Figura 23). Dos pares telocéntricos se distinguen de los pequeños restantes, y estarían involucrados en un evento de fusión/fisión, para el cual el cariomorfo 2n=45 resulta heterocigota (Figura 24). El cariomorfo 2n=44 NF=78 no fue hallado entre los individuos analizados, pero su ocurrencia es muy probable en esta población. Dicho cariomorfo sería indistinguible del encontrado en la población de San Alonso (Figura 25). Los cromosomas involucrados en el reordenamiento robertsoniano serían homólogos a los que diferenciarían a los cariomorfos hallados en San Miguel, por un lado, y al de 2n=42 NF=76 por el otro, indicando que el reordenamiento sería recurrente. La homología de brazos entre estos cariomorfos fue corroborada mediante bandeos DAPI/CMA_3 (Jablonski 2011).

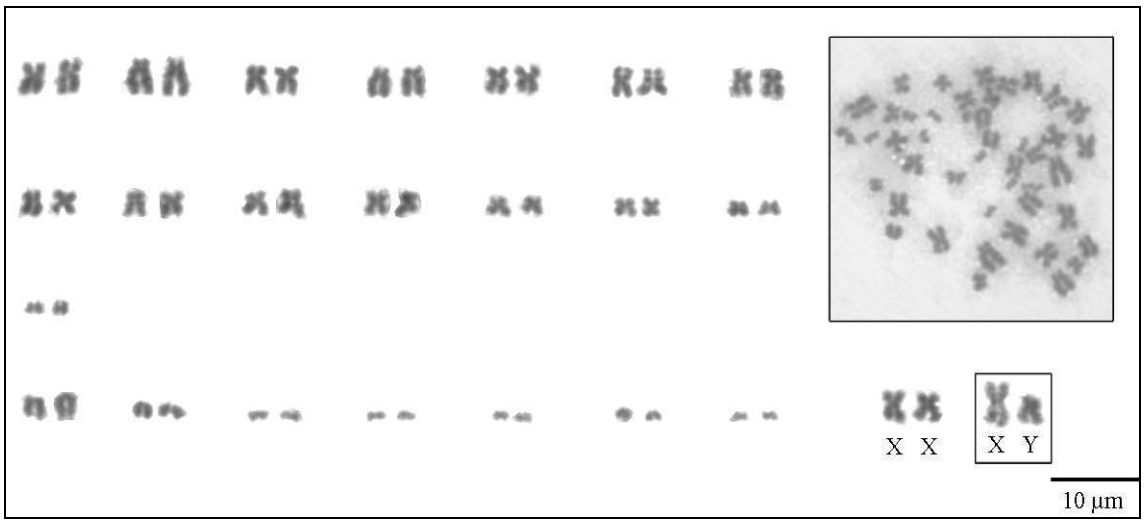


Figura 23. Cariograma del individuo 226, de la población de Paraje Caimán, 2n=46, NF=78, indistinguible del individuo 227 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en

2011). Los datos de dicha tesis que se presentan en este trabajo con el acuerdo explícito de la Lic. Paola Jablonski (autora), el Dr. Pablo Rebagliati (director) y mío (director asistente).

bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

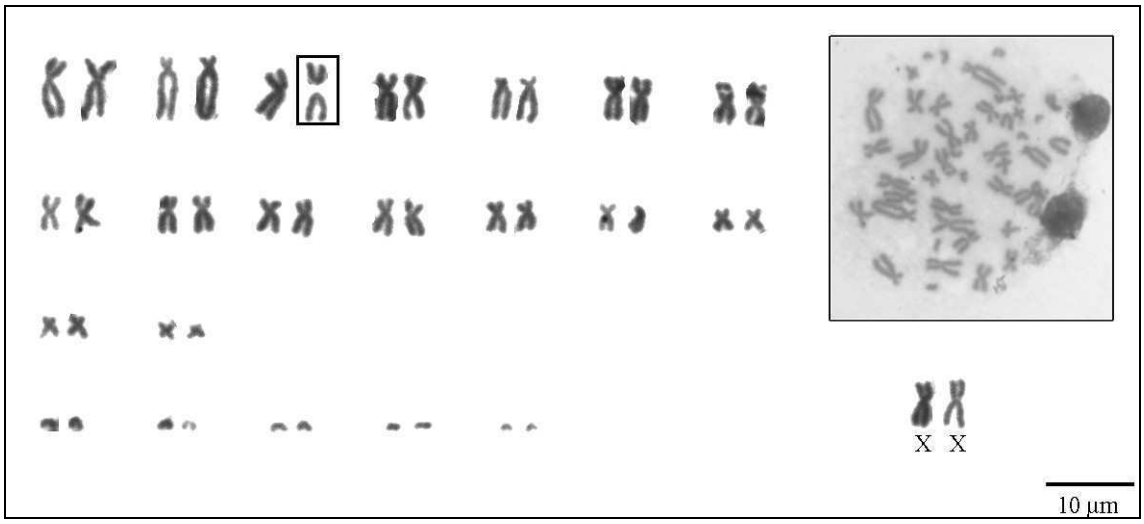


Figura 24. Cariograma del individuo 225, de la población de Paraje Caimán, 2n=45, NF=78, indistinguible del individuo 228 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. Este cariomorfo resulta heterocigota para un reordenamiento robertsoniano, en el que intervienen los cromosomas telocéntricos mayores (recuadrados), homólogos a los brazos corto y largo de un par submetacéntrico, el tercero del complemento de bibraquiados. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

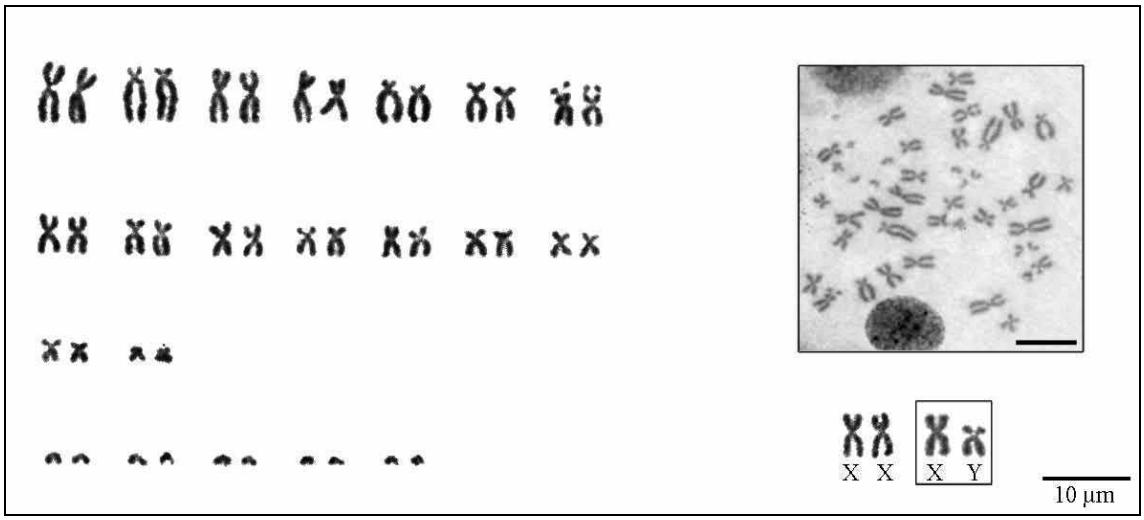


Figura 25. Cariograma del individuo 190, de la población de San Alonso, 2n=44, NF=78, indistinguible de los individuos 186 y 188 (machos) y 187 (hembra) de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm. Este cariograma fue confeccionado por la Lic. Paola Jablonski (2011)[3].

Los reordenamientos que relacionan a los cariomorfos de las poblaciones de Curuzú Laurel (2n=42, NF=76), Loreto (2n=42, NF=76), Estancia La Tacuarita (2n=42, NF=76), Contreras Cué (2n=41-42, NF=76), San Miguel (2n=44, NF=76), San Alonso (2n=44, NF=78) , y Paraje Caimán (2n=45-46, NF=78), todas ellas ubicadas en la periferia y dentro de los Esteros del Iberá, involucran cambios en el 2n y en el NF, por lo que no basta con invocar reordenamientos robertsonianos para relacionarlos. Al menos 3 eventos de fusión/fisión debieron haber ocurrido entre estos cariomorfos íntimamente relacionados, pero también debió haber ocurrido un reordenamiento afectando al NF. Como discutiera Jablonski (2011) se descarta la hipótesis de una inversión pericéntrica y se propone en cambio una fusión en tándem o de forma menos probable, la deleción de un par cromosómico. Estos reordenamientos explicarían la diferencia entre cariomorfos como el 2n=44 NF=78 hallado en San Alonso, cuando se lo

[3] Los cariomorfos de las poblaciones de Estancia La Tacuarita, Contreras Cué, Loreto, San Miguel y San Alonso fueron analizados por la Lic. Paola Jablonski en su tesis de licenciatura (Jablonski 2011). Los datos de dicha tesis que se presentan en este trabajo con el acuerdo explícito de la Lic. Paola Jablonski (autora), el Dr. Pablo Rebagliati (director) y mío (director asistente).

compara con el cariomorfo 2n=42 NF=76. La diferencia reside en la presencia de un par telocéntrico pequeño extra que aumenta simultáneamente el número diploide y el número fundamental en el cariomorfo de San Alonso. Análogamente, el cariomorfo 2n=46 NF=78 hallado en Paraje Caimán, tiene un par telocéntrico pequeño extra que lo diferencia del 2n=44 NF=76 hallado en San Miguel. No se ha podido establecer si estos reordenamientos ocurrieron en forma secuencial, o si hubo reversiones, o una forma de evolución reticulada, pero sin dudas estos cariomorfos conforman un grupo muy homogéneo dentro del grupo Corrientes, y a su vez muy diferenciado del resto de poblaciones correntinas.

3.2.3 Estancia San Luis

Las 2 hembras (236 y 237) y los 2 machos (238 y 239) provenientes de la población de Estancia San Luis resultaron homocigotas, con 2n=48 y NF=80. El complemento posee 16 pares bibraquiados y 8 pares telocéntricos. El complemento autosómico consta de 8 pares submetacéntricos, 2 pares acrocéntricos, y 5 pares metacéntricos entre los bibraquiados. El séptimo par bibraquiado, un submetacéntrico mediano, posee la constricción secundaria. Uno de los 8 pares telocéntricos es claramente mayor a los demás, que disminuyen gradualmente su tamaño. El cromosoma X es submetacéntrico grande y el cromosoma Y es un submetacéntrico mediano. En esta población se registró un polimorfismo en la longitud del brazo corto en dos pares autosómicos bibraquiados, correspondientes al par mayor y al sexto par.

El cariomorfo hallado en Estancia San Luis es indistinguible de aquel hallado en Costa Mansión, localidad tipo de *C. roigi* (Ortells, Contreras y Reig 1990). La correspondencia en número y morfología cromosómica y el hecho de que por análisis de variabilidad en *loci* microsatélites y de haplotipos mitocondriales (Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012) forma un *cluster* diferenciado que incluye sólo a las poblaciones de *C. roigi,* sugieren que la localidad de Estancia San Luis pertenece a la misma entidad.

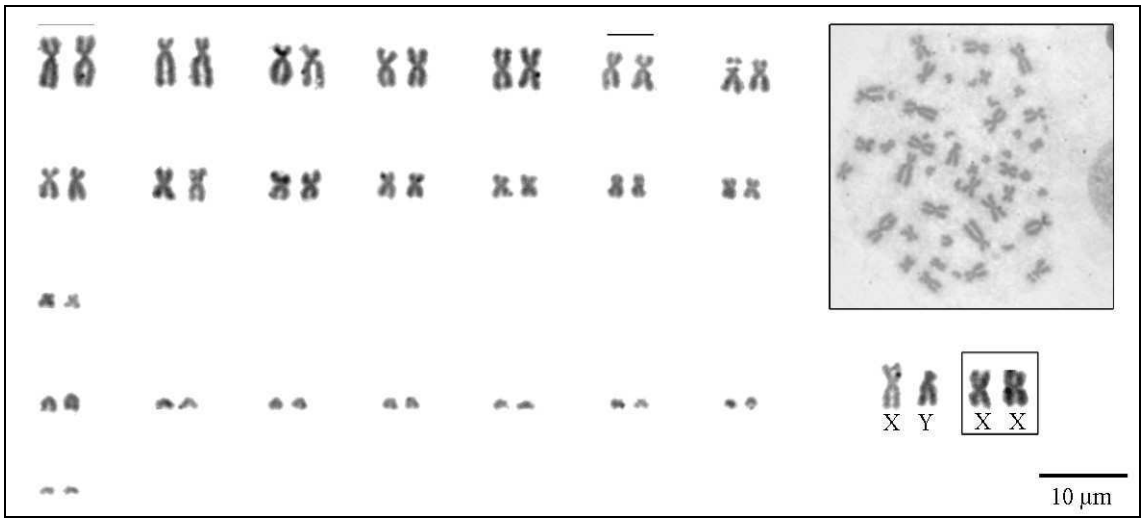


Figura 26. Cariograma del individuo 239, de la población de Estancia San Luis, 2n=48, NF=80, indistinguible de los individuos 236, 237 y 238 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. En esta población se hallaron polimorfismos en la longitud de los brazos cortos de los pares autosómicos 1 y 6. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.4 Mbarigüí

El complemento cromosómico de una hembra (174) perteneciente a Mbarigüí, la localidad tipo de *Ctenomys dorbignyi*, fue analizado obteniéndose el 2n=70 NF=84, característico de esta especie, y el más alto en todo el género. El complemento autosómico consta de 6 pares bibraquiados, y 28 pares telocéntricos. El autosoma bibraquiado mayor es acrocéntrico, y luego la serie pasa abruptamente a 2 pares submetacéntricos y 3 pares metacéntricos chicos. Los cromosomas telocéntricos siguen una disminución gradual entre el par mayor y uno diez veces menor entre ambos extremos de la distribución. El decimocuarto par telocéntrico porta la constricción secundaria. El cromosoma X es un metacéntrico grande, y se lo identificó por homología con el cariomorfo publicado por Ortells, Contreras y Reig (1990) correspondiente a esta misma población. Estos autores hallaron un segundo par telocéntrico que portaba la constricción secundaria (par 24), hecho que no pudo ser corroborado, probablemente por el estado semi-difuso que presentaba la cromatina en las metafases estudiadas.

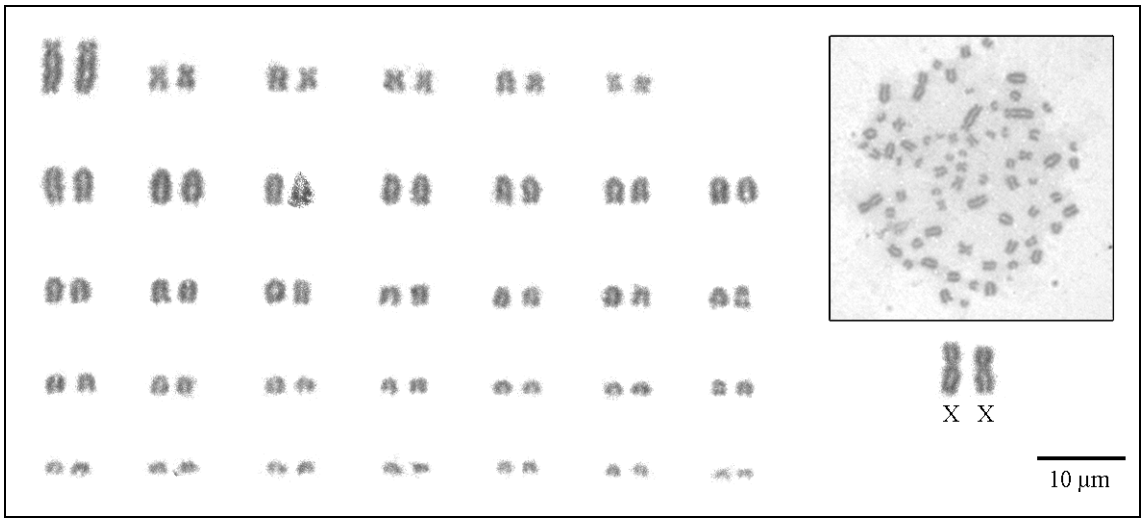


Figura 27. Cariograma del individuo 174, de la población de Mbarigüí, 2n=70, NF=84. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.5 Paraje Sarandicito

Se analizó la constitución cromosómica de 1 macho (213) y 1 hembra (212) capturados en la población de Paraje Sarandicito, localidad adscripta a la especie *Ctenomys dorbignyi.* El cariomorfo hallado 2n=70 NF=84, resultó indistinguible del de la población de Mbarigüí, localidad tipo de *C. dorbignyi* (Figura 27).

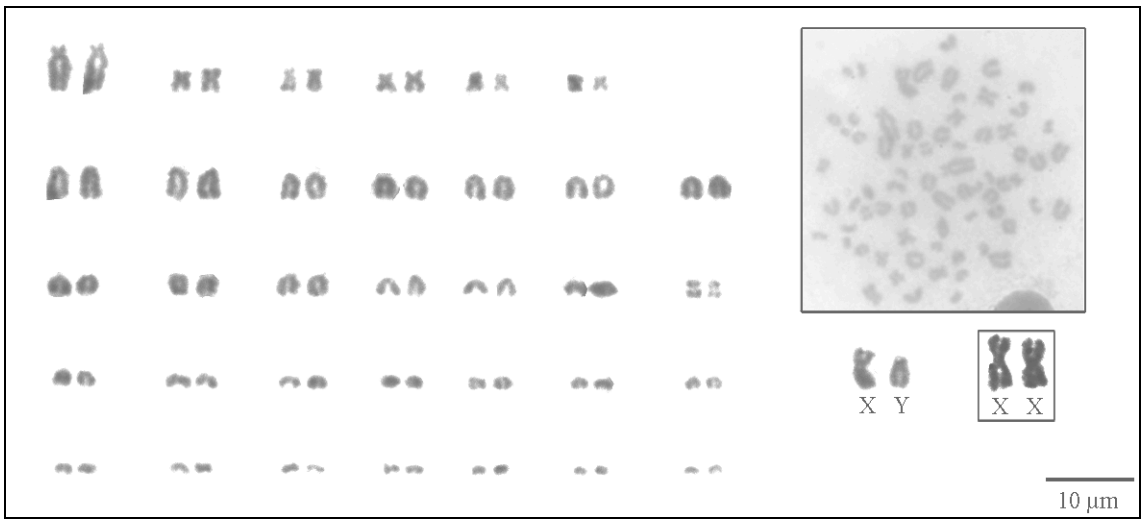


Figura 28. Cariograma del individuo 213, de la población de Paraje Sarandicito, 2n=70, NF=84, indistinguible del individuo 212 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha,

debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.6 Santa Rosa

Se analizaron 2 hembras (229 y 231) y 2 machos (230 y 232) provenientes de la población de Santa Rosa. Todos los individuos mostraron un cariomorfo con 2n=66 y NF≥86, el mayor NF registrado en el grupo Corrientes. El complemento consta de 10 pares bibraquiados y 22 pares telocéntricos. Entre los autosomas bibraquiados, los mayores son un submetacéntrico y un acrocéntrico, seguidos de un submetacéntrico mediano, además de 2 submetacéntricos chicos y 4 metacéntricos chicos. En el 4to par bibraquiado se observa la constricción secundaria. En los pares telocéntricos pueden distinguirse dos mayores, 8 medianos, y 13 pares monobraquiados pequeños. El cromosoma X es submetacéntrico mediano/grande, y el cromosoma Y es submetacéntrico mediano, más pequeño que el X.

En esta población se encontró un polimorfismo inusual en el grupo Corrientes: todos los individuos presentaban variaciones en el NF debido a la presencia de brazos cortos muy pequeños en algunos cromosomas considerados telocéntricos. Es necesario aclarar que el número de estos brazos cortos pequeños varió entre metafases en el mismo individuo, lo que abre la pregunta de si se trata de un mosaicismo o es producto de un artefacto de la técnica. De tenerlos en cuenta, el número fundamental computado sería en algunas metafases de los 4 individuos analizados de 94 brazos (contándose valores dentro del rango 86-94 en todos los individuos estudiados).

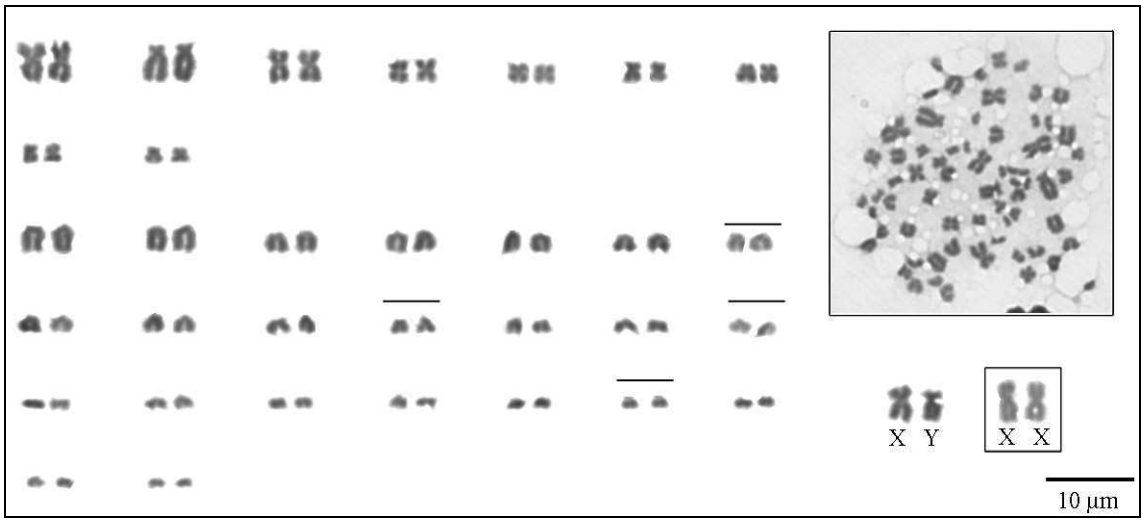


Figura 29. Cariograma del individuo 230, de la población de Santa Rosa, 2n=66, NF=86, indistinguible de los individuos 229, 231 y 232 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. En esta población se hallaron polimorfismos para la adición de brazos cortos pequeños de distintos pares monobraquiados (se señalan con una línea superior los cromosomas en los que se observó dicha variación en la foto utilizada para confeccionar el cariograma). Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.7 San Roque

Se analizaron 2 hembras (135 y 136) y 1 macho (137) provenientes de la localidad de San Roque. Los 3 individuos tienen un cariomorfo 2n=62 NF=84, con 11 pares bibraquiados y 20 pares telocéntricos (Figura 30). El complemento autosómico bibraquiado consta de 6 pares submetacéntricos, un par acrocéntrico y 3 pares metacéntricos pequeños. La constricción secundaria se encuentra en el 5to par bibraquiado. Los pares telocéntricos se dividen en un par mayor, 10 pares medianos de tamaño gradualmente decreciente y 9 pares telocéntricos pequeños. El cromosoma X es un submetacéntrico mediano y el cromosoma Y es u metacéntrico mediano. Este cariomorfo no tiene diferencias con aquél descripto para esta misma población, ni con el hallado en la población M.F. Mantilla por Ortells, Contreras y Reig (1990).

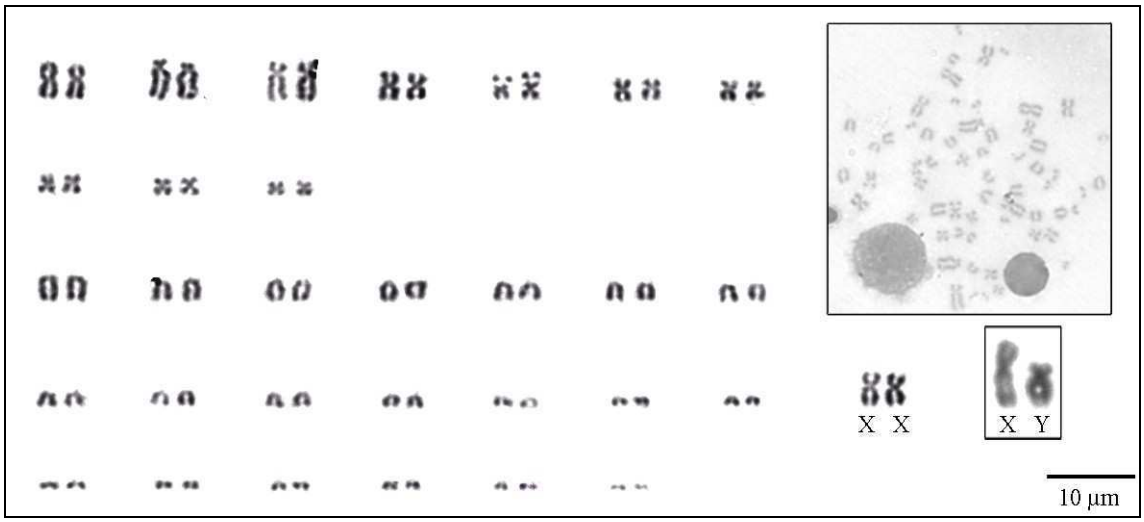


Figura 30. Cariograma del individuo 136, de la población de San Roque, 2n=62, NF=84, indistinguible de los individuos 135 y 137 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.8 Chavarría

Se analizaron 3 machos (149, 150 y 153) y 2 hembras (151 y 152) muestreados en la localidad de Chavarría. La población resultó monomórfica, con 2n=56 y NF=84, a diferencia del 2n=58, NF=84 publicado en forma de tabla (Giménez *et al* 2002; Lanzone *et al* 2007). El conjunto de autosomas bibraquiados consta de 13 pares, de los cuales 2 son acrocéntricos, 7 submetacéntricos y 4 son metacéntricos. En el 8vo par bibraquiado se encuentra la constricción secundaria. El complemento autosómico telocéntrico se compone de un par mayor, 2 medianos, y 11 pares que decrecen en forma gradual. El par sexual consta de un cromosoma X metacéntrico mediano, y el Y es un submetacéntrico pequeño.

