

**Análisis de polimorfismos en microsatélites para
Ctenomys pearsoni, Lessa & Langguth 1983.**

Natalia Mannise

**Informe de Pasantía, Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación en Genética y Evolución**

**Departamento de Genética
IIBCE- UNIDAD ASOCIADA FACULTAD DE CIENCIAS- Udelar.**

TUTORA: Mag. Mariana Cosse

Tribunal: Mariana Cosse, Susana González, Bettina Tassino.

Julio 2009

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	25
Bibliografía.....	28
Anexos.....	33

Agradecimientos

Mariana Cosse por escuchar mis inquietudes, guiarme, y motivarme a seguir en este camino que recién estoy comenzando.

Gabriel Francescoli quien me permitió realizar esta tesina de grado en el marco del proyecto "Diseño de señales y su posible influencia en la organización socio-reproductiva de los "tucu-tucu" solitarios (*Ctenomys*; Rhodentia: Ctenomyidae)", del cual él es responsable.

Graciela Izquierdo y Gabriel Francescoli que me brindaron datos de campo, apoyo bibliográfico y tiempo para conversar algunas particularidades de estos tucu- tucus.

Ivanna Tomasco, Guillermo D'Elia, Matias Mora, y al Laboratorio de Evolución de Facultad de Ciencias, por colaborar con bibliografía y alícuotas de cebadores.

Susana González quien me recibió en la línea de Investigación Genética de la Conservación del IIBCE, brindo apoyo bibliográfico y otros materiales.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Genética del IIBCE por hacerme sentir parte de este cálido grupo humano.

Mi familia y amigos de siempre.

Resumen

La mayoría de las especies conocidas del género *Ctenomys* son solitarias y viven en sistemas de galerías individuales; en 1985 Pearson y Christie encontraron una especie (*C. sociabilis*) que vive en túneles coloniales. Un continuo de sociabilidad podría existir entre las especies de mamíferos estrictamente solitarias y las sociales. Las técnicas moleculares son herramientas poderosas para describir este continuo, dado que proveen detalles esenciales acerca de patrones de parentesco y dispersión. Para caracterizar las relaciones sociales en roedores subterráneos, se combinan estudios moleculares junto con observaciones comportamentales de animales en vida libre.

En este trabajo se analizó el patrón de amplificación por PCR de 5 loci microsatelitales (Soc 1, 2, 5, 6 y Hai 4) en una población de *C. pearsoni*. Se examinó el grado de polimorfismo de estos loci con la finalidad de evaluar su utilización en estudios de parentesco, y se analizó la estructura poblacional. Los productos de amplificación por PCR fueron corridos en el gel microcapilar ABI 3100. La genotipificación de los 35 individuos muestreados fue realizada con el programa GenMarker V1.75[®]. El análisis de desequilibrio de ligamiento no fue significativo para ningún par de loci y por lo tanto la información de cada locus es independiente. La mayoría de los loci utilizados presentaron un comportamiento neutral ya que se encuentran bajo equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), Soc6 fue el único que presentó una desviación de este equilibrio. El análisis de H-W para esta población resultó no significativo por lo que se asumió que la población está bajo equilibrio. El Contenido de Información Polimórfica (PIC) para cada loci fue alta ó medianamente informativo, mientras que el valor de PIC global fue altamente informativo (0,5909). Los valores de no exclusión parental e identidad, con este conjunto de marcadores, nos permiten determinar parentesco e identificar individuos. Los resultados de Fis revelaron una leve estructuración poblacional. Con los programas Genepop 4,0[®] y GeneClass 2[®] se observó que esta estructuración estaría determinada por los machos. Esto revelaría una dispersión diferencial entre los sexos, siendo las hembras quienes se dispersan con más frecuencia ó mayores distancias.

I- Introducción

Los roedores subterráneos habitan todas las grandes masas continentales, excepto Australia (Lacey *et al.*, 2000). En América del Sur se conocen hasta el momento dos familias: Octodontidae y Ctenomyidae. El género *Ctenomys* (perteneciente a la familia Ctenomyidae) se distribuye entre los 17º y 54º de Latitud Sur, y desde el nivel del mar hasta más de 4000 m de altitud en la región andina de América del Sur (Reig *et al.*, 1990).

Existen diversos motivos por los cuales los tucu-tucus (*Ctenomys*) son ampliamente estudiados. Entre ellos podría destacarse la presencia de más de 60 especies vivientes y el hecho de exhibir uno de los mayores grados de variación cromosómica reportada para mamíferos (Tomasco, 2004). A su vez poseen rasgos característicos debidos a las adaptaciones al ecotopo subterráneo, entre las que se encuentran adaptaciones comportamentales y las específicamente comunicativas. Las necesidades comunicativas de los tucu-tucus se centran especialmente en las señales vinculadas al mantenimiento territorial, al apareamiento y a los cuidados parentales (Francescoli, *com. pers.*).