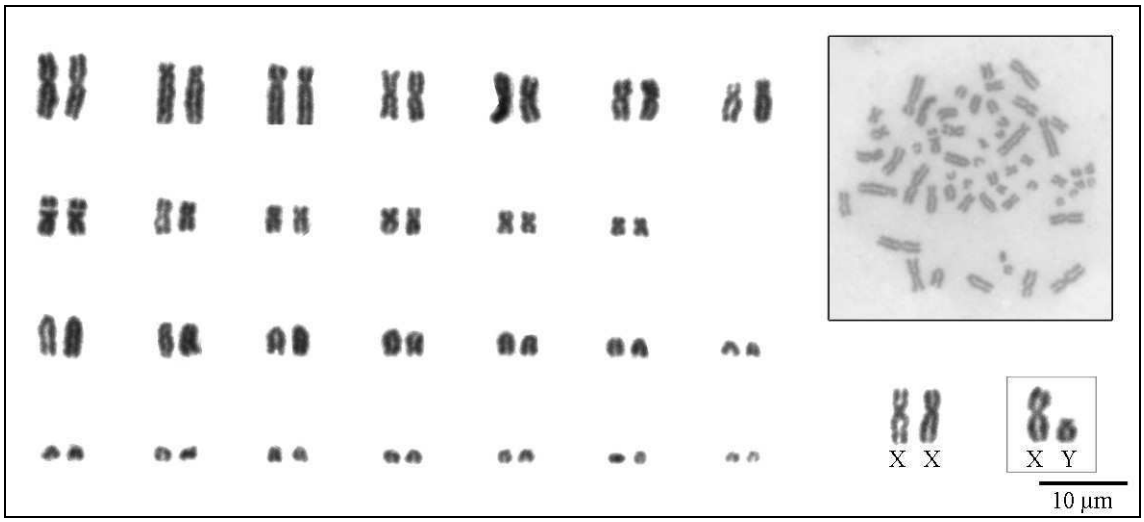


Figura 31. Cariograma del individuo 152, de la población de Chavarría, 2n=56, NF=84, indistinguible de los individuos 149, 150, 151 y 153 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.9 Saladas centro

En la población de Saladas centro, por estar cerca de la zona urbana del pueblo del mismo nombre) se muestrearon 2 hembras (128 y 129), ambas con 2n=54, NF=84. Un total de 15 pares bibraquiados y 12 pares telocéntricos integran el complemento (Figura 32). Entre los autosomas bibraquiados la disminución en tamaño es relativamente gradual y se compone de 2 pares acrocéntricos, uno grande y uno mediano, 6 pares submetacéntricos y 6 pares metacéntricos (incluyendo al metacéntrico más pequeño que produce una discontinuidad en la serie). La constricción secundaria se observa en el 9no. par bibraquiado. Dos pares telocéntricos son grandes, un par es mediano, mientras que los 9 pares restantes son pequeños.

El cariomorfo de esta población coincide con el descripto por Ortells, Contreras y Reig (1990), que además hallaron cariomorfos con 2n=55 y 2n=56, según su condición para un reordenamiento robertsoniano que involucra al 7mo. par bibraquiado. En base a los cariomorfos de individuos macho y hembra incluidos en el trabajo citado, se identificó el

cromosoma X, que es un metacéntrico mediano (mientras que el Y sería un submetacéntrico pequeño).

La morfología global de este cariomorfo resulta similar al hallado en la población de Chavarría, y su relación resultaría de una fusión del 3er. y 4to. par telocéntrico del cariomorfo 2n=56, o de la fisión de un par sub/metacéntrico mediano (el 5to o 6to) presente en el cariomorfo 2n=54 (Figura 31 y Figura 32).

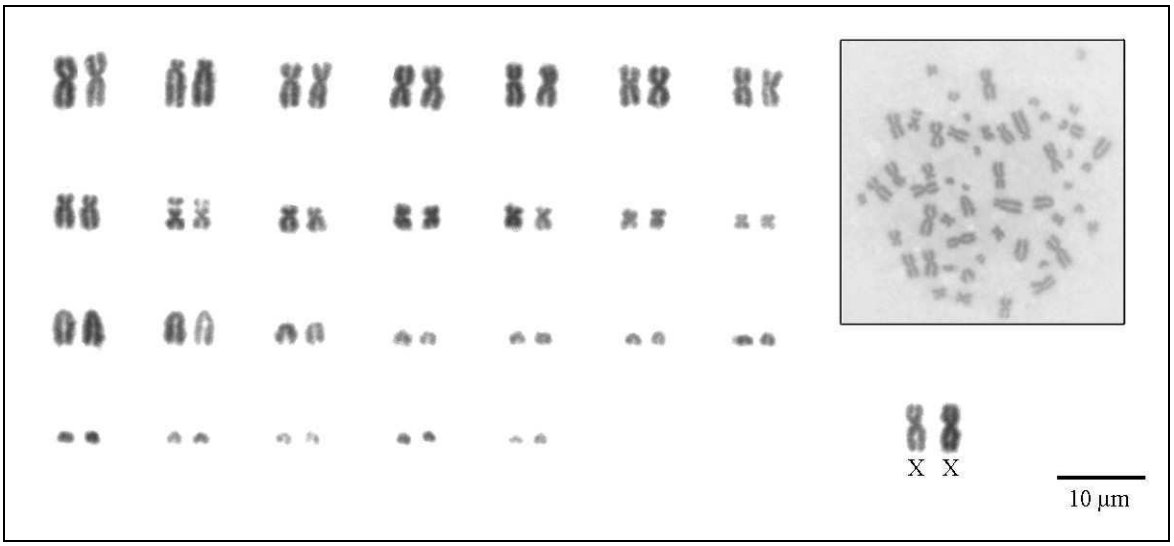


Figura 32. Cariograma del individuo 128, de la población de Saladas centro, 2n=54, NF=84, indistinguible del individuo 129 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. En esta población Ortells, Contreras y Reig (1990) hallaron polimorfismos para un reordenamiento robertsoniano que involucra al 7mo par bibraquiado (arriba, a la derecha), que originan los cariomorfos 2n=55 y 2n=56. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

3.2.10 Saladas Sur

La localidad Saladas Sur (o Saladas Km Sur) dista 7,3 km de la localidad de Saladas centro, en dirección suroeste. De los 8 individuos estudiados solamente se pudo obtener el cariograma de una hembra (individuo 134). El resto de los individuos mostró un patrón anómalo en el estado de compactación de la cromatina: los cromosomas no tenían límites precisos y no fue posible determinar la posición de los centrómeros, por lo que fueron excluidos del análisis. El cariomorfo hallado resultó 2n=51 NF=84, y es portador de un

reordenamiento robertsoniano en heterocigosis. El complemento consta de 16 pares bibraquiados (el 4to. par está en heterocigosis), y 8 pares telocéntricos (además de los brazos monobraquiados involucrados en la fusión/fisión). El conjunto de autosomas bibraquiados se compone de 9 pares submetacéntricos, 2 pares acrocéntricos y 4 pares metacéntricos. El décimo par porta la constricción secundaria. Los autosomas telocéntricos constan de uno grande y uno mediano involucrados en la fusión/fisión, y 8 pares pequeños de tamaño uniforme. El cromosoma X es metacéntrico grande, identificado por homología con el cariomorfo hallado en la población de Saladas centro.

La existencia de un cariomorfo heterocigota permite plantearse la ocurrencia de un homocigota 2n=52. Este cariomorfo diferiría en un evento de fusión/fisión con el 2n=54 hallado en Saladas centro. El 4to. par bibraquiado hallado en el cariomorfo 2n=51 estaría en estado fisionado, originando los para telocéntricos 1 y 3 en homocigosis (Figura 32, Figura 33). El cariomorfo hipotético de 2n=52, compartiría un par submetacéntrico con el 2n=51, que aparece fisionado, involucrando el segundo par telocéntrico y un par telocéntrico menor en el cariomorfo 2n=54.

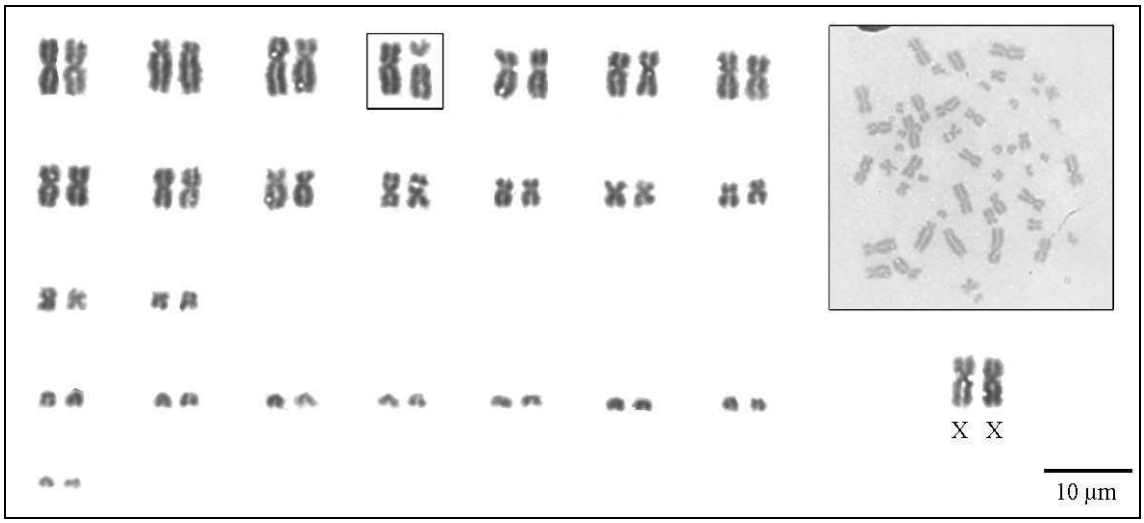


Figura 33. Cariograma del individuo 134, de la población de Saladas sur, 2n=51, NF=84. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. Este cariomorfo resulta heterocigota para un reordenamiento robertsoniano, en el que intervienen los cromosomas telocéntricos mayores (recuadrados), homólogos a los brazos corto y largo de un par

submetacéntrico, el tercero del complemento de bibraquiados. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

En la región que comprende las poblaciones de Saladas centro, Saladas Km Sur, Pago de los deseos, Paraje Santo Domingo, Yatytí Calle, Pago Alegre, Loma Alta y Mburucuyá, se ha encontrado un rango de 2n continuo entre 51 y 58 (Ortells, Contreras y Reig 1990 y el presente trabajo de tesis), habiéndose encontrado polimorfismos explicables por fusiones/fisiones en la mayor parte de las poblaciones, es decir que, este grupo tiene una tasa de reordenamientos robertsonianos elevada.

3.2.11 Goya

Se analizó la constitución cromosómica de 2 hembras (183 y 184) y 2 machos (181 y 182) capturados en la población de Goya, localidad tipo de *Ctenomys perrensi*. Acorde con el cariotipo publicado anteriormente (Ortells, Contreras y Reig 1990) todos los individuos tienen 2n=50 NF=84 (Figura 34). El complemento autosómico se compone de 8 pares telocéntricos pequeños de tamaño uniforme y 16 pares bibraquiados. El conjunto de autosomas bibraquiados se compone de 10 pares submetacéntricos, 1 par acrocéntrico y 5 pares metacéntricos. El noveno par porta la constricción secundaria. El cromosoma X es metacéntrico grande y el cromosoma Y es un submetacéntrico mediano.

Figura 34. Cariograma del individuo 183, de la población de Goya, 2n=50, NF=84, indistinguible de los individuos 181, 182, y 184 de la misma población. Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha, debajo de la foto de la metafase con la que se confeccionó el cariograma. El par sexual recuadrado proviene de un individuo de sexo opuesto al tomado como referencia. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm.

El cariomorfo hallado en Goya tiene una marcada similitud con aquel hallado en la población de Saladas Sur (Figura 33 y Figura 34). El par con la constricción secundaria y los dos siguientes hallados en Goya aparecen entremezclados, con respecto al cariomorfo de Saladas Sur. De todos modos el tamaño de estos tres pares es muy semejante. Salvo por esa diferencia, estos cariomorfos resultan indistinguibles por tinción uniforme.

3.2.12 Las fusiones/fisiones son el tipo de reordenamiento más frecuente en el grupo Corrientes

Se describieron cariomorfos heterocigotas para reordenamientos robertsonianos en 3 poblaciones del grupo Corrientes: Contreras Cué, Paraje Caimán y Saladas Sur, sugiriendo que este tipo de reordenamiento es recurrente o bien es mantenido a nivel intrapoblacional. Además, es posible establecer vínculos mediados por eventos de fusión/fisión entre al menos dos grupos de cariomorfos: los de 2n=42-44 NF=76-78, hallados en las poblaciones dentro y en la periferia de los Esteros del Iberá, por un lado, y los cariomorfos de NF=84, que comparten las poblaciones de Mbarigüí, Paraje Sarandicito, San Roque, Chavarría, Saladas centro, Saladas Sur, Goya, por el otro. En este último grupo la constancia en el NF contrasta con la altísima variación en el 2n, habiéndose descripto cariomorfos específicos de cada población (salvo el cariomorfo 2n=70, NF=84), lo que también sugiere que los reordenamientos más frecuentes han sido de tipo robertsoniano. En las poblaciones ubicadas dentro y en la periferia de los Esteros de Iberá, además habría ocurrido un reordenamiento afectando simultáneamente al 2n y al NF, por lo que probablemente en este grupo haya ocurrido al menos una fusión en tándem. Este reordenamiento podría también explicar la relación entre el cariomorfo 2n=48 NF=80 hallado en Estancia San Luis y el 2n=46 NF=78, hallado en Paraje Caimán.

3.3 Evolución del satélite SRPC en el grupo Corrientes

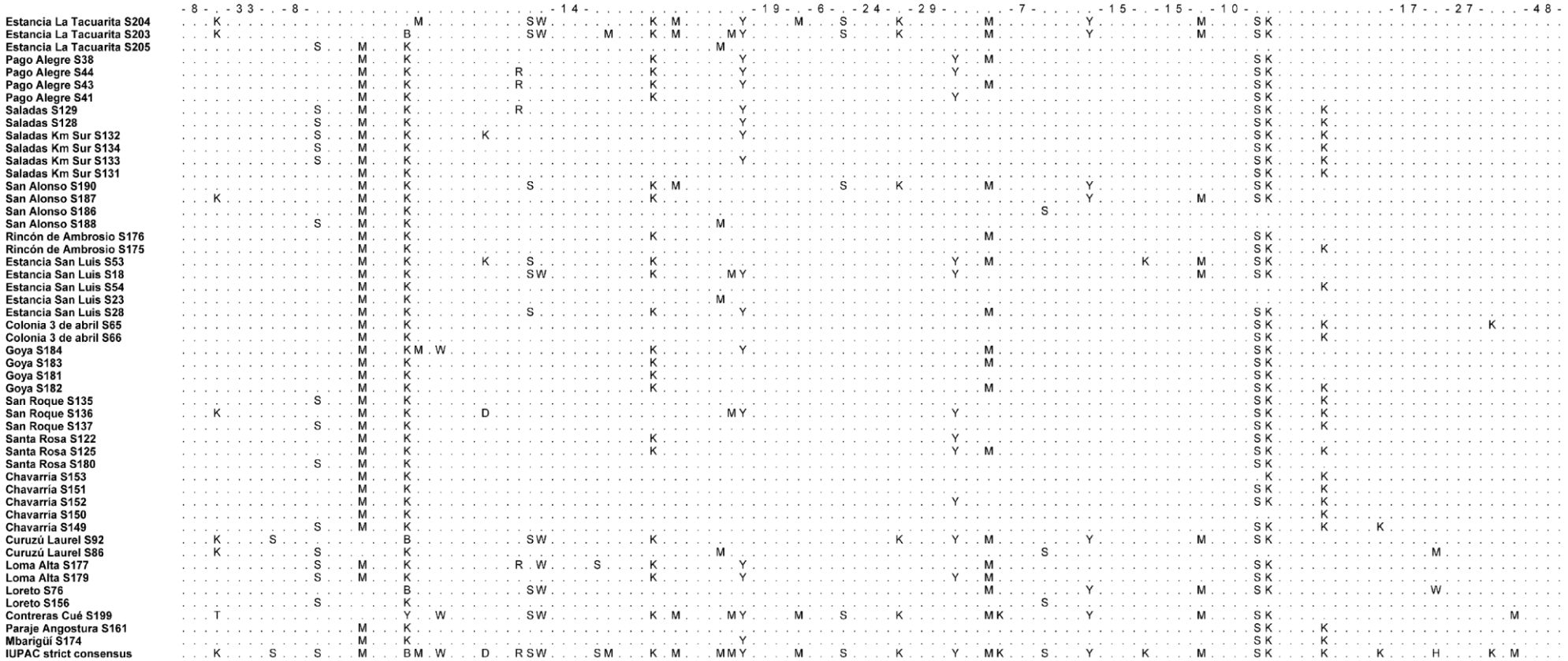
El grupo Corrientes es un complejo de especies y formas cercanamente relacionadas, lo que lo convierte en un modelo interesante para evaluar la hipótesis de biblioteca ancestral de variantes monoméricas postulada para los ADN satélites (ver ítem 1.6.3 de Introducción). Además, simultáneamente es posible evaluar la relación entre la dinámica expansión-contracción-estasis y la evolución de la secuencia del ADN satélite. Se estimó entonces el número de copias y se estudió la variabilidad nucleotídica de SRPC en 50 individuos correspondientes a 18 poblaciones correntinas.

3.3.1 Los polimorfismos intragenómicos de la secuencias de SRPC *son compartidos entre los miembros del grupo Corrientes*

Se obtuvieron las secuencias genómicas consenso (*sgc*) correspondientes a los 348 pb totales de SRPC (ver ítem 2.10 de Materiales y Métodos) en 50 individuos pertenecientes a 18 poblaciones del grupo Corrientes. Se computó un consenso estricto de las 50 secuencias, que reveló un 10,06% de posiciones variables (35/348), siendo la mayor parte (23/35 posiciones, 77,14%) compartidas por al menos 2 individuos (Figura 35). El 98,9% de los *ip*s está compuesto por 2 variantes, mientras que el 1,1% restante corresponde a *ip*s con 3 variantes.

Al igual que en un estudio que comparó *sgc* de otras especies de *Ctenomys* (Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007) la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de la secuencia SRPC. Hay largos segmentos que se mantienen invariantes, siendo los más extensos de 27, 29, 33, y 48 pb (Figura 35), lo que sugiere que existe algún tipo de restricción en la evolución de estas regiones. El contenido A+T (56%) en las 50 *sgc* obtenidas para los tuco-tucos correntinos también coincide con la composición estimada en otras especies del género (Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007).

La región con un 70% de identidad con las secuencias ARS en levaduras (5' WTTTATRTTTW 3'), descripta en la secuencia monomérica de SRPC (Rossi 1990), está ubicada entre las posiciones 37 y 47 de las *sgc* (la numeración se estableció tomando la mitad del sitio de corte PvuII como base 0, y esta posición coincide con el complemento reverso de la secuencia ARS) totalmente conservada en los 50 individuos analizados, a excepción del individuo 92, de Curuzú Laurel, que presenta S = G+C, en la posición 43, mientras que las demás poseen una G en esa posición. El *ip* de ese sitio interrumpe dos segmentos invariantes, de 33 y 8 pb respectivamente, dentro de los cuáles se localiza el origen de replicación potencial.


- 8 - - 3 3 - - 8 - - -

3.3.2 Los sitios variables de SRPC en el grupo Corrientes solapan con los sitos variables de otros linajes de Ctenomys

La hipótesis de una biblioteca ancestral de variantes de SRPC permite predecir que de no haber homogenización y fijación completas, las variantes ancestrales estarán presentes en los linajes derivados actuales. Si existiera una biblioteca ancestral común a todos los tuco-tucos, se esperaría que las variantes observadas en el grupo Corrientes estén parcial o totalmente compartidas con las demás especies del género. Por el contrario, si hubieran surgido variantes *de novo* que sufrieran posterior homogenización y fijación, propias del grupo Corrientes, entonces sería esperable que dichos sitios no compartan variantes con las especies externas a este grupo.

El consenso estricto de las 50 *sgc* de los tuco-tucos del grupo Corrientes se comparó con el consenso estricto de 10 *sgc* pertenecientes a especies de *Ctenomys* de otros linajes (Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007) (Figura 36). Todos los *ip*s hallados en el grupo Corrientes solapan parcial o totalmente con el consenso estricto de las especies externas a Corrientes, lo que indica que de haber surgido variantes novedosas en el ancestro común al grupo Corrientes, ninguna se habría fijado, y que en todos los sitios persistirían variantes ancestrales, comunes al género.

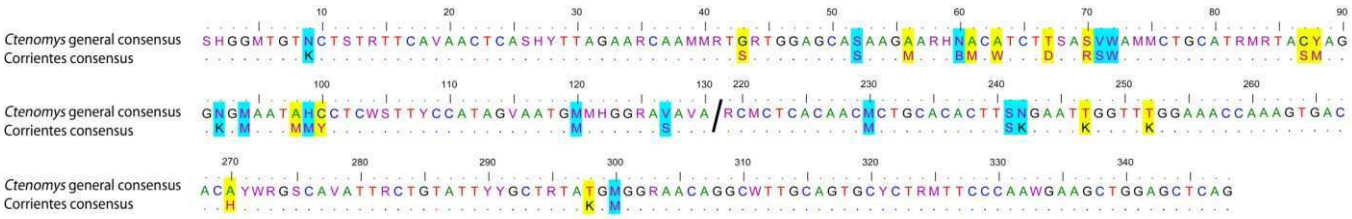


Figura 36. Consenso estricto de 50 *sgc* del grupo Corrientes alineado con el consenso estricto de 10 *sgc* pertenecientes a otros linajes de *Ctenomys* (*Ctenomys* general consensus) (Ellingsen, Slamovits y Rossi 2007). Los sitios invariantes del consenso estricto del grupo Corrientes se muestran como puntos, mientas que los *polimorfismos intragenómicos* se muestran utilizando la convención IUPAC. Se muestra una subsecuencia de 260 pb. Las secuencias a ambos lados de la barra oblicua (/) no son contiguos, dado que el consenso estricto de *Ctenomys* general no incluye un segmento central de 88 pb.

3.3.2.1 No hay fijación completa de variantes y la variabilidad es menor entre poblaciones que dentro de una población: un rol menor para la conversión génica.

Los mecanismos de homogenización no habrían sido lo suficientemente intensos como para fijar variantes propias del grupo Corrientes, como lo sugiere la comparación con las *sgc* de otras especies de *Ctenomys*. Cabe preguntarse también cuál es el grado de homogenización de secuencias dentro del grupo Corrientes. Ninguno de los sitios variables del grupo Corrientes exhibe completa fijación, i.e. cuando dos *sgc* poseen diferentes variantes fijadas, otra *sgc* posee *ip*s con ambas variantes (Figura 35. Por ejemplo, en la posición 9, todas las secuencias que llevan un punto tienen G, mientras que la secuencia del individuo 199 tiene una T en ese sitio. El *ip* de esa posición, compartido por 6 secuencias involucra ambas variantes, K: G+T), lo que indica que la intensidad de homogenización sería moderada en el grupo Corrientes.

Como fuera discutido por Ellingsen, Slamovits y Rossi (2007), la conversión génica influiría preferencialmente en el establecimiento local de variantes novedosas (surgidas por mutaciones *de novo*), mientras que las expansiones/contracciones diferenciales promovidas por amplificación por círculo rodante o por entrecruzamiento desigual tendrían un rol preponderante en configurar los perfiles globales de SRPC. La ausencia de variantes fijadas sugiere un rol menor para la conversión génica. Adicionalmente se evaluó la conversión génica comparando la variabilidad de SRPC dentro y entre poblaciones (ver ítem 2.11 de Materiales y Métodos). Cuando se analizó la distribución de las fuentes de variabilidad de SRPC mediante un AMOVA, el 64,88⁄ correspondió a la variación intrapoblacional, mientras que el 35,12⁄ restante a la variación interpoblacional, lo que reflejaría una baja tasa de homogenización intrapoblacional, y/o flujo génico entre las poblaciones. La primera explicación parece la más verosímil, dado que la monofilia observada en la mayor parte los haplotipos de las distintas poblaciones en la filogenia mitocondrial (ver ítem 3.1.2.2.1 de Resultados), indicaría que no hay flujo génico entre ellas.

3.3.3 Un satélite activo: el número de copias de SRPC varía dentro de las poblaciones

Se estimó el número de copias de SRPC de los 50 individuos de la provincia de Corrientes para los que se obtuvieron las *sgc*, mediante la técnica de *dot blot*. Por cada muestra se sembraron 3 puntos de 20, 200 y 2000 ng de ADN genómico. La sonda fue obtenida a partir de productos de PCR de los amplicones A y C en igual concentración. Los valores absolutos de número de copias se obtuvieron utilizando dos curvas de calibración

independientes, ambas con 7 puntos en las mismas concentraciones estimadas de SRPC (ver ítem 2.15.1 de Materiales y Métodos), pero de orígenes diferentes. Una curva fue realizada por duplicado, a partir de productos de PCR de ambos amplicones de representantes de 6 poblaciones correntinas y una especie tucumana. La otra curva fue obtenida a partir de diluciones de ADN genómico de una muestra de *C. tuconax* (rótulo 294), cuantificada por Claudio Slamovits (Slamovits *et al* 2001; Slamovits 2002a), para la que se estimaron unas 250.000-300.000 copias por genoma.

Los números de copias de cada dilución de ADN genómico sembrada fueron estimados en distintos tiempos de exposición. Los puntos que contenían altas cantidades de SRPC fueron cuantificados en un tiempo de exposición mínimo, de 40 minutos. También se revelaron placas tras 35 hs, 48 hs, 1 semana y 11 días de exposición, con el fin de obtener imágenes no saturadas de muestras en el rango de millones a pocos miles de copias. De la curva de calibración se tomaron 3 o 4 puntos (el blanco y 2 o 3 puntos de ADN sembrado) con los que se realizaron regresiones lineales de las variables número de pixeles vs. número de copias teórico, dado que las restantes podrían o bien saturar o hibridar cantidades indetectables de sonda para ese tiempo de exposición. En cada placa revelada únicamente se cuantificaron aquellos puntos que cayeran dentro del rango de la curva de calibración utilizados en la regresión lineal.

El rango de número de copias de SRPC de los tuco-tucos del grupo Corrientes fue de 118-2700 x 10^3 copias por genoma (Tabla 5), que representa valores bajos a intermedios respecto a los hallados en un espectro más amplio de especies de *Ctenomys* (Slamovits *et al* 2001). Teniendo en cuenta que SRPC probablemente constituya la mayor parte de la heterocromatina C+ presente en los cariotipos de los tuco-tucos del grupo Corrientes, como sucede en otros grupos de *Ctenomys* (Rossi *et al* 1995b), estos valores concuerdan con las cantidades moderadas a bajas de heterocromatina C+ encontradas en este grupo (Reig *et al* 1992; García *et al* 2000b). Un individuo, el número 28, correspondiente a Estancia San Luis, fue excluido del análisis debido a que debió haber habido errores procedimentales, tales que las 3 diluciones no guardaban una relación de 1 orden de magnitud entre sí. La muestra fue agotada luego de un experimento, por lo que no pudo replicarse y obtener un valor definitivo del número de copias de SRPC.

El rango de variación en el número de copias de SRPC entre individuos de una misma población resultó elevado (Tabla 5). Las diferencias en el número de copias de SRPC a nivel

intrapoblacional no son tan conspicuas como las halladas entre especies (hasta 3 órdenes de magnitud) (Slamovits *et al* 2001), pero alcanzan un orden de magnitud. Los Individuos de Curuzú Laurel difieren en 14 veces el número de copias de SRPC, mientras que en Estancia La Tacuarita llegan a 9,5 veces. Las poblaciones de Loreto y San Alonso tienen diferencias de hasta 4 veces, mientras que en Estancia San Luis y Chavarría el individuo con mayor número de copias triplica a la que menos copias del satélite posee. Los individuos de las poblaciones restantes tienen rangos de variación de alrededor del doble de número de copias. El alto nivel de variación intrapoblacional en el número de copias de SRPC observado sugiere que este satélite estaría sufriendo amplificaciones y deleciones recurrentes en estos genomas.

Localidad	Dot Blot	# copias SRPC (*10^3)	*ip*s
Estancia La Tacuarita S204		136	15
Estancia La Tacuarita S203		152	16
Estancia La Tacuarita S205		1298	4
Pago Alegre S38		267	8
Pago Alegre S44		364	8
Pago Alegre S43		455	8
Pago Alegre S41		644	6
Saladas S129		370	8
Saladas S128		430	7
Saladas Km Sur S132		367	8
Saladas Km Sur S134		398	6
Saladas Km Sur S133		458	7
Saladas Km Sur S131		714	5
San Alonso S190		214	11
San Alonso S187		399	8
San Alonso S186		1146	3
San Alonso S188		1240	4
Rincón de Ambrosio S176		381	6
Rincón de Ambrosio S175		910	5
Estancia San Luis S53		222	11
Estancia San Luis S18		300	11
Estancia San Luis S54		722	3
Estancia San Luis S23		778	3
Contreras Cué S199		167	18

Localidad	Dot Blot	# copias SRPC (*10^3)	*ip*s
Colonia 3 de abril S65		360	6
Colonia 3 de abril S66		682	5
Goya S184		1532	9
Goya S183		1669	6
Goya S181		2032	5
Goya S182		2700	7
San Roque S135		405	6
San Roque S136		700	10
San Roque S137		826	6
Santa Rosa S122		682	6
Santa Rosa S125		696	8
Santa Rosa S180		1327	5
Curuzú Laurel S92		118	13
Curuzú Laurel S86		1745	6
Loma Alta S177		196	11
Loma Alta S179		441	9
Loreto S76		118	9
Loreto S156		505	3
Chavarría S153		354	4
Chavarría S151		359	5
Chavarría S152		688	6
Chavarría S150		787	3
Chavarría S149		919	7
Mbarigüí S174		324	6
Paraje Angostura S161		1317	5

Tabla 5. Número de copias de SRPC (x10^3) y número de *ip*s estimados en 49 individuos de *Ctenomys* del grupo Corrientes. De izquierda a derecha los 3 puntos corresponden a los experimentos de *dot blot* en los que 2000, 200 y 20 ng de ADN genómico por individuo fueron hibridados con una sonda radiactiva de SRPC.

3.3.4 La asociación inversa entre el número de copias y la variabilidad nucleotídica global (dentro de cada población) es explicable si éstas estaban presentes en el ancestro: hipótesis de la biblioteca ancestral

Cuando se analizaron los valores de *ip*s y de número de copias de SRPC dentro de cada población, ambas variables mostraron una asociación inversa en la mayor parte de las poblaciones: los individuos con menor número de copias de SRPC tienen mayor número de *ip*s (Tabla 5). Esta asociación se comprobó en todas las poblaciones excepto por San Roque y Chavarría, en las que esta relación parece errática. Esta observación es coherente con la hipótesis de una biblioteca ancestral de SRPC ya que si a partir de un repertorio común de variantes, una se amplificara marcadamente más que las demás, entonces las variantes restantes se volverían indetectables en los electroforegramas obtenidos (los picos minoritarios serían despreciables frente al correspondiente a la variante amplificada). Por el contrario, si SRPC sufriera una deleción de la variante mayoritaria, la cantidad relativa de las variantes nucleotídicas minoritarias aumentarían, "recuperándose" en los electroforegramas.

4 DISCUSIÓN

4.1 Filogenia mitocondrial del grupo Corrientes: monofilia del grupo y de sus poblaciones, los tres clados principales.

La elucidación de relaciones filogenéticas entre los linajes es una herramienta fundamental en Evolución: permite no sólo trazar un escenario de la evolución del grupo, sino también "mapear" en el árbol filogenético los caracteres relevantes del grupo. El grupo de especies y formas del grupo Corrientes es particularmente interesante porque gran parte de las poblaciones que lo conforman se sitúa en la zona de influencia del sistema de lagunas y esteros de la provincia, en ambientes inestables en el tiempo y el espacio, lo cual ha tenido una influencia decisiva en su evolución. En la evolución de este grupo de roedores subterráneos confluyen fenómenos de diversos niveles: los procesos iniciales de divergencia de linajes del grupo, los eventuales procesos de contacto e hibridación entre ellos y el rol de la conspicua variabilidad cromosómica que presenta este complejo de especies en estos procesos. La elucidación de las relaciones filogenéticas de las especies y formas del grupo Corrientes es imprescindible para analizar los límites entre especies, aspecto particularmente sensible no sólo desde una perspectiva teórica acerca del concepto de especie y de los procesos de especiación, sino también para diseñar políticas de conservación de la biodiversidad, particularmente en los dos extensos sitios protegidos de la provincia, la Reserva Provincial de los Esteros del Iberá y el Parque Nacional Mburucuyá.

En este trabajo se abordó el estudio de dos aspectos pendientes en relación a la taxonomía de este grupo: por un lado, el análisis filogenético, incorporando las secuencias concatenadas de tres marcadores mitocondriales cyt-b, COI y *D-loop*, además de un número importante de taxones (el mayor número incluido hasta ahora) que, en conjunto, permitieron esclarecer relaciones entre linajes no resueltas en estudios previos (Mascheretti *et al* 2000; Giménez *et al* 2002). Respecto las tres metodologías utilizadas en los análisis filogenéticos, *neighbor-joining*, máxima parsimonia y métodos bayesianos, las tres difieren, como se explicó en la introducción, en los criterios *a priori*, con sus ventajas y desventajas. El criterio que se adoptó en este trabajo fue el de tomar en consideración aquellos grupos que estuvieran soportados por alguna de las metodologías, y no fuera contradicho por las restantes. Por otro lado, en este trabajo se completó el panorama cromosómico del grupo, contribuyendo una línea de evidencia independiente que permite reinterpretar los clados definidos en la filogenia

mitocondrial, y viceversa: la evolución cromosómica puede interpretarse mapeando reordenamientos en el árbol mitocondrial.

La filogenia mostró que el grupo Corrientes es monofilético, es decir constituye un grupo natural, hermano de *C. pearsoni*, especie característica de las costas uruguayas pero cuya distribución llegaría por lo menos hasta la localidad de Médanos en Entre Ríos (García *et al* 2000b). El grupo Corrientes queda dividido en varios clados principales bien soportados (ver ítem 3.1.2.2, en Resultados). Las poblaciones previamente asociadas a *C. dorbignyi* resultan agrupadas en dos clados de diferentes. El linaje de la distribución austral resultó basal al linaje de *C. perrensi* y de los haplotipos hallados en Chavarría. El linaje de la distribución boreal cae en una politomía de donde divergen los dos restantes clados principales. Uno de ellos contiene poblaciones en la zona de influencia del Estero de Santa Lucía, y el río homónimo, entre las que se incluye el linaje, muy diferenciado, de *C. roigi*. El clado restante, que contiene a las poblaciones bajo la influencia directa de los Esteros del Iberá, mostró ser un grupo bien diferenciado de los demás tanto por su posición en el árbol, como por sus cariomorfos (ver más adelante, ver ítem 4.7 en Discusión).

Como se mencionó, la monofilia recíproca de las poblaciones es una evidencia indirecta de estructuración geográfica, hecho consistente con un aislamiento por distancia significativo, resultante del test de Mantel ($p<0,01$. La correlación entre las distancias genéticas y geográficas es significativamente mayor que la que se esperaría por azar). Sin embargo, la inclusión de solo dos individuos por población no es suficiente para afirmar que una población es monofilética. En cambio, se pueden establecer hipótesis de sorting incompleto o hibridación entre aquéllas poblaciones cuyos haplotipos fallen a la monofilia recíproca.

4.2 Dos poblaciones resultaron parafiléticas en la filogenia mitocondrial: ¿sorting incompleto o hibridación?

La habilidad de un marcador para trazar con precisión la filogenia de un conjunto de organismos depende de su tiempo de fijación por deriva (en inglés, *lineage sorting period*). El tiempo de fijación por deriva (*tfd*) de un determinado marcador se verá afectado por la forma en que éste se herede, así como por características poblacionales y reproductivas del grupo de organismos que se trate. Los marcadores de herencia uniparental tienen un Ne 4 veces menor

al de los marcadores autosómicos, por lo que el tiempo de fijación por deriva de los primeros será de ¼ respecto de los de herencia biparental (Moore 1995). Además estos marcadores, en mamíferos los *loci* del cromosoma Y y los mitocondriales, se ven más afectados por el sistema de apareamiento o por la ocurrencia de sesgo en la dispersión de los dos sexos. La poliginia aumenta la varianza en el éxito reproductivo de los machos, y consecuentemente disminuye el Ne, reduciendo el *tfd* tanto en los marcadores de herencia biparental como en cromosoma Y (Tosi, Morales y Melnick 2003). La migración de machos tendría un efecto análogo al de la poliginia. Por otra parte, el alto grado de filopatría en hembras, característica común a la mayor parte de especies de mamíferos, extiende el *tfd* particularmente en los marcadores mitocondriales en comparación con los nucleares biparentales y del cromosoma Y, produciendo un patrón de estructuración geográfica (Tosi, Morales y Melnick 2003).

Las incongruencias entre marcadores de herencia materna y biparental como producto de la dispersión mediada por machos ha sido bien documentada en roedores (Bryja *et al* 2010), en elefantes (Nyakaana y Arctander 1999), en macacos (Tosi, Morales y Melnick 2003), así como en lagartijas (Godinho, Crespo y Ferrand 2008). Aunque un trabajo reciente muestra que en *C. porteousi* y *C. australis* no se habría encontrado diferencia en la dispersión de machos y hembras (Mora, Kittlein y Mapelli 2012), en varias especies de *Ctenomys*, las hembras se caracterizan por tener una mayor filopatría y los machos una mayor dispersión (Lacey 2001; Cutrera, Lacey y Busch 2005; Fernández-Stolz, Stolz y Freitas 2007; Mora *et al* 2010). La filopatría y dispersión de machos y hembras en el grupo Corrientes no fue estudiada hasta ahora, pero si las hembras fuesen filopátricas y la dispersión fuera mediada por machos migrantes, un escenario muy frecuente en mamíferos, se esperaría que la filogenia mitocondrial refleje una conspicua estructuración geográfica y que los procesos de hibridación/introgresión no fueran detectados. La estructuración geográfica queda manifestada tanto por el test de aislamiento por distancia como en la monofilia recíproca de los haplotipos de todas salvo dos de las poblaciones estudiadas: Loma Alta y San Miguel (ver ítem 3.1.2.2.1, en Resultados). Las causas de la parafilia de los haplotipos podrían ser dos, *a priori*, indistinguibles entre sí con marcadores de un solo tipo de herencia, por lo que los datos presentes, basados en marcadores mitocondriales, permiten formular hipótesis aunque no testearlas exhaustivamente. Tanto el flujo génico entre poblaciones como el *sorting* incompleto pueden generar polimorfismos compartidos, distorsionando la condición recíprocamente monofilética que se esperaría observar en las poblaciones. Si las hembras de los *Ctenomys* de Corrientes fueran filopátricas, se inclinaría la balanza hacia la hipótesis de

sorting incompleto, pero aunque menos ponderada, no puede descartarse la hipótesis de flujo génico que involucra a las hembras.

Los haplotipos de Loma Alta difieren en 12 sustituciones nucleotídicas en el alineamiento total (1790 nucleótidos) y uno coincide exactamente con aquél hallado en Mburucuyá y el restante con el de Manantiales. La distancia geográfica entre dos de estas poblaciones es corta: 4,83 km separan al punto de muestreo de Mburucuyá del de Loma Alta. Sin embargo la distancia de Loma Alta a Manantiales es de 24 km. La distribución de los haplotipos de Loma Alta puede explicarse en forma sencilla mediante *sorting* incompleto de haplotipos ancestrales. Sin embargo, otro escenario, algo más complejo, es también posible: los tuco-tucos de Loma Alta y Manantiales son parte de una población o de una metapoblación que en el extremo suroeste de su distribución (Loma Alta) habría entrado en contacto con otro haplogrupo (Mburucuyá) estableciéndose un eventual flujo génico. Considerando el mismo escenario, si en cambio existieran barreras al flujo génico entre ambos haplogrupos, su evolución sería independiente aún en simpatría. El análisis cromosómico de los dos haplogrupos y las filogenias resultantes de marcadores nucleares permitirían el análisis en contexto de estas hipótesis. Es importante destacar que la monofilia recíproca de las poblaciones no puede ser puesta a prueba si se toma un único individuo por población, estrategia que aunque resulta obvia, no se ha seguido en la mayor parte de los trabajos de filogenias de especies de tuco-tucos (Lessa y Cook 1998; D'Elía, Lessa y Cook 1999; Mascheretti *et al* 2000; Slamovits *et al* 2001; Castillo, Cortinas y Lessa 2005; Parada *et al* 2011).

Los haplotipos hallados en San Miguel difieren en 17 sustituciones en el alineamiento total, y ninguno de los haplotipos coincide con los hallados en otras poblaciones, sin embargo resultan polifiléticos respecto de los hallados en San Alonso y Paraje Caimán (Figura 20). Los haplotipos de San Miguel no forman grupos monofiléticos con otros haplotipos del grupo Corrientes, lo que hace más verosímil la hipótesis de *sorting* incompleto.

En una filogenia basada en un fragmento de 438 pb del *D-loop* mitocondrial, Tomasco y Lessa (2007) encontraron que ninguna de las 12 poblaciones de *C. pearsoni* estudiadas resultó monofilética respecto de las demás. Los autores argumentan que el de *C. pearsoni* no sería el único caso en que las poblaciones no conseguirían la monofilia recíproca, citando las inferencias filogenéticas realizadas en base a haplotipos de citocromo b del grupo Corrientes (Mascheretti *et al* 2000; Giménez *et al* 2002). Pero, al igual que en el trabajo de Tomasco y Lessa (2007), las filogenias están basadas en un solo *locus* mitocondrial. En esta tesis la

monofilia recíproca de las poblaciones se alcanza al aumentar a tres el número de marcadores utilizados en las búsquedas filogenéticas, lo que a su vez aumenta el grado de resolución del árbol (Figura 20). Probablemente, un mayor número de *loci*, revele, como en el caso de las poblaciones del grupo Corrientes, un grado mayor de monofilia recíproca entre las poblaciones de *C. pearsoni*.

4.3 Congruencias y discrepancias entre marcadores de distinto tipo de herencia

Toda vez que se observen discrepancias entre las filogenias obtenidas con marcadores de distinto tipo de herencia será posible postular la naturaleza del proceso histórico responsable de dicha falta de congruencia. Las poblaciones de tuco-tucos incluidas en esta tesis fueron analizadas en dos publicaciones recientes desde un perspectiva genético-poblacional: la primera incluye individuos pertenecientes a la mayor parte –pero no todas- las poblaciones incluidas en esta tesis (Mirol *et al* 2010) y se basa en el análisis de 16 *loci* microsatélite de individuos capturados entre los años 1993 y 2003, mientras que la más reciente (Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012) incorpora también individuos pertenecientes a las mismas capturas que esta tesis e incluye además estudios filogeográficos a partir de un fragmento de 411 pb de *D-loop* mitocondrial (coincidente con el obtenido en esta tesis).

Los agrupamientos generados a partir del estudio de los *loci* microsatélite fueron globalmente congruentes entre ambas fechas (1993-2003 y 2007-2010), y también guardan un cierto grado de congruencia con los clados que propone la filogenia de tres marcadores mitocondriales de esta tesis. Por ejemplo, en todos los análisis las poblaciones de Paraje Angostura y Mbarigüí, por un lado, y la de Paraje Sarandicito por el otro, quedan agrupadas en *clusters* diferentes. Las poblaciones típicamente asociadas a *C. roigi*, Costa Mansión y Arroyo Pehuajó, que sumadas a la recientemente muestreada Estancia San Luis, componen un *cluster* separado. Las poblaciones de Mburucuyá, Loma Alta, Manantiales y Pago Alegre pertenecen a un mismo *cluster*, todas pertenecientes al nodo C en la filogenia mitocondrial obtenida en esta tesis (Figura 20).

Aunque los agrupamientos no son exactamente los mismos, en el caso del grupo de poblaciones en la zona próxima a los Esteros del Iberá, no existen incongruencias entre los agrupamientos resultantes de microsatélites con la filogenia mitocondrial. La primera publicación basada en microsatélites agrupa las poblaciones de Paraje Caimán, San Miguel, Loreto y Curuzú Laurel por un lado, y Estancia La Tacuarita y Contreras Cué por otro (Mirol *et*

al 2010). En el trabajo más reciente quedan agrupadas Contreras Cué y Estancia La Tacuarita, por un lado, que también resultan hermanas en la filogenia (Figura 20) ,y variando según el método utilizado se podrían agrupar San Alonso, Loreto, Paraje Caimán y Curuzú Laurel (Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012). La inclusión de todas estas poblaciones en un mismo grupo sería congruente con los resultados de la filogenia basada en los tres marcadores mitocondriales, dado que la posición indefinida de Curuzú Laurel, que cae en la politomía basal a este grupo, no se opone a su pertenencia a este clado (nodo D, Figura 20). Más aún, a pesar de su bajo nivel resolutivo, en la filogenia obtenida con *D-loop* los haplotipos hallados en Curuzú Laurel quedaban agrupados con el hallado en la población de Loreto (Figura 17).

Entre los mamíferos, la discordancia entre los patrones de variabilidad de marcadores nucleares y mitocondriales es común en casos en los que la dispersión está sesgada hacia uno de los sexos (típicamente los machos son los dispersores). En macacos, por ejemplo, los machos abandonan su grupo natal previo a alcanzar la madurez sexual, mientras que las hembras permanecen allí toda su vida. Este patrón asimétrico en la dispersión afecta la variación de los genomas nuclear y mitocondrial (Melnick y Hoelzer 1992). La variación genética nuclear se distribuye uniformemente a través de las poblaciones de las especies de macacos. Contrariamente, la distribución de la diversidad a nivel del ADN mitocondrial se caracteriza por una alta homogeneidad local y una elevada diferenciación a nivel interpoblacional (Melnick y Hoelzer 1992). En cuanto a las poblaciones analizadas en esta tesis, la discordancia ente los datos de microsatélites y la filogenia mitocondrial se evidencia en dos casos. Las poblaciones de Goya, Chavarría, Santa Rosa y San Roque, integran un *cluster* por microsatélites, mientras que las poblaciones de Colonia 3 de Abril, Rincón de Ambrosio, Saladas centro y Saladas Sur resultaron agrupadas en otro *cluster* separado. Estos agrupamientos reúnen poblaciones que pertenecen a ramas de divergencia profunda en la filogenia (nodos C y F, Figura 20). Puede interpretarse este conflicto entre los agrupamientos basados en microsatélites y la filogenia mitocondrial como la huella de un cierto nivel de flujo génico entre las poblaciones de los nodos C y F. Exceptuando al de Santa Rosa, todos los cariomorfos involucrados poseen el mismo número fundamental 84, por lo que serían potencialmente compatibles. Para determinarlo habría analizar el tipo de reordenamientos que diferencian a estos cariomorfos, y evaluar si pudieran o no estar actuando como barreras al flujo génico. Nuevamente, en caso de existir una de barrera efectiva al flujo génico, la hipótesis alternativa es la de *sorting* incompleto de los haplotipos mitocondriales.

4.4 Los cariomorfos del grupo Corrientes en una red de transformaciones cromosómicas mínimas

A continuación se presentará una red de transformaciones cromosómicas mínimas que vincula los cariomorfos descriptos. Esta red no pretende establecer las relaciones históricas entre los cariomorfos, sino proponer el tipo de reordenamientos posibles y el sentido en que podrían haber ocurrido, para luego "mapearlos" en el contexto de la filogenia del grupo. El criterio que se siguió para construir la red es el de máxima parsimonia, donde se pretende minimizar la cantidad de transformaciones cromosómicas y frente a 2 o más posibilidades, proponiendo las más simples. Una fusión o una fisión robertsoniana tendrían *a priori* la misma probabilidad de ocurrir, por tratarse de dos reordenamientos de complejidad similar. En cambio, se considera más probable una fusión en tándem que el proceso inverso, que implica una ruptura cromosómica y la formación *de novo* de un centrómero funcional. Mediante la comparación de los cariogramas se halló una correspondencia entre varios pares cromosómicos en base al número, la morfología y el tamaño de los cromosomas y los brazos cromosómicos, los cuales, aplicando un criterio de máxima parsimonia, tendrían un origen común, es decir, serían homeólogos. Sin embargo, dado que los cariogramas fueron obtenidos por tinción uniforme, el establecimiento de homologías entre cromosomas y brazos debería ser corroborado aplicando técnicas de mayor resolución, como bandeo G o pintado cromosómico.

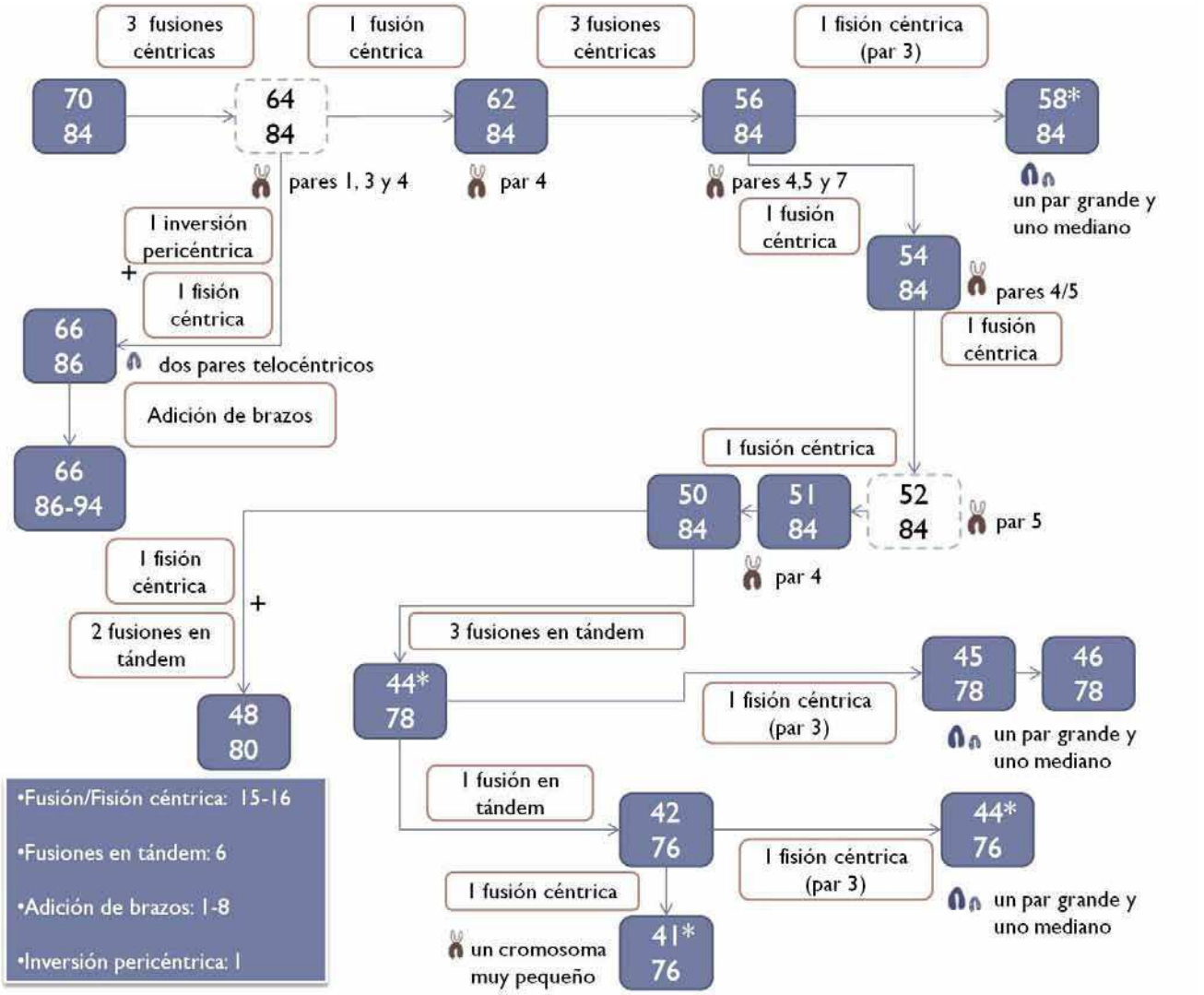


Figura 37. Red de transformaciones cromosómicas mínimas entre los cariomorfos del grupo Corrientes. Cada nodo representa un cariomorfo distinto en el que figuran los valores de 2n (arriba) y NF (abajo). En cada cariomorfo postulado como derivado se esquematizan los pares (distinguiendo según sean monobraquiados o bibraquiados) que habrían surgido como novedad evolutiva. Cuando se postulan fisiones se indica entre paréntesis el par bibraquiado candidato a sufrir la fisión. Los nodos con perímetro punteado representan cariomorfos hipotéticos, ancestrales o no hallados hasta el momento. Los nodos con * corresponden a cariomorfos no obtenidos en esta tesis, siendo el 2n=58 NF=84 descripto por Ortells, Contreras y Reig (1990) y los dos restantes descriptos por la Lic. Paola Jablonski (2011)[4]. El cuadro (abajo a la izquierda) recuenta los reordenamientos postulados.

[4] Los cariomorfos de las poblaciones de Estancia La Tacuarita, Contreras Cué, Loreto, San Miguel y San Alonso fueron analizados por la Lic. Paola Jablonski en su tesis de licenciatura (Jablonski

En consonancia con lo propuesto por Ortells, Contreras y Reig (1990) el cariomorfo 2n=70 y NF=84 sería ancestral en el grupo Corrientes, a partir del cual habrían derivado cariomorfos de número diploide decreciente, principalmente originados por fusiones céntricas. Este cariomorfo posee un par acrocéntrico grande y 5 pares bibraquiados pequeños (Figura 27 y Figura 28). Mediante tres fusiones céntricas se habría originado un cariomorfo de 2n=64, en el que surgen como novedad evolutiva los pares bibraquiados grandes 1 y 3, y el par submetracéntrico mediano que porta la constricción secundaria. Estos tres pares son comunes a los cariomorfos de Santa Rosa y San Roque. El cariomorfo hallado en Santa Rosa derivaría de este cariomorfo hipotético pero tendría un par telocéntrico adicional posiblemente originado por la inversión pericéntrica de un par telocéntrico, dando un intermediario con un par bibraquiado extra, y una fisión céntrica de este par bibraquiado. Sin embargo, no es posible descartar la opción de una ruptura cromosómica y formación de un centrómero *de novo*, aunque sea considerado un reordenamiento poco probable (ver ítem 4.4.1, en Discusión).

Adicionalmente el cariomorfo hallado en Santa Rosa habría sufrido variaciones en el NF debido a la adición de brazos cortos (Figura 29). Las adiciones/deleciones de brazos enteros heterocromáticos han sido descriptas en estado polimórfico, politípico y entre especies en numerosos géneros de roedores, tales como *Otomys* (Engelbrecht *et al* 2011), *Thomomys* (Patton y Sherwood 1982), y los géneros africanos *Arvicanthis*, *Acomys* y *Mastomys* (Volobouev *et al* 2002). El caso más extraordinario se da en *Peromyscus*, género en el que todas las especies poseen 2n=48, mientras que el NF varía entre 52 y 92, debido a la adición de brazos heterocromáticos e inversiones pericéntricas (Romanenko y Volobouev 2012).

Si en el cariomorfo hipotético 2n=64 y NF=84 se hubiese producido una fusión céntrica se originaría un cariomorfo de 2n=62 como el hallado en San Roque, en el cual el par bibraquiado novedoso sería el cuarto en tamaño (Figura 30). Este cariomorfo difiere en tres fusiones céntricas del 2n=56 hallado en la población de Chavarría (Figura 31). Los pares bibraquiados submetacéntricos 4 y 5 y el acrocéntrico 7 serían los posibles resultantes de esas fusiones.

2011). Los datos de dicha tesis que se presentan en este trabajo con el acuerdo explícito de la Lic. Paola Jablonski (autora), el Dr. Pablo Rebagliati (director) y mío (director asistente).

A partir del cariomorfo 2n=56 NF=84 se abren dos vías posibles. Una daría origen, mediante una fisión céntrica del tercer par, a un cariomorfo de 2n=58 como aquél hallado por Ortells, Contreras y Reig (1990) en la población de Mburucuyá (Figura 38). Si bien una red en la que el cariomorfo 2n=58 precediera al 2n=56 implicaría menos pasos, el análisis detallado de los pares cromosómicos que difieren entre estos cariomorfos y los de 2n menores permiten volcarse hacia una hipótesis de fisión céntrica. El tercer par bibraquiado, presente en todos los cariomorfos de 2n<70 y NF=84 (Figuras 30 a 34), está ausente en el cariomorfo 2n=58 (Figura 38), ya que habría sufrido la fisión céntrica postulada. Entonces en cualquiera de los nodos posibles en que se ubicara este cariomorfo, habría que postular una fisión céntrica, y un concomitante aumento del 2n, resultando menos costoso insertarlo como derivado del 2n=56, y originado por un único reordenamiento. En la otra vía, mediante una fusión céntrica en el cariomorfo 2n=56 se originaría un cariomorfo de 2n=54 como el hallado en la población de Saladas centro (Figura 32), donde el par novedoso sería el cuarto o el quinto (ambos son submetacéntricos de tamaño y morfología indistinguible por tinción uniforme).

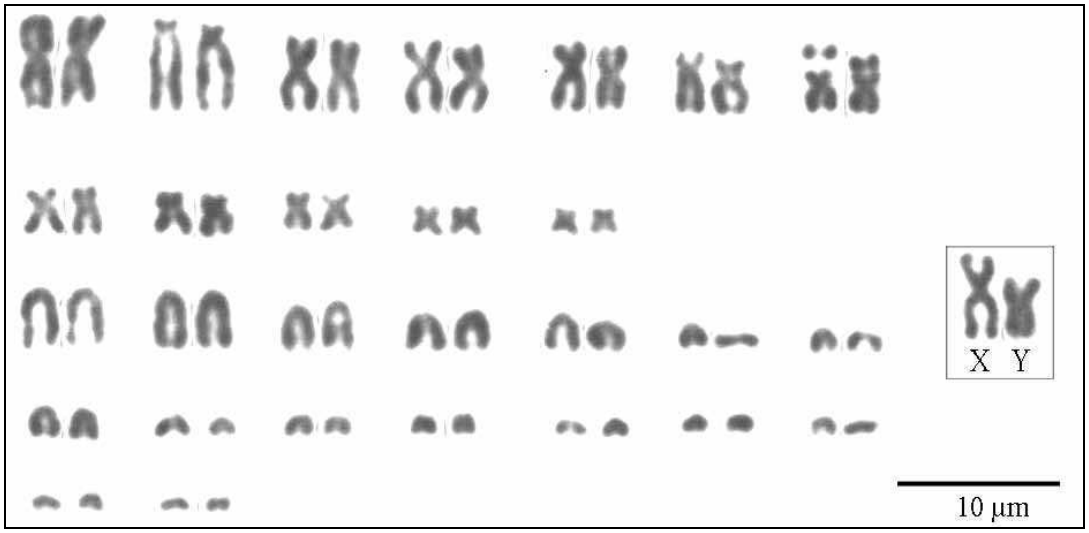


Figura 38. Cariomorfo 2n=58 NF=84 de un macho de la población de Mburucuyá, obtenido por Ortells, Contreras y Reig (1990). Los grupos del complemento autosómico se dividen en bibraquiados (arriba) y monobraquiados (abajo). El par sexual se muestra a la derecha. Se incluye una barra correspondiente a 10 µm. Los cromosomas fueron ordenados de forma análoga al resto de los cariomorfos presentados en esta tesis para facilitar la comparación.

El cariomorfo 2n=54 NF=84 sufriría una fusión céntrica que resulta en un cariomorfo hipotético de 2n=52. No hemos hallado este cariomorfo, pero Ortells, Contreras y Reig (1990)

remiten a un cariomorfo de 53 cromosomas hallado en Yataití-Calle que salvo por una fusión en heterocigosis resulta indistinguible del de Saladas centro, que representaría el cariomorfo intermedio entre el de 54 y 52 cromosomas, en el que se habría originado el quinto par bibraquiado. En esta tesis se encontró un cariomorfo que coincidiría con el hipotético de 52 cromosomas, pero es portador de una fusión adicional en heterocigosis. El 2n=51 hallado en la población de Saladas sur tendría como novedad evolutiva un cromosoma bibraquiado que se ubica en el cuarto par (Figura 33). Cuando la fusión se encuentra en homocigosis se origina un cariomorfo de 2n=50 y NF=84 como el hallado en Goya (Figura 34).

A partir del cariomorfo de 2n=50 y NF=84 se abren dos vías en la red que resultan en cariomorfos de NF diferente, y probablemente constituyan linajes evolutivos independientes. Aunque, como se mencionó, son necesarias técnicas de bandeo para establecer con certeza el tipo de reordenamiento, es muy sugestiva la correspondencia entre los pares bibraquiados del cariomorfo 2n=50 NF=84 hallado en Goya y el cariomorfo 2n=44 y NF=78 hallado en San Alonso. La diferencia se produciría por la fusión en tándem de tres pares telocéntricos pequeños con cromosomas bibraquiados mayores (Figura 34 y Figura 25). Este resulta el reordenamiento más verosímil para explicar la ausencia de 3 pares telocéntricos en el cariomorfo 2n=44 y NF=78, pero al tratarse de cariogramas de cromosomas teñidos uniformemente es imposible identificar los cromosomas blanco de las fusiones en tándem. Si bien son raras, se han descripto fusiones en tándem en varios órdenes de mamíferos, entre ellos, Cetartiodactyla (Chi *et al* 2005; Rubes *et al* 2008; Ropiquet *et al* 2010; Cernohorska *et al* 2011), Carnivora (Nash *et al* 2001), Chiroptera (Owen y Baker 2001) y Rodentia (Dobigny *et al* 2005; Swier *et al* 2009; Ventura *et al* 2009; Kovalskaya *et al* 2011). Como se mencionó (ver ítem 1.5.4, en Introducción), también este reordenamiento ha sido descripto en *Ctenomys* (De Freitas 1997; Massarini *et al* 2002). A partir del cariomorfo 2n=44 NF=78 , mediante la fisión del tercer par bibraquiado se originarían los cariomorfos 2n=45 y 46 como los hallados en la población de Paraje Caimán (Figura 23 y Figura 24). También a partir del cariomorfo 2n=44 NF=78, pero mediado por una fusión en tándem de un par telocéntrico pequeño, se originaría un cariomorfo de 42 cromosomas y 76 brazos, como el hallado en las poblaciones de Curuzú Laurel, Estancia La Tacuarita, Contreras Cué y Loreto. Este cariomorfo, a su vez, se diferenciaría del 2n=44 NF=76 hallado en San Miguel por una fisión céntrica del tercer par, lo que indicaría que este reordenamiento podría haber ocurrido al menos 2 veces en los cariomorfos relacionados con el de San Alonso.

Volviendo al cariomorfo 2n=50 NF=84, mediante una fisión céntrica del par 11, se originaría un cariomorfo de 52 cromosomas y 84 brazos. A su vez, si dos cromosomas telocéntricos sufriirieran una fusión en tándem reduciéndose por igual los números diploide y fundamental, se originaría el cariomorfo 2n=48 NF=80, hallado en la población de Estancia San Luis. Sin embargo, la morfología de los cromosomas de este cariomorfo presenta algunas diferencias que dificultan su correspondencia par a par con el cariomorfo 2n=50 NF=84. El caracter divergente de este cariomoromfo sugeriría nuevamente, que se trata de un linaje de evolución independente que ha acumulado un mayor número de modificaciones cromosómicas, probablemente debido al surgimiento de barreras reproductivas.

Analizando globalmente la red de transformaciones cromosómicas mínimas postulada, los reordenamientos cromosómicos más frecuentes resultaron ser las fusiones/fisiones céntricas - 16 en total-, responsables de la mayor parte de la variación en el 2n, seguidas por las fusiones en tándem, unas 6 totales, que serían las responsables mayoritarias del cambio en el NF.

4.4.1 La formación de centrómeros de novo: un fenómeno frecuente que podría ser la causa de cambios en número fundamental en el grupo Corrientes

En la red de transformaciones cromosómicas propuesta se consideró más probable, por un lado, una inversión pericéntrica y una fisión frente a una ruptura cromosómica seguida de la formación de un centrómero *de novo*, y por el otro, varias fusiones en tándem frente a un proceso en sentido inverso que implicaría nuevamente ruptura cromosómica y el rescate de un fragmento acéntrico mediante la activación de un centrómero *de novo*. Sin embargo, es conveniente discutir si la baja probabilidad del surgimiento de nuevos centrómeros se debe a que realmente estos reordenamientos ocurren con una baja frecuencia o si, en cambio, se los subestima por ser fenómenos poco estudiados (y aún poco comprendidos), tanto los procesos involucrados en su evolución como su interpretación en el contexto evolutivo de los linajes.

La frecuencia de aparición de CEN (ver ítem 1.5.1.1, en Introducción) es relativamente alta en mamíferos y podría considerarse un fenómeno equiparable a los reordenamientos más comúnmente postulados, como las inversiones, fusiones, fisiones y translocaciones. En *Macaca mulatta* 9 de un total de 20 centrómeros autosómicos mostraron ser novedades evolutivas, surgidas en un período de aproximadamente 14 MA (Ventura *et al* 2007). En humanos, seis centrómeros son evolutivamente novedosos, tres por reposicionamiento, y tres surgidos a partir de una fisión no céntrica (Rocchi *et al* 2011). En équidos, la ocurrencia de CEN

ha sido notable. La cebra y el burro divergieron hace 0,9 MA, mientras que su ancestro común divergió del caballo alrededor de 2MA. Ocho eventos de reposicionamiento centromérico ocurrieron en la evolución de este género. Sorprendentemente, al menos cinco casos ocurrieron en el burro luego de su divergencia de la cebra (Rocchi *et al* 2011 y referencias allí citadas). El cromosoma 9 de orangutanes presenta un polimorfismo que ha sido interpretado como una translocación intracromosómica de un segmento conteniendo al centrómero, o una inversión paracéntrica, pero más tarde se comprobó que este polimorfismo se debe a un CEN, surgido entre 15 y 1 MA (Locke *et al* 2011; Kalitsis y Choo 2012).

A medida que se conoce más sobre los procesos de formación de centrómeros *de novo* y de la alta frecuencia con la que ocurrirían estos reordenamientos a lo largo de los linajes, aumenta nuestra idea de plasticidad genómica. Paradójicamente, el centrómero evoluciona rápidamente en los niveles nucleotídico y proteico, a pesar de que su rol es esencial en la correcta herencia del ADN en eucariotas. Los factores genéticos y el epigenéticos pueden alternar entre causas y efectos de la formación de centrómeros *de novo*. Una estructura de evolución rápida y gran plasticidad podría estar jugando un rol no menor en la evolución cromosómica en el grupo Corrientes e incluso en otros linajes de *Ctenomys*, donde se observan cambios en NF y en la morfología de los cromosomas. Para tener un panorama de la evolución centromérica en este grupo sería necesario realizar mapeos por pintado cromosómico, y poder determinar el número y el orden de los bloques sinténicos, y así poder ponderar hipótesis de reposicionamiento centromérico.

4.5 Un marco filogenético para la evolución cromosómica

La red de transformaciones mínimas permite postular el tipo y sentido en que habrían ocurrido los reordenamientos cromosómicos posibles, planteando el camino más corto que relacione a los cariomorfos hallados en el grupo Corrientes. En este apartado se volverá sobre las transformaciones cromosómicas propuestas, pero “mapeándolas” en la filogenia mitocondrial obtenida en esta tesis.

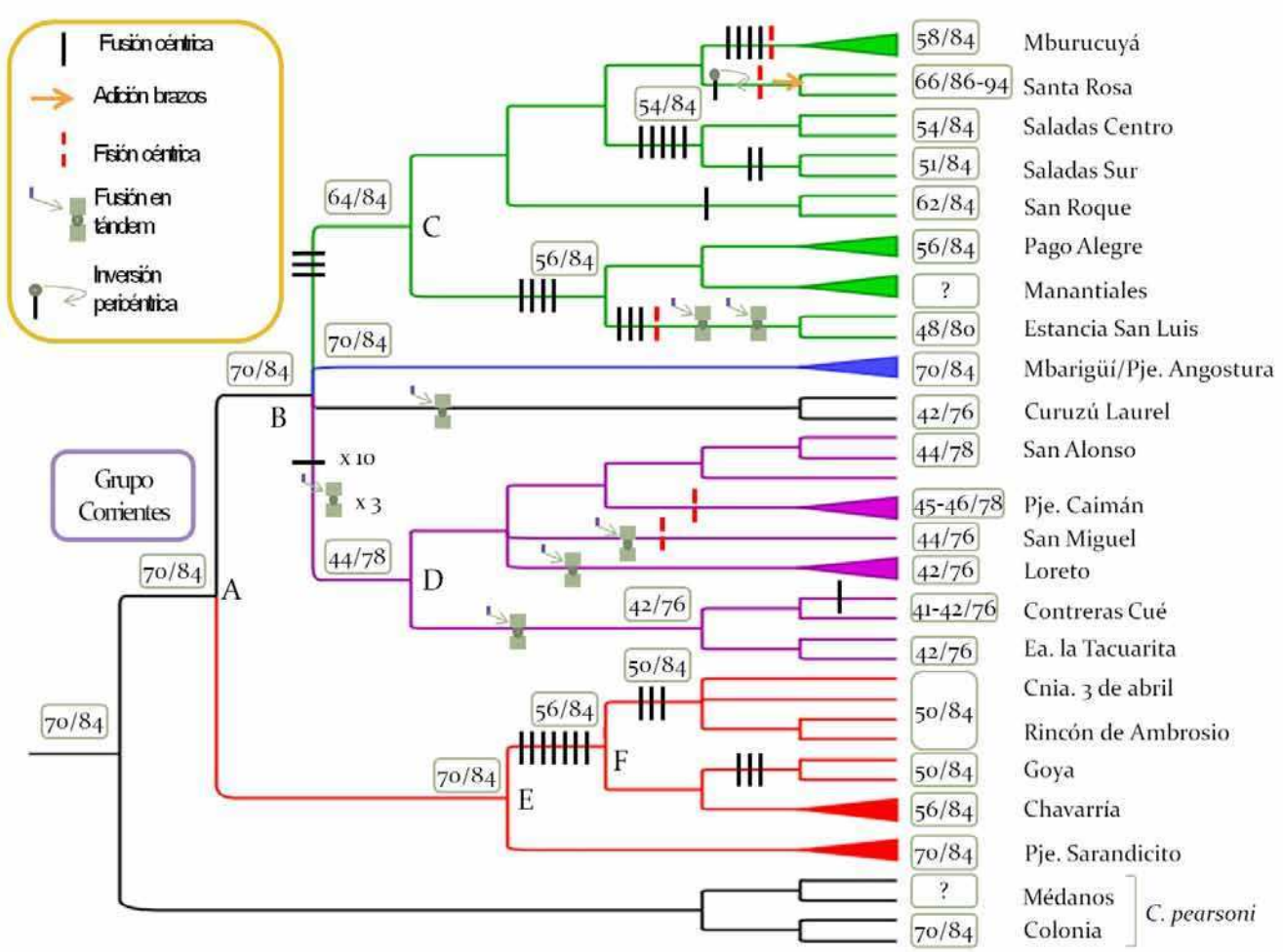


Figura 39. Árbol filogenético obtenido con secuencias parciales de *D-loop*, cyt-b y COI. A los nodos internos se les asignó el cariomorfo que supusiera el menor número de cambios en las ramas posteriores y las transformaciones cromosómicas fueron "mapeadas" en las ramas internas o en los terminales indicando tipo y número. Los nodos terminales muestran el 2n/NF de los cariomorfos hallados en las distintas poblaciones del grupo Corrientes.

Inicialmente se asignaron los valores de 2n y NF a los terminales de los ejemplares incluidos en la filogenia. Se prosiguió fijando un cariomorfo 2n=70 NF=84 en el nodo común a *C. pearsoni* + grupo Corrientes. La hipótesis de un cariomorfo 2n=70 NF=84 ancestral a ambos grupos se apoya en el hecho de que este cariomorfo ocurre en ambos linajes, y son indistinguibles por técnicas de bandeo (García *et al* 2000b). El cariomorfo 2n=70 NF=84 resulta parafilético y basal en ambos grupos, Corrientes y *C. pearsoni* (Tomasco y Lessa 2007 y esta tesis). A partir de este cariomorfo el número diploide habría sufrido mayoritariamente reducciones mediante fusiones céntricas, y reducciones en el NF y del 2n simultáneamente mediadas por fusiones en tándem.

En el grupo que diverge del nodo C habrían ocurrido principalmente fusiones céntricas (Figura 39). Sin embargo, acorde con lo propuesto en la sección anterior (ver ítem 4.4, en Discusión), en el linaje que conduce al cariomorfo de Santa Rosa habría ocurrido una inversión pericéntrica seguida de una fisión céntrica originando el cariomorfo 2n=66 NF=86, así como el agregado de brazos cromosómicos generando un NF>86. Además de fusiones céntricas, en el linaje que conduce al cariomorfo de 48 cromosomas y 80 brazos hallado en Estancia San Luis, un par cromosómico habría sufrido una fisión céntrica y los productos de esta fisión habrían intervenido en fusiones en tándem con cromosomas bibraquiados de mayor tamaño.

En el grupo de poblaciones situadas en las proximidades de los Esteros del Iberá (Figura 39, nodo D) habrían ocurrido principalmente fusiones en tándem, lo que explica la variación del NF en el grupo. Adicionalmente, habrían ocurrido fisiones céntricas, ambas involucrando al tercer par bibraquiado (Figura 37), por lo que este sería un reordenamiento recurrente. Estos reordenamientos habrían ocurrido si se supone un cariomorfo ancestral de 2n=44 NF=78 en este grupo. Sería más probable que el NF haya disminuido vía fusiones en tándem, pues si se propusiera como ancestral un cariomorfo de NF=76 debería postularse al menos un evento de ruptura y formación de centrómeros *de novo* para explicar el origen de los cariomorfos de NF=78 (pero ver ítem 4.4.1, en Discusión, donde se trata la frecuencia de la formación de neocentrómeros y CEN). La resolución más parsimoniosa de la posición ambigua de los haplotipos de San Miguel en la filogenia (Figura 20) sería que San Miguel y Loreto formaran un grupo recíprocamente monofilético con respecto a San Alonso y Paraje Caimán. Si esta fuera la relación entre las cuatro poblaciones, entonces la fusión en tándem postulada en las ramas de San Miguel y Loreto sería la misma, y el cariomorfo ancestral sería el de 2n=42 NF=76, mientras que el de San Miguel sería derivado, mediante una fisión céntrica.

El cariomorfo hallado en Curuzú Laurel resultó indistinguible de los restantes cariomorfos de 2n=42 NF=76 , y esta población resultó relacionada a otras dentro del nodo D, tanto en análisis basados en microsatélites como en *D-loop* (Mirol *et al* 2010; Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012)(Figura 17), por lo que es probable que Curuzú Laurel pertenezca a este grupo. Una razón posible de su posición incierta en la filogenia podría ser que no exista en el conjunto de datos un número suficiente de caracteres informativos para resolver su relación con los linajes derivados del nodo D. Asumiendo que el linaje de Curuzú Laurel también pertenece a este grupo, el cariomorfo de 42 cromosomas y 76 brazos se habría

originado al menos en tres ramas independientes mediante una fusión en tándem, a partir del 2n=44 NF=78.

En el grupo de divergencia más basal en el árbol (nodo E, Figura 39) habrían ocurrido exclusivamente fusiones céntricas. El NF se mantiene constante a lo largo de los linajes de este grupo, mientras que el 2n sufrió únicamente reducciones.

Como ya se argumentó, el cariomorfo 2n=70 NF=84 es candidato representar el estado del ancestro común al grupo Corrientes, basado en su condición polifilética y basal en los clados que divergen del nodo más profundo en la filogenia del grupo (nodo A, Figura 20), y la separación en dos *clusters* de los núcleos norte y sur de poblaciones de este cariomorfo. Además, la distancia geográfica, mayor a 338 km, entre estos grupos de poblaciones permite descartar una hipótesis de flujo génico que explique la conservación de la homogeneidad cromosómica entre ellas.

En relación a la variabilidad cromosómica y los límites de grupos se encontraron tres patrones principales:

1. un conjunto de cariomorfos muy relacionados hallados exclusivamente en un grupo monofilético, en contraste con los cariomorfos específicos de especie hallados en el resto de *Ctenomys*. El ejemplo de este patrón son las poblaciones próximas a los Esteros del Iberá.

2. un cariomorfo muy diferenciado exclusivo de un linaje. Este es el caso de Estancia San Luis.

3. La presencia del mismo cariomorfo compartido por linajes polifiléticos. Este es el caso de los linajes de las poblaciones de Paraje Angostura y Mbarigüí, por un lado, y Paraje Sarandicito por el otro.

Exceptuando al linaje de Estancia San Luis, los cariomorfos hallados en los demás miembros del clado C y los del clado F (Figura 39) tendrían cariomorfos posiblemente relacionados, ya sea por hibridación o por paralelismos, y no se encuadran en ninguno de los patrones antes mencionados.

Un total de 57 fusiones céntricas habrían ocurrido en el linaje de Corrientes, 12 fusiones en tándem, 5 fisiones céntricas, 1 inversión pericéntrica y 1 evento de adición de brazos que habría ocurrido varias veces pero quedaría restringido a un único linaje. Este

número de reordenamientos es mayor al postulado en la red de transformaciones mínimas (ver ítem 4.4, en Discusión) lo que indicaría que muchos reordenamientos habrían ocurrido en forma paralela en ramas diferentes. Por ejemplo, los cariomorfos 2n=51 NF=84 y 2n=50 NF=84 hallados en Saladas Sur y Goya, respectivamente, en la red estarían separados por un paso mutacional, o ninguno, si se considera que en la población donde se halló al heterocigota es posible encontrar un homocigota para la fusión (Figura 37). Sin embargo los haplotipos mitocondriales de estos individuos pertenecen a grupos de divergencia muy profunda en la filogenia (Figura 39). Este hecho obliga a postular, tomando como referencia al cariomorfo ancestral hipotético de 70 cromosomas, la ocurrencia de 10 fusiones céntricas paralelamente en ambos linajes. Un cariomorfo hipotético de 50 cromosomas también sería ancestral al de Estancia San Luis, y al de las poblaciones próximas a los Esteros del Iberá, por lo que las 10 fusiones que originarían al 2n=50 NF=84 en total quedarían cuadruplicadas, o, dicho de otro modo, el 2n 50 se habría originado cuatro veces en la historia de este grupo. La condición parafilética del cariomorfo 2n=42 NF=76, y la hipótesis de un cariomorfo ancestral de 2n=44 y NF=78 (ver más arriba), también sugieren la ocurrencia de paralelismos, en este caso de una fusión en tándem. Pero independientemente de si se trata o no de paralelismos, dos reordenamientos con productos inversos, las fusiones y fisiones céntricas no habrían ocurrido en igual frecuencia, siendo claramente las fusiones el reordenamiento más común. Esta disparidad ha sido hallada en Cetartiodactyla, Perissodactyla, Chiroptera y Rodentia entre otros linajes de mamíferos, mediante análisis cladísticos polarizados (Gauthier, Hima y Dobigny 2010 y referencias allí citadas).

El patrón de variabilidad cromosómica y mitocondrial es contrastante entre el grupo Corrientes y su linaje hermano, *Ctenomys pearsoni*. Mientras que en ambos grupos la mayor parte de las poblaciones posee cariomorfos únicos, en *C. pearsoni* los cariomorfos no resultan recíprocamente monofiléticos (Tomasco y Lessa 2007). Este patrón es llamativo, dado que los reordenamientos cromosómicos son marcadores diploides nucleares, y en caso de tener heterosis neutra o negativa, tendrían un tiempo de fijación por deriva 4 o más veces mayor que los mitocondriales, por lo que si los cariomorfos están fijados, es esperable que las poblaciones sean recíprocamente monofiléticas. Esto llevó a los autores del trabajo a invocar procesos como la conducción meiótica, por los que se favorecería la fijación de ciertas variantes cromosómicas. En el grupo Corrientes, en cambio, la mayor parte de las poblaciones resultó monofilética, aunque no así todos los cariomorfos. Si en el grupo Corrientes la filogenia mitocondrial reflejara la filogenia de organismos, entonces muchos de los reordenamientos

cromosómicos postulados en este grupo, principalmente fusiones céntricas y fusiones en tándem, habrían ocurrido paralelamente en la evolución de estos linajes. Este escenario sería compatible con aquél propuesto por Ortells, Contreras y Reig (1990), en el que a partir de una distribución ancestral del cariomorfo 2n=70 NF=84 se habrían fijado cariomorfos de 2n menor principalmente mediante reordenamientos robertsonianos de forma estocástica en los distintos demos. En el mismo sentido, la ubicuidad del cariomorfo 2n=50 NF=84, que habría ocurrido en los tres linajes principales de la filogenia mitocondrial del grupo Corrientes, permite suponer que este cariomorfo habría reemplazado al 2n=70 NF=84 en una buena parte de su distribución, y luego habría ocurrido una estructuración local por lo que cada linaje habría tenido una evolución independiente. No obstante, es posible también que en las poblaciones se hubieran fijado haplotipos mitocondriales aleatoriamente y que su relación no refleje –por lo menos totalmente- la cladogénesis en estos linajes, y que como consecuencia de este *sorting* diferencial queden agrupados cariomorfos que no estuvieran relacionados históricamente.

En la siguiente sección se integrarán los agrupamientos sugeridos por la filogenia mitocondrial, los análisis con microsatélites (Mirol *et al* 2010; Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol 2012) y los grupos de afinidad cromosómica según su cercanía en la red de transformaciones mínimas de los tuco-tucos del grupo Corrientes y se ponderarán, en este contexto, las hipótesis de *sorting* e hibridación.

4.6 Nuevamente, ¿sorting o hibridación? ¿De cariomorfos, de haplotipos mitocondriales, o de ambos?

Como se discutiera más arriba, la señal filogenética de un marcador puede ser borrada tanto por procesos de hibridación/introgresión como por *sorting* diferencial. Pero ¿cómo distinguir entre la ocurrencia de *sorting* diferencial o hibridación/introgresión si ambos fenómenos pueden generar incongruencias entre marcadores de distinto tipo de herencia? Para este fin, además de una filogenia de marcadores nucleares y/o del cromosoma Y, deben ser consideradas las características biológicas del grupo de organismos en cuestión.

La vagilidad de los organismos es un factor fundamental a considerar en establecimiento de hipótesis de flujo génico. En *Ctenomys*, en las especies en las que las hembras son marcadamente filopátricas (ver ítem 1.1.4, en Introducción, pero ver también

trabajo de Mora, Kittlein y Mapelli 2012), se puede considerar muy poco probable el flujo génico entre haplogrupos mitocondriales. Entonces, con una mayor probabilidad, el *sorting* incompleto y/o diferencial sería el fenómeno que podría afectar la señal filogenética de marcadores mitocondriales. Existen muchos ejemplos en la literatura en los que las relaciones filogenéticas entre los taxones han sido borradas por *sorting* diferencial, entre ellos en el ratón doméstico (Geraldes *et al* 2008), en lagartijas (Pinho, Harris y Ferrand 2008), y en *Thomomys* (Pinho, Harris y Ferrand 2008; Belfiore, Liu y Moritz 2008) el equivalente ecológico de los tuco-tucos en América del Norte. Tosi, Morales y Melnick (2003) arguyen que la consecuencia de la filopatría en hembras es la monofilia recíproca de las poblaciones, independientemente de si las especies resultan o no monofiléticas, y advierten, en línea con lo discutido más arriba (ver ítem 4.5, en Discusión) que este estado puede alcanzarse luego de la fijación aleatoria de variantes en las poblaciones, por lo que la filogenia mitocondrial podría mostrar monofilia poblacional recíproca y aún así no tener señal filogenética alguna a nivel de especies.

La compatibilidad cromosómica es un factor que puede limitar el flujo génico entre poblaciones. Los reordenamientos robertsonianos podrían actuar como una barrera reproductiva a partir de un cierto umbral. Baker y Bickham (1986) propusieron un modelo según el cual dos poblaciones descendientes de un mismo cariomorfo sufrirían una fusión robertsoniana entre un par cromosómico en común y un par diferente de manera independiente (Figura 40). Cada una de las poblaciones podría retrocruzarse con el cariomorfo ancestral: el híbrido formaría trivalentes en la meiosis, que podrían segregar correctamente en la mayor parte de los casos. Sin embargo, al cruzarse ambos cariomorfos reordenados el híbrido producirá cuadrivalentes, que tendrán una menor probabilidad de segregar correctamente. Si ocurrieran muchas fusiones independientes en dos cariomorfos emparentados, los híbridos formarán cuadrivalentes o multivalentes más complejos que tendrán bajas chances de segregar correctamente, y por lo tanto la fertilidad del híbrido se vería severamente reducida.

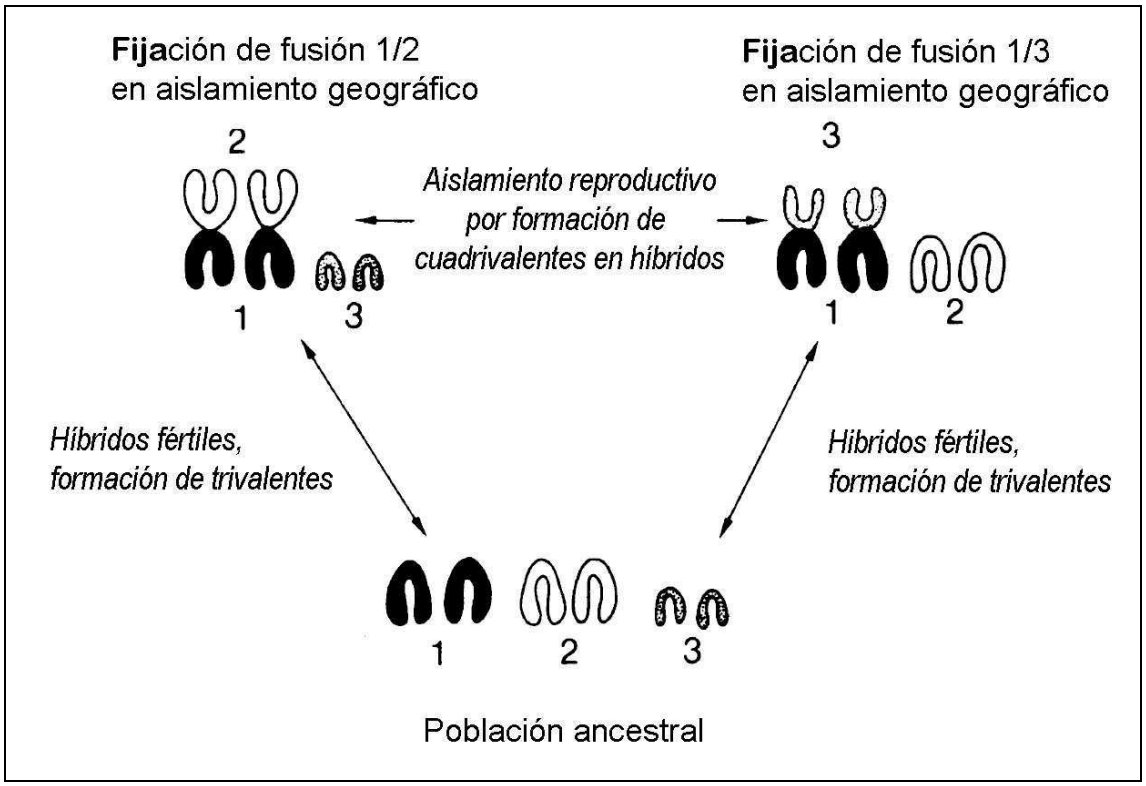


Figura 40. Fusiones céntricas como fuente de aislamiento reproductivo. El modelo requiere la fijación de fusiones que involucren en cada caso un cromosoma diferente, en poblaciones aisladas geográficamente (cromosomas 1, 2 y 3 en combinaciones diferentes). Tomado de Baker y Bickham (1986).

Otra causa de la disminución en la fertilidad de los heterocigotas para fusiones robertsonianas serían las fallas sinápticas debidas a las asociaciones entre segmentos autosómicos no sinaptados con las regiones asinápticas de los cromosomas sexuales (King 1995). En un estudio del comportamiento meiótico en machos de 12 poblaciones del grupo Corrientes, Lanzone y colaboradores (2007) hallaron que en la meiosis de heterocigotas para hasta dos fusiones céntricas se producía un correcto apareamiento y sinapsis de los brazos cromosómicos implicados en las fusiones, mientras que la sinapsis de los cromosomas sexuales sería completa. Consecuentemente, la segregación no se vería alterada en estos heterocigotas. Los autores del trabajo no hallaron heterocigotas para más de dos fusiones céntricas, mientras que en esta tesis y en el trabajo de Ortells, Contreras y Reig (1990) no se hallaron más que heterocigotas para un sola fusión. Estos hallazgos tomados en conjunto no entran en contradicción con el modelo de Baker y Bickham (1986), pero establecen que cariomorfos que difieran en dos, pero no más, fusiones céntricas serían interfértiles.

Las fusiones en tándem tendrían efectos heteróticos negativos. En la meiosis del híbrido natural entre dos especies de saltamontes del género *Trimerotropis* que difieren en una fusión en tándem entre dos cromosomas telocéntricos, John y Weissman (1977) encontraron que regularmente uno de los telocéntricos provenientes del progenitor no fusionado fallaba en el apareamiento con el cromosoma reordenado y quedaba rezagado en la meiosis, impidiendo la citocinesis, y produciendo mayoritariamente gametas inviables. En mamíferos se comprobó la esterilidad de los heterocigotas para fusiones en tándem en experimentos de cruzamientos controlados en múridos africanos del género *Otomys* (Pillay, Willan y Meester 1992; Pillay, Willan y Meester 1995; Taylor 2000), así como en la especie de antílopes *Madoqua kirkii* (Ryder *et al* 1989; Cernohorska *et al* 2011). Las 5 especies y 2 formas descriptas del género de roedores *Taterillus* del oeste de África difieren al menos por una, y hasta ocho, fusiones en tándem (además de fusiones robertsonianas). Todos los cruzamientos híbridos realizados originan individuos estériles, indicando que estos linajes son independientes debido a las configuraciones meióticas complejas que se producirían en los híbridos (Dobigny *et al* 2005). Con excepción de dos casos, el del murciélago *Uroderma bilobatum* (aunque el reordenamiento propuesto no se ha corroborado por técnicas de bandeo), y del ratón del abedul *Sicista* (Kovalskaya *et al* 2011) en todos los linajes de mamíferos descriptos, las fusiones en tándem se hallaron fijadas (Dobigny *et al* 2005). Tomadas en conjunto estas observaciones sugieren que las fusiones en tándem (1) son fuertemente deletéreas para un portador heterocigota, y que (2) cuando ocurren y alcanzan la homocigosis probablemente promuevan el aislamiento reproductivo de forma casi instantánea del citotipo naciente. Si esto de hecho ocurre, la presencia de homocigotas para fusiones puede llevar a una extinción instantánea o al establecimiento de un linaje evolutivo independiente, en un modo "todo o nada" (Dobigny *et al* 2005). En *Ctenomys* no se han ensayado cruzamientos entre cariomorfos que difieran en fusiones en tándem. Los cruzamientos entre cariomorfos que difieran en fusiones de este tipo o en fusiones céntricas representarían una línea experimental fértil para corroborar si estos reordenamientos efectivamente conducen al aislamiento reproductivo en el grupo Corrientes.

En los modelos clásicos de aislamiento reproductivo (y de especiación cromosómica), las inversiones pericéntricas han sido históricamente postuladas como un reordenamiento capaz de actuar como barrera al flujo génico dado que los heterocariomofos serían parcialmente infértiles. Teóricamente, la mitad de las gametas recombinantes para la zona del reordenamiento (tales que en la meiosis haya ocurrido un quiasma dentro de la región

invertida) serían desbalanceadas, y sólo serían viables las gametas no recombinantes (Faria y Navarro 2010). El problema que debía sortear esta clase de modelos fue la llamada paradoja de la subdominancia (Rieseberg 2001): resulta muy poco probable que los reordenamientos fuertemente subdominantes, necesarios para constituirse como barrera al flujo génico reduciendo la aptitud de los híbridos, se fijen en una población por deriva, excepto en casos en los que el tamaño poblacional fuera extremadamente bajo (n<50). Más recientemente, se ha propuesto una profusa variedad de nuevos modelos que ponen el énfasis ya no en la esterilidad parcial o total del híbrido, sino en la supresión de la recombinación que estos reordenamientos producen. Los genes localizados en las regiones invertidas evolucionarán en bloque en cariomorfos reordenados, mientras que los genes en regiones co-lineales recombinarían libremente (Faria y Navarro 2010; Jackson 2011). Esto conduciría a la fijación de alelos adaptativos de manera independiente en las regiones no recombinantes, lo que podría producir incompatibilidades alélicas en el híbrido. Estas incompatibilidades se podrían manifestar en fases del desarrollo del híbrido distintas de la meiosis, reduciendo el *fitness* del portador. No obstante, estos modelos no rechazan la reducción en la fertilidad del híbrido ocasionada por fallas meióticas, más bien funcionan como una explicación auxiliar en casos en los que las fallas meióticas no fueran una explicación suficiente. Ya sea actuando cualquiera de los procesos, existe un amplio acuerdo en que las inversiones pericéntricas representan una potencial barrera al flujo génico.

La variación en NF por adición de brazos heterocromáticos no constituiría un factor de aislamiento reproductivo (Engelbrecht *et al* 2011; Romanenko y Volobouev 2012). Aunque no fuera postulada en la red de transformaciones cromosómicas propuestas, el reposicionamiento centromérico no constituiría una barrera al flujo génico, siempre que exista solo un centrómero funcional por cromosoma. Respecto de este tipo de reordenamiento se han descripto polimorfismos en poblaciones, y portadores heterocigotas sin reducción de fertilidad en humanos, orangutanes y monos ardilla, entre otros mamíferos (Rocchi *et al* 2011). Sin embargo, en el grupo Corrientes, la hipótesis alternativa a las fusiones en tándem no serían reposicionamientos centroméricos, sino fisiones no céntricas seguidas de formación de nuevos centrómeros. Y en ese caso, la meiosis del híbrido entre cariomorfos que difieran en este reordenamiento se vería afectada de la misma forma (ver más arriba), independientemente de si el reordenamiento ocurrió en el sentido fusión en tándem, o en el sentido fisión no céntrica + formación de centrómero *de novo*.

La mayor incongruencia entre los agrupamientos que propone la filogenia basada en marcadores mitocondriales y los *clusters* generados en base a microsatélites nucleares yace en los *clusters* que agrupan las poblaciones de Colonia 3 de Abril, Rincón de Ambrosio, Saladas centro y Saladas Sur por un lado, y las poblaciones de Goya, Chavarría, Santa Rosa y San Roque, por otro (ver ítem 4.3, en Discusión). La ocurrencia de flujo génico entre estas poblaciones podría ser postulada como hipótesis nula, y en caso de rechazarse se podría invocar *sorting* como hipótesis alternativa. Para descartar la hipótesis de flujo génico se podría ponderar la distancia entre las poblaciones y compararla con la dispersión de los individuos de ambas poblaciones, pero en ausencia de una escala temporal, cualquier distancia sería potencialmente posible de recorrer. Un dato crítico es analizar si estos cariomorfos son potencialmente compatibles. Las poblaciones de Colonia 3 de Abril, Rincón de Ambrosio, Saladas centro, Saladas Sur tienen cariomorfos en el rango de 2n=50-54 y NF=84. Estas diferencias cromosómicas sumarían hasta dos fusiones céntricas, por lo que, tomando como antecedente el trabajo de Lanzone y colaboradores (2007), no alterarían la meiosis de los heterocariomorfos. En cambio, las poblaciones de Goya, Chavarría, San Roque, con cariomorfos de 2n=50, 56,62 y NF=84, difieren en al menos tres fusiones céntricas, lo cual podría alterar el correcto apareamiento y migración de los cromosomas. De cualquier manera, podrían existir o haber existido poblaciones no muestreadas con cariomorfos intermedios que representaran una solución de continuidad, el flujo génico no estaría impedido. En el caso de Santa Rosa, si las inversiones y fusiones en tándem propuestas para el origen del cariomorfo hubieran ocurrido luego del flujo génico entre ellas, podría también ser verosímil el flujo génico con las demás poblaciones de su *cluster* (aunque dada la gran cantidad de supuestos necesarios, esta hipótesis sería poco probable).

Si las discrepancias entre los *clusters* basados en microsatélites y la filogenia mitocondrial se debieran al *sorting* diferencial de haplotipos mitocondriales, dada la separación que los haplotipos de estas poblaciones tienen en el árbol, la explicación más plausible sería que la mayor parte de la variabilidad mitocondrial ya existía en el ancestro común al grupo Corrientes, y que las distintas variantes fueron fijadas por azar en los diferentes demos. Si la hipótesis de *sorting* fuera cierta para todos los linajes, entonces el árbol no guardaría señal filogenética alguna, pero esto resulta poco probable debido a las congruencias halladas entre el árbol mitocondrial, los caracteres cromosómicos y los marcadores microsatélite nucleares.

En el trabajo de Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol (2012) quedan agrupados en un *cluster* las poblaciones de Santa Rosa (2n=66 NF=86-94) y San Miguel (2n=44 NF=76), y los autores sugieren que esta sería una evidencia de flujo génico entre cariomorfos muy divergentes. Estos resultados entran en contradicción con los agrupamientos por microsatélites que obtuvieran algunos de los autores de este trabajo (Mirol *et al* 2010) en los que San Miguel forma un *cluster* únicamente con otras poblaciones en las proximidades de los Esteros del Iberá (en coincidencia con la filogenia mitocondrial y la afinidad de cariomorfos del presente trabajo), y Santa Rosa queda agrupada con San Roque, Chavarría y Goya (poblaciones con cariomorfos más afines). Sería necesario realizar una filogenia de marcadores nucleares para descartar la hipótesis de flujo génico entre Santa Rosa y San Miguel, aunque por la disimilitud entre sus cariomorfos resulta muy poco probable, ya que un híbrido entre estos cariomorfos sería heterocigota para fusiones en tándem e inversiones, además de numerosas fusiones céntricas.

4.7 El status taxonómico de los miembros del grupo Corrientes

Las tres especies nominales del grupo Corrientes, *C. dorbignyi, C. perrensi* y *C. roigi,* se caracterizan por la homogeneidad cariotípica de sus poblaciones, criterio adoptado por los autores que estudiaron inicialmente algunas formas del grupo para la delimitación taxonómica. En ausencia de un marco filogenético, las poblaciones fueron históricamente agrupadas primero por similitud morfológica y más tarde por homogeneidad cariotípica (Contreras y Scolaro 1986). Entre las características morfológicas se comparaban patrones osteométricos, osteográficos, baculares (del hueso peneano) y del pelaje de los organismos estudiados. Así Contreras y Scolaro (1986) describirían cuatro núcleos de poblaciones de *C. dorbignyi* en Corrientes: uno al norte (Mbarigüí y Paraje Angostura), uno al sur (Paraje Sarandicito y poblaciones cercanas), uno al este (Contreras Cué) y uno en el centro (Mburucuyá y Loma Alta). Contreras y colaboradores (1985) describirían 39 poblaciones en las que ocurriría *C. perrensi*, en una amplia distribución que ocuparía el 7,5⁄ de la superficie de la provincia de Corrientes, desde el suroeste de la provincia (Goya en el extremo), pasando por el centro y alcanzando las poblaciones de Loreto, San Miguel y Curuzú Laurel. En 1988 Contreras describiría por primera vez a *C. roigi*, asignando localidad de Empedrado como topotipo y una distribución restringida, de unos 50 km^2 (Contreras 1988). Posteriormente, a partir del trabajo de Ortells, Contreras y Reig (1990) únicamente mantendrían el *status* de especie aquellas

poblaciones que tuvieran el mismo cariomorfo que la localidad tipo, quedando como definitivas las poblaciones referidas en la introducción (ver ítem 1.1.6, en Introducción). El resto de poblaciones fueron incluidas en el grupo indeterminado, *Ctenomys* sp. (también referido como "complejo perrensi"), todas con cariomorfos distintos de las especies nominales.

Tomando en consideración simultáneamente los datos de morfología y número cromosómico, así como la filogenia mitocondrial aportados en esta tesis, y teniendo en cuenta los agrupamientos por *clusters* microsatélites obtenidos por Mirol (2010), Gómez Fernández (2012) y respectivos colaboradores, se puede reanalizar en un marco ampliado el *status* taxonómico del grupo Corrientes. Los nuevos grupos taxonómicos propuestos se esquematizan en la Figura 41.

El grupo que diverge del nodo F en la filogenia (Figura 20), con altos valores de apoyo, incluye a las poblaciones de Goya, Rincón de Ambrosio y Colonia 3 de Abril, actualmente asociadas a *C. perrensi*, y a la población de Chavarría. Para considerar a *C. perrensi* como grupo natural sería necesario incluir a Chavarría en esta entidad. Desde un punto de vista cromosómico estas poblaciones podrían ser interfértiles suponiendo que existen o existieron cariomorfos intermedios no han sido muestreados en la distribución aledaña a estas poblaciones o que las tres fusiones hipotéticas que separan a estos cariomorfos no funcionaran como barrera reproductiva (ver ítem 4.6, en Discusión). Adoptando un criterio cauteloso y considerando el número y el tipo de diferencias cromosómicas, se puede proponer a *perrensi* como grupo natural, que incluiría una o a lo sumo dos especies. Los análisis de microsatélites separan a estas poblaciones en *clusters* diferentes sugiriendo que habría habido algún nivel de flujo génico entre este grupo y las poblaciones de nodo C (Figura 20).

Los núcleos norte y sur de la distribución de *C. dorbignyi*, los únicos con 2n=70 NF=84, resultaron polifiléticos en la filogenia mitocondrial. Los haplotipos de la población de Paraje Sarandicito resultaron basales al grupo de poblaciones relacionadas con *C. perrensi*, mientras que el haplotipo hallado en las poblaciones del norte cae en la politomía común a los restantes grupos (Figura 20). Para considerar *C. dorbignyi* un grupo natural, esta especie debe restringirse a las localidades del norte: Mbarigüí (que retendría el nombre por ser la localidad tipo) y Paraje Angostura. A favor de esta redefinición del taxón está el agrupamiento en *clusters* diferentes por microsatélites de ambos núcleos poblacionales. El linaje de Paraje

Sarandicito debería tener otra denominación, y la afinidad cromosómica con *C. dorbignyi* representaría un estado plesiomórfico, lo cual pone en evidencia que los rasgos cromosómicos pueden no ser diagnósticos de especies en todos los casos, y la importancia de las filogenias basadas en caracteres moleculares y morfológicos, además de los rasgos ecológicos y comportamentales.

Las poblaciones adscriptas a *C. roigi*, tanto la topotípica de Costa Mansión como Arroyo Pehuajó, ambas caracterizadas por un cariomorfo de 2n=48 y NF=80 quedan agrupadas en un único *cluster* de microsatélites junto con la recientemente descripta Estancia San Luis. En esta tesis se describió el cariomorfo de esta última población, que resultó indistinguible del cariotipo de *C. roigi* (Ortells, Contreras y Reig 1990). En la filogenia mitocondrial únicamente se incluyeron haplotipos de Estancia San Luis, que resultaron monofiléticos. Adicionalmente, en el trabajo de Gómez Fernández, Gaggiotti y Mirol (2012) se hallaron dos haplotipos mitocondriales en esta población que resultaron idénticos a los de Arroyo Pehuajó, reforzando el carácter homogéneo del taxón *C. roigi*.

Un cuarto taxón podría ser definido a la luz de la filogenia mitocondrial, la marcada semejanza entre los cariomorfos que lo integran y los agrupamientos por microsatélites: el grupo *iberá*. Este grupo incluye a las poblaciones de San Miguel, Estancia La Tacuarita, Loreto, Contreras Cué, San Alonso, Paraje Caimán y Curuzú Laurel. Con excepción de esta última, todas forman un grupo monofilético en la filogenia (Figura 20). Sin embargo, como se dijo, la posición de Curuzú Laurel, cayendo en una politomía común al grupo *iberá*, no es incongruente con su inclusión en el grupo. Probablemente esta posición indefinida se deba a la falta de resolución de los caracteres utilizados, lo que alienta a agregar nuevos caracteres a la filogenia. A favor de su inclusión en el grupo está el cariomorfo indistinguible de los demás 2n=42, y su inclusión en *clusters* que únicamente involucran poblaciones de este grupo en análisis con microsatélites. Ahora bien, se sugiere al grupo *iberá* como un taxón pero no como una especie ya que las fusiones en tándem hipotetizadas entre los cariomorfos de NF=76 y NF=78 actuarían como barreras al flujo génico, pudiendo diferenciarse al menos dos especies.

El linaje de Santa Rosa también puede ser considerado un grupo de evolución independiente, debido a que posee un rango de NF exclusivos, y estaría aislado reproductivamente debido a los reordenamientos que lo separan del resto de cariomorfos del grupo Corrientes. Las restantes poblaciones que divergen del nodo C (Figura 20), con excepción de Santa Rosa y Estancia San Luis, tienen rangos en el 2n que van de 51 a 62

cromosomas y todas tienen NF 84, por lo que se trataría de un complejo de formas relacionadas, y se propone que conserven la denominación de Complejo *Ctenomys* sp.

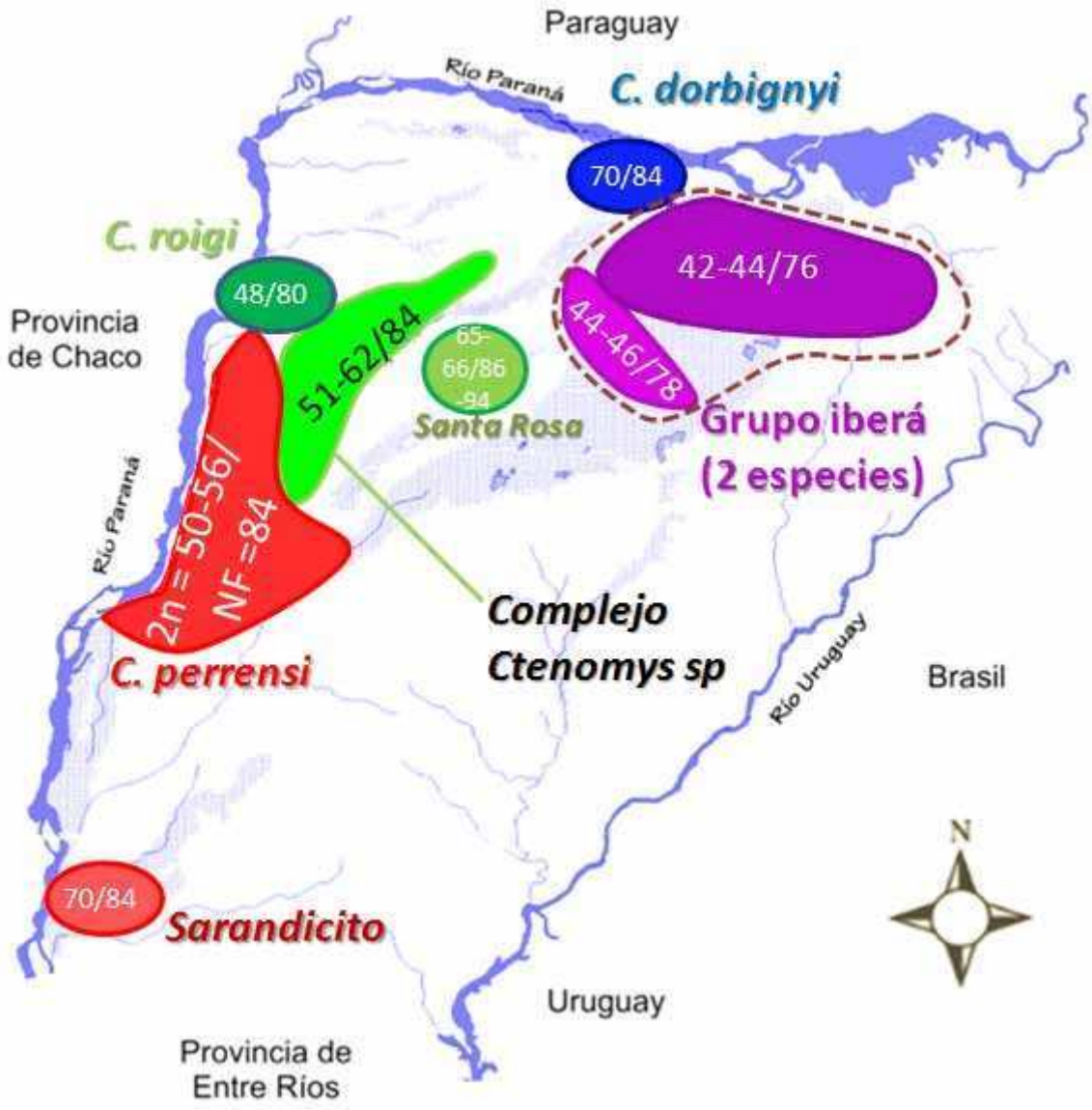


Figura 41. Entidades y linajes de evolución independiente en el Grupo Corrientes, a partir de la integración de estudios filogenéticos, cromosómicos y genético-poblacionales. Quedan definidos al menos ocho linajes de evolución independiente en el grupo Corrientes.

4.8 ¿Es aplicable la metodología del "código de barras del ADN" al grupo Corrientes?

En 2003, Paul Hebert, investigador de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá, propuso el "código de barras del ADN" como un método de identificación de especies (Hebert, Cywinska y Ball 2003). El código de barras del ADN es una propuesta metodológica de

aplicación a gran escala en animales para, (i) asignar individuos incógnitos a especies, y (ii) promover el descubrimiento de nuevas especies.

La metodología del código de barras propone la amplificación y secuenciación de una región de 648 pb del gen mitocondrial de COI, y su posterior comparación mediante el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P), para obtener entonces una medida de las distancias genéticas de secuencias comparadas de a pares. Estos valores de distancias se utilizarían para determinar si un individuo incógnito corresponde a una especie conocida, o si por el contrario, se trata de una nueva especie.

En cuanto a la estandarización de un método aplicable a todos los *phyla* animales, Hebert, Cywinska y Ball (2003) señalan que las ventajas de la utilización de un marcador mitocondrial resultan categóricas: en animales son más convenientes que los genes nucleares, por la ausencia de intrones, baja tasa de recombinación y modo de herencia haploide; existen cebadores disponibles universales, que amplifican COI en todos los *phyla* animales; las inserciones/deleciones son muy poco frecuentes en secuencias codificantes mitocondriales, lo que facilita un alineamiento inequívoco.

En relación a la utilización de COI en lugar de otros *loci* mitocondriales, las ventajas que señalan Hebert, Cywinska y Ball (2003) son: nuevamente cebadores universales que amplifican en todos los *phyla* de animales; tendría un mayor rango de señal filogenética que otros marcadores (pero Tobe, Kitchener y Linacre (2010), hallaron que, entre los mamíferos, cyt-b tiene más señal y poder discriminatorio que COI); la evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no sólo de especies cercanamente emparentadas sino también la de grupos filogeográficos dentro de una misma especie.

Sin embargo, la utilización de un marcador de herencia uniparental, mediante una metodología de distancias genéticas, para establecer los límites de especies ha sido difícil de aceptar por una buena parte de la comunidad de sistemáticos taxónomos. Por otro lado, ambas aplicaciones del "código de barras" (asignación de ejemplares a especies ya descriptas y el “descubrimiento” de nuevas especies) requieren un enfoque taxonómico, por lo que supondrían un muestreo adecuado de la variabilidad dentro de una especie, y la inclusión de todas las especies descriptas para un género determinado (Moritz y Cicero 2004). Una diagnosis precisa podrá realizarse si se cumple el supuesto de que la variabilidad

intraespecífica es baja en relación a la interespecífica (ver más adelante). A pesar de haber sido propuesto (Wiens y Penkrot 2002; Hebert *et al* 2004), la divergencia en ADN mitocondrial no debería ser considerada un criterio primordial para la delimitación de especies (Sites y Marshall 2003). Las limitaciones que posee la utilización de marcadores mitocondriales para inferir límites de especie incluyen fenómenos tales como retención de polimorfismos ancestrales, flujo génico mediado por machos, selección sobre cualquier nucleótido de la molécula de ADN mitocondrial (el genoma mitocondrial completo es un grupo de ligamiento), introgresión e hibridación, heteroplasmia y paralogía resultante de la transferencia de copias de genes mitocondriales al núcleo (Rubinoff, Cameron y Will 2006). El "código de barras" ha sido empleado extensamente en grupos cuya taxonomía era previamente conocida como los pájaros (Hebert *et al* 2004), pero como Baker y colaboradores (2009) reconocen, las limitaciones mencionadas son mayores cuando la taxonomía y la biología en general del grupo en cuestión son desconocidas. La discordancia entre la sistemática basada en ADN mitocondrial, marcadores nucleares, caracteres morfológicos, ecológicos o comportamentales debería estimular la revisión taxonómica de los grupos, pero ninguna de ellas debería ser un criterio único para la delimitación de especies.

4.8.1 Sobre los valores umbrales para la delimitación de especies el establecimiento de niveles de divergencia inter e intraespecífico

El proyecto de "código de barras" establece que es posible inferir la diversidad de especies a partir de la diversidad observada a nivel nucleotídico. Esto no es novedoso, el concepto genético de especie establece que las distancias genéticas pueden ser utilizadas para inferir aislamiento reproductivo e independencia evolutiva (Mayden 1997, en Bradley y Baker 2001). El punto crítico de este concepto es la determinación de la magnitud de la variación genética requerida para distinguir dos especies putativas, y si esta magnitud es universal para todos los grupos de organismos.

Los "códigos de barras" de especies identificadas por métodos externos han sido usualmente utilizados para determinar la distancia media intra e inter específica, y así definir valores umbrales que indicarían el límite entre especies. La mayor parte de los trabajos en los que se aplicó el "código de barras" han utilizado esta metodología, ya sea estableciendo un nivel porcentual de distancia K2P como umbral de distancia intra o interespecífica, o con umbrales relativos, en los que el umbral era 10 veces la media de la variación intraespecífica dentro de un grupo (Hebert *et al* 2004). Sin embargo, en moluscos (Meyer y Paulay 2005) y en

anfibios (Vences *et al* 2005), esta aproximación produjo solapamientos entre los valores inter e intraespecíficos, y por lo tanto el método no mostró poder discriminatorio. Hickerson, Meyer y Moritz (2006 y referencias allí citadas) mostraron que el criterio del umbral de 10 veces la variación inter versus intraespecífica, fallaba en reconocer linajes de evolución independiente (aislados reproductivamente) en moscas, peces, mariposas, anfibios y erizos de mar. En muchos de los casos, también este criterio asignaba el *status* de especie a organismos que no mostraban ningún grado de aislamiento reproductivo.

En el trabajo seminal de Hebert, Cywinska y Ball (2003) si bien apoyan la utilización de umbrales de distancias genéticas para determinar especies, advierten que dichos umbrales deberían establecerse empíricamente para cada grupo taxonómico con caracteres propios de cada grupo de organismos, como el tiempo generacional o el régimen de dispersión. Es decir que el concepto genético de especie no puede ser universalmente aplicado si se desconocen los niveles de divergencia nucleotídica del grupo de especies en cuestión.

En el citado caso de roedores africanos del género *Taterillus* (ver ítem 4.6, en Discusión), las 4 especies y dos formas, que difieren todas en al menos una fusión en tándem (además de fusiones robertsonianas), poseen distancias genéticas que entran dentro del rango de diferenciación intraespecífico en roedores, según lo establecido por Bradley y Baker (2001). Las distancias K2P (x100) de a pares aplicadas a secuencias parciales de cyt-b (796 pb) entre estas especies y formas dieron valores entre 1,9 y 7⁄ (Dobigny *et al* 2005). Estas formas son linajes independientes, todos los cruzamientos híbridos dieron descendencia estéril, y por lo tanto se trata de especies distintas, indetectables por un criterio de distancias genéticas con un marcador mitocondrial.

Otra dificultad en el establecimiento de umbrales de distancias genéticas para delimitar especies reside en las características genético-poblacionales de los organismos en cuestión. Las especies con amplios rangos de distribución, o los complejos de especies y formas, como los círculos de razas, tendrán taxones en los extremos que podrían superar un valor umbral determinado, pero si se los comparara con poblaciones adyacentes probablemente tengan una divergencia mucho menor.

4.8.2 La última palabra la tienen los árboles

En la bibliografía abundan las referencias al descubrimiento de numerosas especies crípticas merced a las metodologías de "código de barras" o análogas que se basan en el

concepto genético de especie. Sin embargo, terminan por validarse sólo en contextos filogenéticos. Por ejemplo, Bradley y Baker (2001) ejemplifican el cuestionamiento de la condición de tres subespecies del género de roedores *Sigmodon* apoyándose en estudios de distancias basados en secuencias de cyt-b. Lo llamativo es que si bien mencionan que los ejemplares de las tres subespecies mostraban altos niveles de divergencia genética, la justificación para elevarlas al *status* de especies yacía en que estos taxones resultaron parafiléticos en análisis filogenéticos por máxima parsimonia, métodos de distancias y máxima verosimilitud. La misma justificación es realizada para explicar el hallazgo de especies crípticas en otros tres géneros de roedores: *Neotoma*, *Peromyscus* y *Reithrodontomys* (Bradley y Baker 2001).

Otro aspecto en el que se manifiesta la dependencia del "código de barras" respecto de una filogenia resuelta es en la pretensión de describir nuevas especies. Un supuesto implícito del método del "código de barras" es que el grupo taxonómico al que pertenece una "nueva" especie (estrictamente lo que describe es un haplotipo novedoso) esté completamente resuelto a nivel filogenético y los taxones sean recíprocamente monofiléticos. Hogg y Hebert (2004) intentaron obtener el "código de barras" de un grupo de colémbolos, con el objeto de reconocer especies crípticas. El análisis arrojó un resultado inesperado: el género *Folsomia* resultó cuatro veces parafilético. En situaciones como esta, la probabilidad de identificar correctamente mediante el "código de barras" una especie no descripta de *Folsomia* es remota. Es decir, que en casos en los que las especies no alcancen la monofilia recíproca (como es probable en los casos de complejos de especies, especies crípticas, o de divergencia reciente), un método de distancias genéticas que ignore la filogenia del grupo en cuestión fracasaría en el intento de delimitar especies.

4.8.3 Sobre la aplicación de un criterio de distancias para delimitar especies en el grupo Corrientes

Se compararon las distancias K2P (⁄) a nivel intrapoblacional, dentro de los clados mayoritarios, y entre clados mayoritarios del grupo Corrientes, y además a nivel interespecífico (entre los grupos externos y entre estos y el grupo Corrientes). Para las estimaciones de distancias se utilizaron únicamente las secuencias parciales de COI y cyt-b, por tener similar entre sí y mayor nivel de diferenciación que *D-loop*. Los clados fueron definidos de acuerdo a la filogenia mitocondrial (ver ítem 3.1.2.2, en Resultados): el clado de poblaciones en la zona de

influencia del estero de Santa Lucía (nodo C), las dos poblaciones de *C. dorbignyi* (Mbarigüí y Paraje Angostura), el grupo Iberá (nodo D y Curuzú Laurel), el grupo de las poblaciones del sur (nodo F) y el clado de *C. pearsoni*. Las distancias interespecíficas fueron computadas entre los miembros de cada especie del grupo externo y el grupo Corrientes por un lado, con respecto a *C. pearsoni* por otro, y entre ellas. Los valores promedio, desvíos y rangos máximo y mínimo de las comparaciones de distancias K2P se adjuntan en el Anexo I. El rango de distancias a nivel intrapoblacional se superpone con el de distancias interpoblacionales (dentro de un mismo clado) y entre clados. Sólo cuando se utilizan ambos marcadores en simultáneo la distribución de distancias interespecíficas se separan de las de las infraespecíficas (Figura 42.a) Es esperable que aumentando el número de caracteres a comparar aumente el poder discriminatorio de esta metodología, dado que la dispersión tenderá a disminuir. El grado de solapamiento entre los niveles infra e interespecífico es mayor en el caso de COI que en el de cyt-b (Figura 42.b y c), hecho que coincide con el mayor poder discriminatorio atribuido por Tobe, Kitchener y Linacre (2010) a cyt-b.

Los valores de distancias estimados en esta sección no pretenden de ninguna forma establecer umbrales para la detección de especies, debido a que como se discutió más arriba, sería una tentativa muy reduccionista que no contempla la morfología, la ecología de los organismos en cuestión, al tiempo que niega las propias limitaciones del tipo de marcador y de una aproximación fenética como son las medidas de distancia. Si se diera validez a los criterios de valores umbrales, el solapamiento de las distancias de los tres niveles infraespecíficos, implicaría que todo el grupo Corrientes representaría una única especie. Sin dudas, un grupo en el que habrían ocurrido reordenamientos cromosómicos que constituyen barreras al flujo génico, identificándose, al menos, cuatro linajes evolutivamente independientes (ver ítem 4.7, en Discusión) no es una única especie. La imposibilidad de distinguir linajes de evolución independiente mediante una metodología de distancias genéticas como la del "código de barras" da cuenta de su inaplicabilidad en complejos de especies de divergencia reciente, como los tuco-tucos del grupo Corrientes.

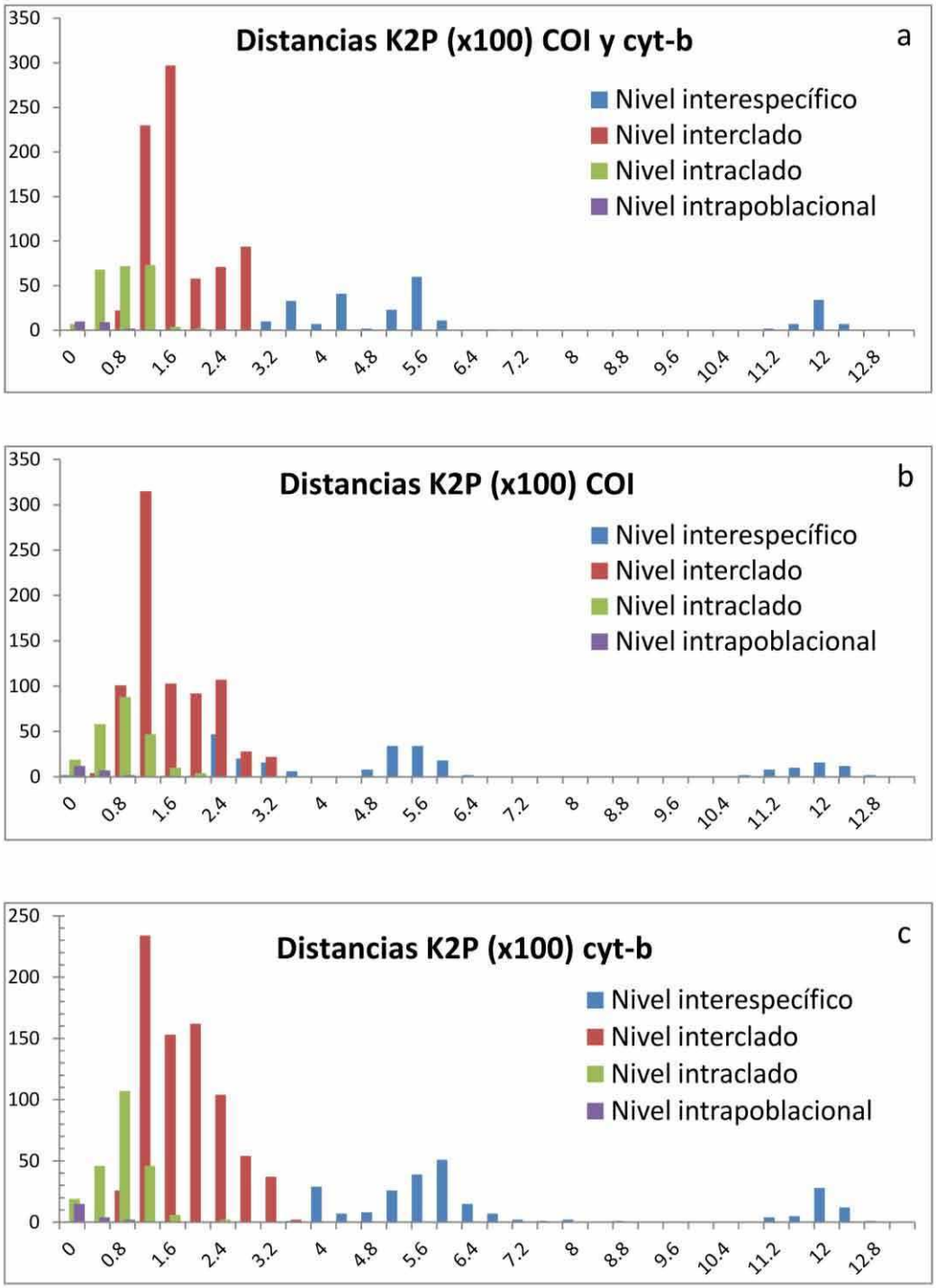


Figura 42. Histogramas de frecuencias de distancias K2P (x100) en comparaciones de a pares en 4 niveles de agrupamiento según la filogenia obtenida en esta tesis: intrapoblacional (violeta), intraclado (verde), interclado (bordeaux) e interespecífico (azul). a) En base a COI y cyt-b en conjunto; b) en base a COI y c) en base a cyt-b.

4.9 La actividad de SRPC en genomas de una misma población: cambios de hasta un orden de magnitud en el número de copias no alteran la morfología de los cromosomas

El análisis de la evolución del número de copias de SRPC en el contexto de la filogenia de varios linajes de *Ctenomys* (pero que no incluyó al grupo Corrientes) reveló una asociación entre la actividad del satélite, inferida a partir de las fluctuaciones en el número de copias (hasta tres órdenes de magnitud), y el cambio cromosómico (Slamovits *et al* 2001). Así, los clados con un número de copias estable resultaron también estables cariotípicamente, mientras que en aquellos linajes en los que SRPC mostró fluctuaciones, tienen cariotipos reordenados.

En el marco de la puesta a prueba de la hipótesis de la biblioteca ancestral de variantes de SRPC (ver ítems 1.6.3 y 1.6.4, en Introducción) se analizó la variación en el número de copias de SRPC a nivel intrapoblacional (ver ítem 3.3.3, en Resultados). Este es el primer trabajo que analiza la variación interindividual del número de copias de un ADN satélite dentro de una población (Caraballo, Belluscio y Rossi 2010). Sorpresivamente el rango de variación de número de copias de SRPC entre individuos de distintas poblaciones fue muy amplio, desde valores indetectables hasta un orden de magnitud. Sin embargo, en poblaciones donde se observara fluctuación del número de copias de hasta un orden de magnitud, por ejemplo en Curuzú Laurel, la morfología y número cromosómico se mantienen inalterados (por lo menos en los dos individuos estudiados de esta población). Del mismo modo, los cariomorfos encontrados en Estancia La Tacuarita, San Alonso y Goya son homogéneos dentro de cada población, y sin embargo los individuos tienen una variación de más de un millón de copias de SRPC entre ellos. En otras poblaciones de cariomorfos invariantes, San Roque y Chavarría, la diferencia intrapoblacional entre el máximo y el mínimo sería de de 420.000 copias y 520.000 copias respectivamente (ver ítem 3.3.3, en Resultados). Sería interesante realizar experimentos de hibridación *in situ* con sondas de SRPC sobre estos cariomorfos para evaluar citológicamente si el cambio de número de copias de SRPC se manifiesta en la variación del tamaño, localización y/o número de bloques de este satélite, y si esta ocurre fuera o dentro de regiones críticas para la correcta segregación de los cromosomas como lo son las centroméricas.

Queda claro que los cambios en número de copias de SRPC, de hasta un orden de magnitud, pueden ocurrir sin dejar una huella evidente en la arquitectura cromosómica en los cariomorfos del grupo Corrientes. Pero este hecho no excluye la posibilidad de que los

reordenamientos cromosómicos sean mediados por eventos de recombinación ilegítima de tándems de SRPC, ya sea entre cromosomas heterólogos, o entre *loci* diferentes dentro de un mismo cromosoma. Es sugestivo el hallazgo realizado en las especies uruguayas, *C. pearsoni*, *C. rionegrensis* y *C. torquatus*, respecto a la co-localización de SRPC y proteínas involucradas en la reparación del ADN (Novello y Villar 2006; Novello, Villar y Urioste 2010). En paquitene, las regiones heterólogas de distintos cromosomas del complemento, ricas en secuencias SRPC de acuerdo con experimentos de hibridación *in situ*, se agruparían constituyendo cromocentros en los que co-localiza la proteína BRCA1 (Novello y Villar 2006; Novello, Villar y Urioste 2010). Según proponen los autores del trabajo, en los cromocentros donde se aglutina SRPC se producirían rupturas en la cromatina por estrés mecánico y en las reparaciones mediadas por BRCA1, implicada en procesos de reparación de rupturas de ADN de doble hebra, se produciría el intercambio entre regiones heterólogas. Pero, como se dijo, aún si éste fuera el único proceso involucrado en el origen de reordenamientos cromosómicos de los *Ctenomys* del grupo Corrientes, es decir, si todos fueran mediados por SRPC, podría no quedar evidenciado por una alteración en su número de copias, dado que un evento de intercambio heterólogo puede no provocar duplicaciones o deleciones (aunque, a la inversa, las duplicaciones y deleciones de SRPC sí presuponen eventos de entrecruzamiento) y sería suficiente para promover una translocación o una fusión céntrica o en tándem, una inversión o una fisión. En relación al cambio en número de copias y su vínculo con los reordenamientos cromosómicos, Gauthier, Hima y Dobigny (2010) sostienen que en una especie de jerbillo, *Gerbillus nigeriae*, los cromosomas metacéntricos originados por fusiones más derivados, tienden a sufrir eliminaciones de repeticiones de ADN satélite, aunque no queda claro si esta tendencia se cumple en todos los metacéntricos ni las causas de esta reducción.

4.10 La variabilidad de SRPC es compartida por todos los linajes: la hipótesis de la biblioteca ancestral

Los perfiles de variabilidad nucleotídica de la secuencia SRPC en los tuco-tucos del grupo Corrientes son compatibles con la hipótesis de una biblioteca ancestral (ver ítem 1.6.3, de Introducción). Por un lado, las variantes mayoritarias halladas en *ips* de un individuo coinciden con la variante nucleotídica fijada en las secuencias monomórficas. Además, las variantes minoritarias suelen ser compartidas por individuos de diferentes poblaciones, lo que sugiere que no se habrían originado por mutaciones al azar, sino que pertenecerían a un

repertorio ancestral común de SRPC. Conjuntamente, ninguna posición muestra variantes exclusivas (siempre que se observaron sitios con variantes diferentes fijadas en dos o más poblaciones, se hallaron secuencias polimórficas, con ambas variantes componiendo el *ip* en otras poblaciones) y todos los *ip*s solapan parcial o totalmente en el grupo Corrientes (ver ítem 3.3.1, de Resultados). De hecho, el consenso estricto de las secuencias genómicas consenso del grupo Corrientes también solapa con el consenso estricto de las 10 especies de *Ctenomys* estudiadas por Ellingsen, Slamovits y Rossi (2007) (ver ítem 3.3.2, en Resultados).

A pesar de que en el marco de la hipótesis de la biblioteca ancestral, la variación en el número de copias y en la secuencia nucleotídica han sido tratados como parámetros interdependientes, pocas veces habían sido analizados en conjunto. En esta tesis se encontró una asociación inversa entre estas variables en casi la totalidad de las poblaciones (ver ítem 3.3.4, de Resultados). Esta asociación refuerza el argumento a favor de la existencia de una biblioteca ancestral de variantes de SRPC: el repertorio de variantes de SRPC en una población, mediante procesos de recombinación o círculo rodante, es amplificado, contraído o incluso suprimido. Cuando ocurre una amplificación, un tándem de variantes monoméricas -que podrían estar sujetas a conversión génica a nivel local- se expande a expensas de otras variantes, ocasionando una disminución en la variabilidad nucleotídica global. De manera análoga, cuando ocurre una reducción de un número significativo de copias -que involucraría un extenso tándem de repeticiones homogéneas- la cantidad relativa de variantes minoritarias de SRPC aumenta en el perfil global, aumentando el número de *ip*s observados. Por lo dicho en el párrafo anterior, es notable que cuando los *ip*s se vuelven "visibles" a causa de una reducción del número de copias de SRPC, involucran las mismas variantes aún entre diferentes poblaciones, lo que sugiere, nuevamente, que esta variabilidad es compartida por ancestralidad común.

5 CONCLUSIONES

En esta tesis se integraron tres aspectos de la evolución de un complejo de especies de los roedores del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) de la provincia de Corrientes. El estudio filogenético permitió analizar la pertenencia de las poblaciones y las especies nominales a los clados que conforman el grupo, e interpretar su amplia variabilidad cromosómica, y ésta, a su vez, el posible rol de la dinámica del satélite SRPC. Estos enfoques hacen un aporte decisivo a la discusión taxonómica en este grupo, que sumados a otros enfoques son necesarios para definir las unidades de conservación en las áreas protegidas de la provincia de Corrientes, como el Parque Nacional Mburucuyá y la Reserva Provincial Esteros del Iberá.

A continuación, las conclusiones en relación a las hipótesis planteadas en la Introducción (ver ítem 1.7, en Introducción).

- El grupo Corrientes resultó monofilético y hermano la especie uruguaya *Ctenomys pearsoni*.

- Las especies nominales *C. dorbignyi* y *C. perrensi* no resultaron monofiléticas en la filogenia mitocondrial del grupo. En el caso de *C. perrensi*, debería incluirse la población de Chavarría, para considerarla grupo natural (que incluye una o dos especies). Las poblaciones disyuntas de *C. dorbignyi*, pertenecen a linajes de divergencia lejana. En el caso de la tercera especie nominal, *C. roigi*, sería necesario incluir haplotipos de otras poblaciones (incluido el topotipo) para constatar su monofilia.

- No se descartan hipótesis de flujo génico entre cariomorfos de NF 84 que pertenecen a clados diferentes en la filogenia mitocondrial.

- Salvo dos, todas las poblaciones resultaron monofiléticas, lo que sugiere ausencia de actual o reciente flujo génico intenso mediado por hembras.

- Las fluctuaciones de hasta un orden de magnitud en el número de copias del satélite SRPC no alteran la estructura y morfología cromosómica. Sin embargo, no se descarta que procesos que no involucren cambios drásticos en el número de copias, puedan mediar recombinaciones entre *loci* heterólogos.

- Los reordenamientos más frecuentes que afectan únicamente el 2n, son fusiones robertsonianas. También habrían ocurrido fusiones en tándem que explican la mayor parte de los cambios en NF (y que simultáneamente afectan al 2n), y que constituirían barreras al flujo génico.

- El grupo iberá, un linaje independiente y bien diferenciado, tiene cariomorfos de diferente NF. A su vez, éstos no forman grupos monofiléticos, lo que sugiere la ocurrencia de reversiones o (más probablemente) reordenamientos paralelos y recurrentes en este linaje. La presencia de fusiones en tándem en este grupo, sugiere la existencia de al menos dos especies.

- La aplicación de metodologías de distancias genéticas, como la del "código de barras", resulta inapropiada para delimitar especies en un complejo de especies y formas de evolución reciente como el grupo Corrientes. El grado de solapamiento en las distancias calculadas en distintos niveles jerárquicos indicaría que todo el grupo Corrientes es una sola especie, hecho mucho más que improbable, debido a la altísima variabilidad cromosómica que constituiría barreras al flujo génico entre muchos cariomorfos.

- La asociación inversa entre número de copias de SRPC y la variabilidad del perfil nucleotídico del satélite (número de *ip*s) confirma la hipótesis de una biblioteca ancestral de variantes de SRPC en este grupo. También apoya esta hipótesis el hecho de que la variabilidad es compartida por el grupo Corrientes, y también por otros grupos de especies de *Ctenomys*.

Referencias bibliográficas

Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. y Ram, S. J. (2004). Image processing with imageJ. *Biophotonics International* 11[7], 36-41.

Akaike, H. (1974). New look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* AC-19[6], 716-723.

Aladjem, M. I. y Fanning, E. (2004). The replicon revisited: an old model learns new tricks in metazoan chromosomes. *EMBO reports* 5[7], 686-691.

Altuna, C. A. y Lessa, E. P. (1985). Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* , 483-488.

Argüelles, C. F., Suárez, P., Giménez, M. D. y Bidau, C. J. (2001). Intraspecific chromosome variation between different populations of *Ctenomys dorbignyi* (Rodentia, Ctenomyidae) from Argentina. *Acta theriologica* 46[4], 363-373.

Avise, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution* Springer.

BAKER, A. J., TAVARES, E. S. y ELBOURNE, R. F. (2009). Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. *Molecular Ecology Resources* 9, 257.

Baker, R. J. y Bickham, J. W. (1986). Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83[21], 8245-8248.

Balbontin, J., Reig, S. y Moreno, S. (1996). Evolutionary relationships of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina, based on penis morphology. *Acta theriologica* 41.

Belfiore, N. M., Liu, L. y Moritz, C. (2008). Multilocus phylogenetics of a rapid radiation in the genus *Thomomys* (Rodentia: Geomyidae). *Systematic biology* 57[2], 294-310.

Bidau, C. J., Martí, D. A. y Giménez, M. D. (2003). Two exceptional South American models for the study of chromosomal evolution: the tucura *Dichroplus pratensis* and the tuco-tuco of the genus *Ctenomys*. *Historia Natural (8)* , 53-72.

Blanga-Kanfi, S., Miranda, H., Penn, O., Pupko, T., DeBry, R. W. y Huchon, D. (2009). Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evolutionary Biology* 9[1], 71.

Bohn, V. Y. y Campo, A. M. (2010). Estimación de escurrimientos superficiales para cuencas no aforadas en Corrientes, Argentina. *Investigaciones geográficas* 71, 31-42.

Borghi, C. E., Giannoni, S. M. y Roig, V. G. (2002). Eye reduction in subterranean mammals and eye protective behavior in *Ctenomys*. *J Neotropical Mammal* 9, 123-134.

Bradley, R. D. y Baker, R. J. (2001). A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82[4], 960-973.

Bradley, R. D. y Wichman, H. A. (1994). Rapidly evolving repetitive DNAs in a conservative genome: a test of factors that affect chromosomal evolution. *Chromosome Research* 2[5], 354-360.

Braggio, E., Giménez, M. D., Contreras, J. R., Justo, E. y Bidau, C. J. (1999). Karyotypic variation in populations of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from La Pampa Province (Argentina). *Caryologia* 52[3/4], 131-140.

Brown, G. G., Gadaleta, G., Pepe, G., Saccone, C. y Sbisà, E. (1986). Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* 192[3], 503.

Bryja, J., Granjon, L., Dobigny, G., Patzenhauerova, H., Konecny, A., Duplantier, J. M., Gauthier, P., Colyn, M., Durnez, L. et al. (2010). Plio–Pleistocene history of West African Sudanian savanna and the phylogeography of the *Praomys daltoni* complex (Rodentia): the environment/geography/genetic interplay. *Molecular Ecology* 19[21], 4783-4799.

Busch, C., Malizia, A. I., Scaglia, O. A. y Reig, O. A. (1989). Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* , 204-208.

Capanna, E. y Castiglia, R. (2004). Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenetic and Genome Research* 105[2-4], 375.

Caraballo, D. A., Belluscio, P. M. y Rossi, M. S. (2010). The library model for satellite DNA evolution: a case study with the rodents of the genus *Ctenomys* (Octodontidae) from the Iberá marsh, Argentina. *Genetica* 138[11], 1201-1210.

Carpentier, G. (2008). Dot Blot Analyzer: Software Development Using the Macro Language of ImageJ. ImageJ User and Developer Conference proceedings.

Castillo, A. H., Cortinas, M. N. y Lessa, E. P. (2005). Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86[1], 170-179.

Cernohorska, H., Kubickova, S., Vahala, J., Robinson, T. J. y Rubes, J. (2011). Cytotypes of Kirk's dik-dik (*Madoqua kirkii*, Bovidae) show multiple tandem fusions. *Cytogenetic and Genome Research* 132[4], 255.

Cesari, M., Luchetti, A., Passamonti, M., Scali, V. y Mantovani, B. (2003). Polymerase chain reaction amplification of the Bag320 satellite family reveals the ancestral library and past gene conversion events in *Bacillus rossius* (Insecta Phasmatodea). *Gene* 312, 289.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. y Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes.

Chi, J. X., Huang, L., Nie, W., Wang, J., Su, B. y Yang, F. (2005). Defining the orientation of the tandem fusions that occurred during the evolution of Indian muntjac chromosomes by BAC mapping. *Chromosoma* 114[3], 167-172.

Churakov, G., Sadasivuni, M. K., Rosenbloom, K. R., Huchon, D., Brosius, J. y Schmitz, J. (2010). Rodent evolution: back to the root. *Molecular biology and evolution* 27[6], 1315-1326.

Coghlan, A., Eichler, E. E., Oliver, S. G., Paterson, A. H. y Stein, L. (2005). Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *TRENDS in Genetics* 21[12], 673-682.

Contreras, J. R. (1973). El tuco-tuco y sus relaciones con los problemas del suelo en la Argentina. *Idia* 29, 14-36.

Contreras, J. R. (1988). Una nueva especie de" Anguya tutu" de la provincia de Corrientes (Argentina). *Boletín del Instituto de Estudios Almerienses* [6], 51-66.

Contreras, J. R. y Bidau, C. J. (1999). Líneas generales del panorama evolutivo de los roedores excavadores sudamericanos del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha: Ctenomyidae). *Ciencia Siglo* 21[1], 1-22.

Contreras, J. R., Davies, Y. E., Contreras, A. O. y Álvarez, M. (1985). Acerca de la distribución de *Ctenomys perrensi* Thomas, 1896 y sus relaciones geográficas con las demás especies del género (Rodentia, Ctenomyidae). *Historia Natural* 5[22], 173-178.

Contreras, J. R. y Scolaro, J. A. (1986). Distribución y relaciones taxonómicas entre los cuatro núcleos geográficos disyuntos de *Ctenomys dorbignyi* en la Provincia de Corrientes, Argentina (Rodentia, Ctenomyidae). *Historia Natural* 6[3], 21-30.

Cook, J. A., Anderson, S. y Yates, T. L. (1990). *Notes on Bolivian Mammals: The genus Ctenomys (Rodentia, Ctenomyidae) in the highlands*. American Museum novitates American Museum of Natural History.

Cook, J. A. y Salazar Bravo, J. (2004). Heterochromatin variation in the chromosomally diverse Tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae) of South America. En V. Sánchez Cordero & R. A. Medellín (Eds.), *Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa* (pp. 129-142). México D.F..

Cook, J. A. y Yates, T. L. (1994). Systematic relationships of the Bolivian tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* , 583-599.

Cutrera, A. P., Antinuchi, C. D., Mora, M. S. y Vassallo, A. I. (2006). Home-range and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Journal of Mammalogy* 87[6], 1183-1191.

Cutrera, A. P., Fanjul, M. S. y Zenuto, R. R. (2012). Females prefer good genes: MHC-associated mate choice in wild and captive tuco-tucos. *Animal Behaviour* .

Cutrera, A. P., Lacey, E. A. y Busch, C. (2005). Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* 14[8], 2511-2523.

D'Anatro, A. y D'Elía, G. (2011). Incongruent patterns of morphological, molecular, and karyotypic variation among populations of Ctenomys pearsoni (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 76[1], 36-40.

D'Elía, G., Lessa, E. P. y 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[1], 19-38.

De Freitas, T. R. O. (1994). Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia:Octodontidae) and its cytogenetic relationships with other species of the genus. *Cytogenetic and Genome Research* 67[3], 193-198.

De Freitas, T. R. O. (1997). Chromosome polymorphism in *Ctenomys minutus* (Rodentia-Octodontidae). *Brazilian Journal of Genetics* 20.

De Freitas, T. R. O. (2006). Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the south of Brazil. *Genetica* 126[1], 227-235.

Dobigny, G., Aniskin, V., Granjon, L., Cornette, R. y Volobouev, V. (2005). Recent radiation in West African *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): the concerted role of chromosome and climatic changes. *Heredity* 95[5], 358-368.

Dover, G. A. (2002). Molecular drive. *Trends in genetics: TIG* 18[11], 587.

Dover, G. A. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 285, 111-117.

Dover, G. A. y Tautz, D. (1986). Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.B, Biological Sciences* 312[1154], 275-289.

Drouin, G. (2006). Chromatin diminution in the copepod *Mesocyclops edax*: diminution of tandemly repeated DNA families from somatic cells. *Genome* 49[6], 657-665.

Duret, L. (2002). Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Current opinion in genetics & development* 12[6], 640-649.

Duret, L. y Galtier, N. (2009). Biased gene conversion and the evolution of mammalian genomic landscapes. *Annual review of genomics and human genetics* 10, 285-311.

El Jundi, T. A. R. J. y De Freitas, T. R. O. (2004). Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia: Ctenomyidae). *Hereditas* 140[1], 18-23.

Elder, J. F. y Turner, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology* , 297-320.

Ellingsen, A., Slamovits, C. H. y Rossi, M. S. (2007). Sequence evolution of the major satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia). *Gene* 392[1-2], 283-290.

Engelbrecht, A., Taylor, P. J., Daniels, S. R. y Rambau, R. V. (2011). Chromosomal polymorphisms in African vlei rats, *Otomys irroratus* (Muridae: Otomyini), detected by banding techniques and chromosome painting: inversions, centromeric shifts and diploid number variation. *Cytogenetic and Genome Research* 133[1], 8-15.

Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47.

Faria, R. y Navarro, A. (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in ecology & evolution* 25[11], 660-669.

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

Ferguson-Smith, M. A. y Trifonov, V. (2007). Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews Genetics* 8[12], 950-962.

Fernandes, F. A., Goncalves, G. L., Ximenes, S. S. y de Freitas, T. R. (2009). Karyotypic and molecular polymorphisms in *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genetica* 136[3], 449-459.

Fernández-Stolz, G. P., Stolz, J. F. B. y Freitas, T. R. O. (2007). Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, Ctenomys flamarioni (rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88[4], 935-945.

Frönicke, L. y Scherthan, H. (1997). Zoo-fluorescence in situ hybridization analysis of human and Indian muntjac karyotypes (*Muntiacus muntjak vaginalis*) reveals satellite DNA clusters at the margins of conserved syntenic segments. *Chromosome Research* 5[4], 254-261.

Fry, K. y Salser, W. (1977). Nucleotide sequences of HS-α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* 12[4], 1069-1084.

Gallardo, M. (1979). Las especies chilenas de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). I. Estabilidad cariotípica. *Arch.Biol.Med.Exp* 12, 71-82.

Gallardo, M., Ojeda, R., González, G. y Ríos, C. (2007). The Octodontidae revisited. En D.A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo, & J. L. Patton (Eds.), *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P.Pearson* (1 ed., pp. 695-720). UC Publications in Zoology.

Gallardo, M. H., Bickham, J. W., Honeycutt, R. L., Ojeda, R. A. y Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401, 341.

Gallardo, M. H., González, C. A. y Cebrián, I. (2006). Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Genomics* 88[2], 214-221.

Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. y Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18[22], 4541-4550.

García, L., Ponsa, M., Egozcue, J. y García, M. (2000a). Cytogenetic variation in *Ctenomys perrensi* (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 71[4], 615-624.

García, L., Ponsà, M., Egozcue, J. y García, M. (2000b). Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). Biological Journal of the Linnean Society 69, 103-120.

Gardner, S. L. y Duszynski, D. W. (1990). Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: An example from subterranean rodents in Bolivia. *The Journal of parasitology* , 805-811.

Gauthier, P., Hima, K. y Dobigny, G. (2010). Robertsonian fusions, pericentromeric repeat organization and evolution: a case study within a highly polymorphic rodent species, *Gerbillus nigeriae*. *Chromosome Research* 18[4], 473-486.

Gava, A. y De Freitas, T. R. O. (2003). Inter and intra-specific hybridization in tuco-tucos (*Ctenomys*) from Brazilian coastal plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119[1], 11-17.

Geraldes, A., Basset, P., Gibson, B., Smith, K. L., Harr, B., YU, H. O. N. T., Bulatova, N., Ziv, Y. y Nachman, M. W. (2008). Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X–linked, Y–linked and mitochondrial genes. *Molecular Ecology* 17[24], 5349-5363.

Giménez, M. D., Mirol, P. M., Bidau, C. J. y Searle, J. B. (2002). Molecular analysis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. *Cytogenetic and Genome Research* 96[1-4], 130-136.

Gindullis, F., Desel, C., Galasso, I. y Schmidt, T. (2001). The large-scale organization of the centromeric region in Beta species. *Genome Research* 11[2], 253-265.

Glinka, S., De Lorenzo, D. y Stephan, W. (2006). Evidence of gene conversion associated with a selective sweep in *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology and evolution* 23[10], 1869-1878.

Godinho, R., Crespo, E. G. y Ferrand, N. (2008). The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* 17[21], 4670-4683.

Gómez Fernández, M. J., Gaggiotti, O. E. y Mirol, P. M. (2012). The evolution of a highly speciose group in a changing environment: are we witnessing speciation in the Iberá wetlands? *Molecular Ecology* .

Graphodatsky, A. S. (2007). Comparative chromosomics. *Molecular Biology* 41[3], 361-375.

Graphodatsky, A. S., Trifonov, V. A. y Stanyon, R. (2011). The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet* 4[1], 22.

Gregory, T. R. (2012). Animal genome size database. TR Gregory.

Grewal, S. I. S. y Elgin, S. C. R. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447[7143], 399-406.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

Hamilton, M. J., Honeycutt, R. L. y 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[5], 321-329.

Hamilton, M. J., Hong, G. y Wichman, H. A. (1992). Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from *in situ* hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 60[1], 40.

Hartmann, N. y Scherthan, H. (2004). Characterization of ancestral chromosome fusion points in the Indian muntjac deer. *Chromosoma* 112[5], 213-220.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A. y Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences* 270[1512], 313-321.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. y Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* 2[10], e312.

Henikoff, S., Ahmad, K. y Malik, H. S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293[5532], 1098-1102.

Henikoff, S. y Dalal, Y. (2005). Centromeric chromatin: what makes it unique? *Current opinion in genetics & development* 15[2], 177-184.

Hickerson, M. J., Meyer, C. P. y Moritz, C. (2006). DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic biology* 55[5], 729-739.

Hogg, I. D. y Hebert, P. D. N. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82[5], 749-754.

Hörz, W. y Altenburger, W. (1981). Nudeotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic acids research* 9[3], 683-696.

Irwin, D. M., Kocher, T. D. y Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32[2], 128-144.

Jablonski, P. C. (2011). *Evolución cromosómica en roedores del género Ctenomys (Rodentia, Octodontidae) de la provincia de Corrientes* (Tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.).

Jackson, B. C. (2011). Recombination-suppression: how many mechanisms for chromosomal speciation? *Genetica* 139[3], 393-402.

Janecek, L. L., Honeycutt, R. L., Adkins, R. M. y Davis, S. K. (1996). Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily bovinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6[1], 107.

Jobse, C., Buntjer, J. B., Haagsma, N., Breukelman, H. J., Beintema, J. J. y Lenstral, J. A. (1995). Evolution and recombination of bovine DNA repeats. *Journal of Molecular Evolution* 41[3], 277-283.

John, B. y Miklos, G. L. G. (1979). Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International review of cytology* 58, 1-114.

John, B. y Weissman, D. B. (1977). Cytogenetic components of reproductive isolation in *Trimerotropis thalassica* and *T. occidentalis*. *Chromosoma* 60[2], 187-203.

Kalitsis, P. y Choo, K. H. A. (2012). The evolutionary life cycle of the resilient centromere. *Chromosoma* , 1-14.

King, K., Jobst, J. y Hemleben, V. (1995). Differential homogenization and amplification of two satellite DNAs in the genus *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Journal of Molecular Evolution* 41[6], 996-1005.

King, M. (1995). *Species evolution: the role of chromosome change* Cambridge University Press.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X. y Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86[16], 6196-6200.

Kovalskaya, Y. M., Aniskin, V. M., Bogomolov, P. L., Surov, A. V., Tikhonov, I. A., Tikhonova, G. N., Robinson, T. J. y Volobouev, V. T. (2011). Karyotype reorganisation in the subtilis group of birch mice (Rodentia, Dipodidae, *Sicista*): unexpected taxonomic diversity within a limited distribution. *Cytogenetic and Genome Research* 132[4], 271.

Lacey, E. A. (2001). Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86[5], 628-637.

Lacey, E. A., Braude, S. H. y Wieczorek, J. R. (1997). Burrow sharing by colonial tuco-tucos (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy* , 556-562.

Lam, A. L., Boivin, C. D., Bonney, C. F., Rudd, M. K. y Sullivan, B. A. (2006). Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103[11], 4186-4191.

Lanzone, C., Bidau, C. J., Gimenez, M. D. y Santos, J. L. (2002). Synaptic behaviour and morphological modifications of the X and Y chromosomes during pachytene in three species of *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Genome* 45[6], 1110-1115.

Lanzone, C., Giménez, M. D., Santos, J. L. y Bidau, C. J. (2007). Meiotic effects of Robertsonian translocations in tuco-tucos of the *Ctenomys perrensi* superspecies (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia* 60[3], 233.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23[21], 2947-2948.

Lessa, E. P. y 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[1], 88-99.

Lessa, E. P., Vassallo, A. I., Verzi, D. H. y Mora, M. S. (2008). Evolution of morphological adaptations for digging in living and extinct ctenomyid and octodontid rodents. *Biological Journal of the Linnean Society* 95[2], 267-283.

Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52[2], 201-220.

Li, W. H. (1997). *Molecular evolution* Sinauer Associates Incorporated.

Li, Y. C., Lee, C., Sanoudou, D., Hsu, T. H., Li, S. Y. y Lin, C. C. (2000). Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Research* 8[5], 363-373.

Lizarralde, M., Bolzán, A. y Bianchi, M. (2003). Karyotype evolution in South American subterranean rodents *Ctenomys magellanicus* (Rodentia: Octodontidae): chromosome rearrangements and (TTAGGG) n telomeric sequence localization in 2n= 34 and 2n= 36 chromosomal forms. *Hereditas* 139[1], 13-17.

Locke, D. P., Hillier, L. D. W., Warren, W. C., Worley, K. C., Nazareth, L. V., Muzny, D. M., Yang, S. P., Wang, Z., Chinwalla, A. T. et al. (2011). Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes. *Nature* 469[7331], 529-533.

Lunt, D. H., Zhang, D. X., Szymura, J. M. y Hewltt, O. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5[3], 153-165.

Malizia, A. I., Zenuto, R. R. y Busch, C. (1995). Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Canadian Journal of Zoology* 73[4], 732-738.

Mapelli, F. J., Mora, M. S., Mirol, P. M. y Kittlein, M. J. (2012). Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *Conserv Genet* 13[1], 165-181.

Mascheretti, S., Mirol, P. M., Giménez, M. D., Bidau, C. J., Contreras, J. R. y Searle, J. B. (2000). Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 70[2], 361-376.

Massarini, A., Mizrahi, D., Tiranti, S., Toloza, A., Luna, F. y Schleich, C. (2002). Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum talarum* from the Atlantic coast of Buenos Aires Province, Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología neotropical* 9[2], 199-207.

Massarini, A. I., Barros, M. A., Ortells, M. O. y Reig, O. A. (1991). Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica* 83[2], 131-144.

Massarini, A. I., Barros, M. A., Ortells, M. O. y Reig, O. A. (1995). Variabilidad cromoómica en *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 68, 207-214.

Massarini, A. I. y De Freitas, T. R. O. (2005). Morphological and cytogenetics comparison in species of the *Mendocinus*-group (genus *Ctenomys*) with emphasis in *C. australis* and *C. flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae). *Caryologia* 58[1], 21-27.

Mastrangelo, M. E., Schleich, C. E. y Zenuto, R. R. (2010). Spatial learning abilities in males and females of the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Ethology Ecology & Evolution* 22[1], 101-108.

Melnick, D. J. y Hoelzer, G. A. (1992). Differences in male and female macaque dispersal lead to contrasting distributions of nuclear and mitochondrial DNA variation. *International Journal of Primatology* 13[4], 379-393.

Meštrovic, N., Castagnone-Sereno, P. y Plohl, M. (2006). Interplay of selective pressure and stochastic events directs evolution of the MEL172 satellite DNA library in root-knot nematodes. *Molecular biology and evolution* 23[12], 2316-2325.

Mestrovic, N., Plohl, M., Mravinac, B. y Ugarkovic, D. (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus Palorus--experimental evidence for the" library" hypothesis. *Molecular biology and evolution* 15[8], 1062-1068.

Meyer, C. P. y Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology* 3[12], e422.

Mirol, P. M., Giménez, M. D., Searle, J. B., Bidau, C. J. y Faulkes, C. G. (2010). Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. *Biological Journal of the Linnean Society* 100[2], 368-383.

Mirol, P. M., Mascheretti, S. y Searle, J. B. (2002). Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence. *Heredity* 84[5], 538-547.

Montefalcone, G., Tempesta, S., Rocchi, M. y Archidiacono, N. (1999). Centromere repositioning. *Genome Research* 9[12], 1184-1188.

Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* , 718-726.

Mora, M. S., Kittlein, M. J., & Mapelli, F. J. (2012). Biología y genética poblacional de tuco-tucos del centro y sureste de la provincia de Buenos Aires: variaciones espaciales y temporales. *II Congreso Latinoamericano & XXV Jornadas Argentinas de Mastozoología*. *Simposio: Filogeografía, genética, ecología y conservación de metapoblaciones*.

Mora, M. S., Lessa, E. P., Cutrera, A. P., Kittlein, M. J. y Vassallo, A. I. (2007). Phylogeographical structure in the subterranean tuco–tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology* 16[16], 3453-3465.

Mora, M. S., Lessa, E. P., Kittlein, M. J. y Vassallo, A. I. (2006). Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87[6], 1192-1203.

Mora, M. S., Mapelli, F. J., Gaggiotti, O. E., Kittlein, M. J. y Lessa, E. P. (2010). Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC genetics* 11[1], 9.

Moritz, C. y Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology* 2[10], e354.

Moritz, C. y Hillis, D. M. (1996). Molecular Systematics: Context and Controversies. En D.M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (2 ed., pp. 1-13). Sunderland, MA.: Sinauer Associates.

Murphy, W. J., Larkin, D. M., Everts-van der Wind, A., Bourque, G., Tesler, G., Auvil, L., Beever, J. E., Chowdhary, B. P., Galibert, F. et al. (2005). Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 309[5734], 613-617.

Nash, W. G., Menninger, J. C., Wienberg, J., Padilla-Nash, H. M. y O'Brien, S. J. (2001). The pattern of phylogenomic evolution of the Canidae. *Cytogenetic and Genome Research* 95[3-4], 210-224.

Nijman, I. J. y 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[4], 361-371.

Novello, A. y Villar, S. (2006). Chromosome plasticity in *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae): chromosome 1 evolution and heterochromatin variation. *Genetica* 127[1], 303-309.

Novello, A., Villar, S. y Urioste, J. (2010). Possible heterochromatin horizontal spread through non-homologous chromosome associations in pachytene chromocenters of *Ctenomys* Rodents. *Cytogenetic and Genome Research* 128[1-3], 152.

Nyakaana, S. y Arctander, P. (1999). Population genetic structure of the African elephant in Uganda based on variation at mitochondrial and nuclear loci: evidence for male–biased gene flow. *Molecular Ecology* 8[7], 1105-1115.

O'Brien, S. J., Menninger, J. C. y Nash, W. G. (2006). *Atlas of mammalian chromosomes* Wiley-Liss.

Ocalewicz, K. (2012). Genomic Distribution of Telomeric DNA Sequences: What Do We Learn from Fish About Telomere Evolution? En Dr.Bibo Li (Ed.), *Reviews on Selected Topics of Telomere Biology* InTech.

Ohno, S. (1972). So much" junk" DNA in our genome. *Brookhaven symposia in biology: Vol. 23* (pp. 366-370).

Orgel, L. E. y Crick, F. H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284[5757], 604.

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[1], 43-70.

Ortells, M. O. y Barrantes, G. E. (1994). A study of genetic distances and variability in several species of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) with special references to a probable causal role of chromosomes in speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 53[2], 189-208.

Ortells, M. O., Contreras, J. R. y Reig, O. A. (1990). New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. Genetica 82, 189-201.

Owen, J. G. y Baker, R. J. (2001). The *Uroderma bilobatum* (Chiroptera: Phyllostomidae) cline revisited. *Journal of Mammalogy* 82[4], 1102-1113.

Page, R. D. M. y Holmes, E. C. (1998). *Molecular evolution: a phylogenetic approach* (56 ed.) Blackwell Science Oxford.

Parada, A., D'Elía, G., Bidau, C. J. y Lessa, E. P. (2011). Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92[3], 671-682.

Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integratedΓÇômodular approach. *Bioinformatics* 26[3], 419-420.

Paradis, E., Claude, J. y Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20[2], 289-290.

Patton, J. L. y Sherwood, S. W. (1982). Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). *Chromosoma* 85[2], 149-162.

Pesce, C. G., Rossi, M. S., Muro, A. F., Reig, O. A., Zorzópulos, J. y Kornblihtt, A. (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[4], 656-661.

Pillay, N., Willan, K. y Meester, J. (1992). Post-zygotic reproductive isolation in the African vlei rat *Otomys irroratus* (Muridae: Otomyinae). *Israel journal of zoology* 38[3-4], 307-313.

Pillay, N., Willan, K. y Meester, J. (1995). Post-zygotic reproductive isolation in two populations of the African vlei rat *Otomys irroratus*. *Acta theriologica* 40, 69.

Pinho, C., Harris, D. J. y Ferrand, N. (2008). Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evolutionary Biology* 8[1], 63.

Plohl, M., Luchetti, A., Meštrovic', N. y Mantovani, B. (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene* 409[1], 72-82.

Posada, D. y Crandall, K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14[9], 817-818.

Quintana, C. A. (1994). Ctenominos primitivos (Rodentia, Octodontidae) del Mioceno de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Bol R Soc Esp Hist Nat (Sec Geol)* 89, 19-23.

R Development Core Team. (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer, B. J. et al. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294[5540], 115-121.

Reig, O. A., Busch, C., Ortells, M. O. y Contreras, J. R. (1990). An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. *Prog Clin Biol Res* 335, 71-96.

Reig, O. A. y Kiblisky, P. (1969). Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). A progress report. *Chromosoma* 28[2], 211-244.

Reig, O. A., Massarini, A. I., Ortells, M. O., Barros, M. A., Tiranti, S. I. y Dyzenchauz, F. J. (1992). New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia* 56[4], 603-624.

Rens, W., O'Brien, P. C., Grutzner, F., Clarke, O., Graphodatskaya, D., Tsend-Ayush, E., Trifonov, V. A., Skelton, H., Wallis, M. C. et al. (2007). The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol* 8[11], R243.

Rieseberg, L. H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in ecology & evolution* 16[7], 351-358.

Robinson, T. J., Ruiz-Herrera, A. y Froenicke, L. (2006). Dissecting the mammalian genome – new insights into chromosomal evolution. *TRENDS in Genetics* 22[6], 297-301.

Rocchi, M., Archidiacono, N., Schempp, W., Capozzi, O. y Stanyon, R. (2011). Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 108[1], 59-67.

Rojas-Rousse, D., Bigot, Y. y Periquet, G. (1993). DNA insertions as a component of the evolution of unique satellite DNA families in two genera of parasitoid wasps: *Diadromus* and *Eupelmus* (Hymenoptera). *Molecular biology and evolution* 10[2], 383-396.

Romanenko, S. A. y Volobouev, V. (2012). Non-Sciuromorph Rodent Karyotypes in Evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 137[2-4], 233-245.

Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19[12], 1572-1574.

Ronquist, F., van der Mark, P. y Huelsenbeck, J. P. (2009). Bayesian phylogenetic analysis using MRBAYES. En M. Salemi & A. M. Vandamme (Eds.), *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny* (2 ed., pp. 210-265) Cambridge University Press.

Ropiquet, A., Hassanin, A., Pagacova, E., Gerbault-Seureau, M., Cernohorska, H., Kubickova, S., Bonillo, C., Rubes, J. y Robinson, T. J. (2010). A paradox revealed: karyotype evolution in the four-horned antelope occurs by tandem fusion (Mammalia, Bovidae, *Tetracerus quadricornis*). *Chromosome Research* 18[2], 277-286.

Rossi, M. S. (1990). *Organización, amplificación y evolución de un ADN satélite del género Ctenomys (Octodontidae, Rodentia)* (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Rossi, M. S., Pesce, C. G., Kornblihtt, A. y Zorzópulos, 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., Redi, C. A., Viale, G., Massarini, A. I. y Capanna, E. (1995b). Chromosomal distribution of the major satellite DNA of South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Cytogenetics and cell genetics* 69[3-4], 179.

Rossi, M. S., Reig, O. A. y Zorzópulos, J. (1993). A major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. Quantitative and qualitative differences in species with different geographic distribution. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 58[4], 244-251.

Rossi, M. S., Reig, O. A. y Zorzópulos, 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[4], 340-350.

Rubes, J., Kubickova, S., Pagacova, E., Cernohorska, H., Di Berardino, D., Antoninova, M., Vahala, J. y Robinson, T. J. (2008). Phylogenomic study of spiral-horned antelope by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research* 16[7], 935-947.

Rubinoff, D., Cameron, S. y Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for ´´barcoding´´ identification. *Journal of Heredity* 97[6], 581-594.

Ruedas, L. A., Cook, J. A., Yates, T. L. y Bickham, J. W. (1993). Conservative genome size and rapid chromosomal evolution in the South American tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Genome* 36[3], 449-458.

Ruiz Herrera, A., Castresana, J. y Robinson, T. J. (2006). Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biology* 7[12], R115.

Ryder, O. A., Kumamoto, A. T., Durrant, B. S. y Benirschke, K. (1989). Chromosomal divergence and reproductive isolation in dik-diks. *Speciation and its consequences* , 208-225.

Sage, R. D., Contreras, J. R., Roig, V. G. y Patton, J. L. (1986). Genetic variation in the South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 51[3], 158-172.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4[4], 406-425.

Shestakova, E. A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N. y Bonnefoy, E. (2004). Transcription factor YY1 associates with pericentromeric γ-satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic acids research* 32[14], 4390-4399.

Sites, J. W. y Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in ecology & evolution* 18[9], 462-470.

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

Slamovits, C. H. (2002a). *Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite: su relación con la evolución de los roedores tuco-tucos (Ctenomys, Octodontidae)* (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).

Slamovits, C. H., Cook, J. A., Lessa, E. P. y Rossi, M. S. (2001). Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Mol.Biol.Evol.* 18[9], 1708-1719.

Slamovits, C. H. y Rossi, M. S. (2002). Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review. *Mastozoología neotropical* 9, 297-308.

Slijepcevic, P. (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107[2], 136-140.

Spotorno, A. E., Walker, L. I., Contreras, L. C., Torres, J. C., Fernández Donoso, S., Berríos, S. y PINCHEIRA, J. (1995). Chromosome divergence of *Octodon lunatus* and *Abrocoma bennetti* and the origins of Octodontoidea (Rodentia: Histricognathi). *Revista Chilena de Historia Natural* 68, 227-239.

Stanley, H. P., Kasinsky, H. E. y Bols, N. C. (1984). Meiotic chromatin diminution in a vertebrate, the holocephalan fish *Hydrolagus collie* (Chondrichthyes, Holocephali). *Tissue & cell* 16[2], 203.

Stanyon, R., Yang, F., Cavagna, P., O'Brien, S. J., Bagga, M., Ferguson-Smith, M. A. y Wienberg, J. (1999). Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangement between rat and mouse proceeds ten times faster than between humans and cats. *Cytogenetic and Genome Research* 84[3-4], 150-155.

Stephan, W. (1986). Recombination and the evolution of satellite DNA. *Genet.Res* 47[3], 167-174.

Svartman, M., Stone, G. y Stanyon, R. (2005). Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics* 85[4], 425-430.

Swier, V. J., Bradley, R. D., Rens, W., Elder, F. F. B., Baker, R. J., Swier, V. J., Bradley, R. D., Rens, W., Elder, F. F. et al. (2009). Patterns of Chromosomal Evolution in *Sigmodon*, Evidence from Whole Chromosome Paints. *Cytogenetic and Genome Research* 125[1], 54.

Swofford, D. L. (2003). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10.

Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddel, P. J. y Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic Inference. En D.M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (2 ed., pp. 407-425). Sunderland, MA.: Sinauer Associates.

Taylor, P. J. (2000). Patterns of chromosomal variation in southern African rodents. *Journal of Mammalogy* 81[2], 317-331.

Tobe, S. S., Kitchener, A. C. y Linacre, A. M. T. (2010). Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS ONE* 5[11], e14156.

Tomasco, I. H. y Lessa, E. P. (2007). Phylogeography of the Tuco-Tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNa Variation and its Implication for Chromosomal Differentiation. En D.A. Kelt, E. P. Lessa, J. Salazar-Bravo, & J. L. Patton (Eds.), *The Quintessential Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P.Pearson* (1 ed., pp. 859-882). UC Publications in Zoology.

Tomotani, B. M., Flores, D. E., Tachinardi, P., Paliza, J. D., Oda, G. A. y Valentinuzzi, V. S. (2012). Field and Laboratory Studies Provide Insights into the Meaning of Day-Time Activity in a Subterranean Rodent (*Ctenomys* aff. knighti), the Tuco-Tuco. *PLoS ONE* 7[5], e37918.

Tosi, A. J., Morales, J. C. y Melnick, D. J. (2003). Paternal, maternal, and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys. *Evolution* 57[6], 1419-1435.

Trifonov, V. A., Dementyeva, P. V., Beklemisheva, V. R., Yudkin, D. V., Vorobieva, N. V. y Graphodatsky, A. S. (2010). Supernumerary chromosomes, segmental duplications, and evolution. *Russian Journal of Genetics* 46[9], 1094-1096.

Ugarkovic, D., Durajlija, S. y Plohl, M. (1996). Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. *Journal of Molecular Evolution* 42[3], 350-358.

Ugarkovic, D. y Plohl, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The EMBO journal* 21[22], 5955-5959.

Upham, N. S. y Patterson, B. D. (2012). Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* .

Vassallo, A. I. (1998). Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology* 244[3], 415-427.

Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M. y Vieites, D. R. (2005). Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360[1462], 1859-1868.

Ventura, K., O'Brien, P. C., Yonenaga-Yassuda, Y. y Ferguson-Smith, M. A. (2009). Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four *Akodon* species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research* 17[8], 1063-1078.

Ventura, M., Antonacci, F., Cardone, M. F., Stanyon, R., D'Addabbo, P., Cellamare, A., Sprague, L. J., Eichler, E. E., Archidiacono, N. et al. (2007). Evolutionary formation of new centromeres in macaque. *Science* 316[5822], 243-246.

Vershinin, A. V., Alkhimova, E. G. y Heslop-Harrison, J. S. (1996). Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. *Chromosome Research* 4[7], 517-525.

Verzi, D. H. (2002). Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología neotropical* 9[2], 309-328.

Verzi, D. H., Álvarez, M., Olivares, A. I., Morgan, C. C. y Vassallo, A. I. (2010). Ontogenetic trajectories of key morphofunctional cranial traits in South American subterranean ctenomyid rodents. *Journal of Mammalogy* 91[6], 1508-1516.

Vicari, M. R., Nogaroto, V., Noleto, R. B., Cestari, M. M., Cioffi, M. B., Almeida, M. C., Moreira–Filho, O., Bertollo, L. A. C. y Artoni, R. F. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *Journal of fish biology* 76[5], 1094-1116.

Vitullo, A. D., Roldán, E. R. S. y 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. *Journal of Zoology* 215[4], 675-683.

Volobouev, V. T., Aniskin, V. M., Lecompte, E. y Ducroz, J. F. (2002). Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid rodents inferred from the comparison of cytogenetic and molecular data. *Cytogenetic and Genome Research* 96[1-4], 261-275.

Volobouev, V. T., Gallardo, M. y Graphodatsky, A. S. (2006). Rodent cytogenetics. En S.J. O'Brien, W. G. Nash, J. C. Menninger, & E. C. Holmes (Eds.), *Atlas of Mammalian Karyotypes* (pp. 173-176) John Wiley and Sons.

Walsh, J. B. (1987). Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* 115[3], 553-567.

Wichman, H. A., Payne, C. T., Ryder, O. A., Hamilton, M. J., Maltbie, M. y Baker, R. J. (1991). Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *Journal of Heredity* 82[5], 369-377.

Wiens, J. J. y Penkrot, T. A. (2002). Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic biology* 51[1], 69-91.

Wlasiuk, G., Garza, J. C. y Lessa, E. P. (2003). Genetic and geographic differentiation in the rio negro tuco–tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57[4], 913-926.

Wong, E. H. M., Smith, D. K., Rabadan, R., Peiris, M. y Poon, L. L. (2010). Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. Codon Usage Biases of Influenza Virus. *BMC Evolutionary Biology* 10[253], 1471-2148.

Woods, C. y Kilpatrick, C. (2005). Infraorder Hystricognathi Brandt, 1855. En D.E. Wilson & D. M. Reeder (Eds.), *Mammal species of the world: a taxonomic asnd geographic reference* (3rd ed., pp. 1538-1600). Baltimore: John Hopkins University Press.

Xia, X. y Xie, Z. (2001). DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *J Hered* 92[4], 371-373.

Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. y Wang, Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26[1], 1-7.

Zeitlin, S. G., Baker, N. M., Chapados, B. R., Soutoglou, E., Wang, J. Y. J., Berns, M. W. y Cleveland, D. W. (2009). Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106[37], 15762-15767.

Zenuto, R. R. y Busch, C. (1998). Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (tuco-tuco) in a coastal dune-field in Argentina. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63, 357-367.

Zenuto, R. R., Vassallo, A. I. y Busch, C. (2002). Social and reproductive behavior of the subterranean solitary rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) in a seminatural enclosure. *Revista Chilena de Historia Natural* 75[1], 165-177.

6 ANEXOS

Distancias K2P (⁄) a nivel intrapoblacional, dentro de los clados principales, y entre clados principales del grupo Corrientes, y además a nivel interespecífico (entre los grupos externos y entre estos y el grupo Corrientes).

Intrapoblacional	
Media	.10⁄
Desvío	.19⁄
Min	.00⁄
Máx	.73⁄

Clado	Media	Desvío	Min	Máx
C (Santa Lucía)	0.59⁄	0.31⁄	0.00⁄	1.10⁄
dorbignyi	0.00⁄			
Iberá (*sensu lato*)	0.68⁄	0.27⁄	0.07⁄	1.25⁄
D (Iberá sin Curuzú Laurel)	0.55⁄	0.20⁄	0.07⁄	0.88⁄
F (*perrensi*)	0.15⁄	0.06⁄	0.07⁄	0.29⁄
E (*perrensi* + Sarandicito)	0.66⁄	0.65⁄	0.07⁄	1.54⁄
C. pearsoni	1.66⁄	0.13⁄	1.54⁄	1.77⁄

Entre clados	Media	Desvío	Min	Máx
C (Santa Lucía) - Iberá	1.03⁄	0.16⁄	0.73⁄	1.47⁄
C (Santa Lucía) - F (*perrensi*)	1.49⁄	0.09⁄	1.25⁄	1.69⁄
Iberá-F (perrensi)	1.47⁄	0.13⁄	1.17⁄	1.77⁄
dorbignyi-C (Santa Lucía)	0.85⁄	0.09⁄	0.73⁄	1.02⁄
dorbignyi-Iberá	0.79⁄	0.10⁄	0.66⁄	1.02⁄
dorbignyi-F (perrensi)	1.37⁄	0.07⁄	1.25⁄	1.47⁄

Sarandicito-*F (perrensi)*	1.44/	0.07/	1.32/	1.54/
Sarandicito-*dorbignyi*	1.39/	0.00/	1.39/	1.39/
Sarandicito-*Iberá*	1.47/	0.13/	1.25/	1.69/
Sarandicito-C (Santa Lucía)	1.46/	0.10/	1.32/	1.69/
pearsoni-C (Santa Lucía)	2.53/	0.09/	2.37/	2.75/
pearsoni-Iberá	2.23/	0.10/	1.99/	2.45/
pearsoni-F (*perrensi*)	2.44/	0.07/	2.29/	2.60/

Interespecífico	Media	Desvío	Min	Max
minutus-corrientes	4.16/	0.12/	3.90/	4.45/
torquatus-corrientes	3.32/	0.15/	3.06/	3.68/
rionegrensis-corrientes	5.32/	0.16/	5.01/	5.73/
conoveri-corrientes	11.79/	0.14/	11.56/	12.11/
minutus-torquatus	4.37/			
minutus-rionegrensis	6.82/	0.17/	6.70/	6.94/
minutus-conoveri	11.56/			
pearsoni-minutus	3.89/	0.61/	3.36/	4.45/
pearsoni-torquatus	3.85/	0.20/	3.68/	4.07/
pearsoni-conoveri	11.49/	0.48/	11.11/	12.11/
pearsoni-rionegrensis	5.79/	0.11/	5.65/	5.98/
torquatus-rionegrensis	5.36/	0.17/	5.24/	5.48/
torquatus-conoveri	12.00/			