Si bien la mayoría de las especies conocidas del género *Ctenomys* son solitarias y viven en sistemas de galerías individuales, Pearson y Christie (1985) encontraron una especie (*C. sociabilis*) que vive en túneles coloniales. Podría existir un continuo de sociabilidad entre las especies de mamíferos estrictamente sociales y solitarias. Las técnicas moleculares son herramientas poderosas para describir este continuo, dado que proveen detalles esenciales acerca de patrones de parentesco y dispersión (Kays *et al.*, 2000). Especies de mamíferos que se creían solitarias, y han sido estudiadas por medio de marcadores genéticos y estudios de campo, resultaron ser sociales manteniéndose en grupos estables (Kays *et al.*, 2000). El trabajo realizado en kinkajus

(*Potos flavus*) por Kays *et al.* (2000) muestra la importancia de complementar los análisis moleculares y comportamentales en estudios poblacionales.

Para caracterizar las relaciones sociales en roedores subterráneos, se combinan estudios moleculares junto con observaciones comportamentales de animales en vida libre (Lacey, 2000). La clase de marcador genético ideal debe ser fácil de usar, presentar locus con alelos codominantes que puedan ser determinados de manera certera, y tener elevada variabilidad. Los microsatélites se aproximan notablemente a este ideal (Queller *et al.*, 1993). Estos últimos, son marcadores genéticos de locus simple, que consisten en repetidos en tándem de secuencias entre dos y seis pares de bases de largo, encontrados en genomas procariotas y eucariotas (Zane *et al.*, 2002). Sus alelos difieren en el número de estas unidades repetidas (Queller *et al.*, 1993). Están presentes tanto en regiones codificantes como no codificantes y tienen un elevado grado de polimorfismos (Zane *et al.*, 2002). Parece probable que tales polimorfismos de longitud se originen por eventos de *slippage* (deslizamientos), los cuales se producen durante la replicación del ADN (Schlotterer & Tautz 1992). Dentro de los distintos marcadores genéticos los microsatélites son ampliamente utilizados para analizar la estructura genética de poblaciones debido a su elevado grado de variabilidad intraespecífica (Lacey *et al.*, 1999).

Comprender el modelo mutacional que subyace a la evolución de los microsatélites es de gran importancia para el desarrollo de estadísticos que reflejen adecuadamente la estructuración genética de una población. Dos modelos extremos han sido desarrollados por especialistas en genética de poblaciones: el modelo de alelos infinitos y el de mutaciones *stepwise*. En el modelo de alelos infinitos cada mutación crea una novedad alélica, a una tasa dada, μ . Según esto, los alelos idénticos comparten el mismo ancestro, y por lo tanto son idénticos por descendencia. En el segundo modelo cada mutación crea una variante alélica ya sea por adición o delección de una unidad repetida del microsatélite con una tasa $\mu / 2$. Como consecuencia, los alelos de tamaños diferentes están menos relacionados que aquellos con tamaños

similares. El modelo de alelos infinitos no tiene en cuenta la homoplasia (Balloux & Lugon- Moulin, 2002).

En el caso de los tucu- tucus se han aislado y caracterizado microsatélites para las especie *C. sociabilis* (Lacey *et al.*, 2001) y *C. haigi* (Lacey *et al.*, 1999). A partir de una librería genómica de *C. sociabilis* se obtuvieron 8 microsatélites (Soc 1-8), mientras que 13 microsatélites (Hai 1-13) fueron aislados de una librería genómica de *C. haigi*. Dichos loci fueron utilizados en diversas especies del género mostrando distintos grados de polimorfismo (Tabla I). Estos microsatélites han sido empleados para estudios sobre estructura genética y filogeográfica de diferentes poblaciones, así como también para análisis de parentesco y patrones de dispersión en varias especies de *Ctenomys* (Lacey, 2001; Parada *et al.*, 2003; Wlasiuk *et al.*, 2003; El Jundi *et al.*, 2004; Cutrera *et al.*, 2005; Fernández- Stolz *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009). También han sido útiles para el estudio de zonas híbridas en *C. minutus* (Gava *et al.*, 2004).

Ctenomys pearsoni, Lessa & Langguth 1983, es una de las tres especies del género que habitan nuestro país, junto a *C. rionegrensis* y *C. torquatus*. Las poblaciones de *C. pearsoni* localizadas al este del Río Santa Lucía han sido agrupadas por Altuna & Lessa (1985) en el denominado “complejo *C. pearsoni*” (Fig. 1).

Tabla I: Detalle de características de cada uno de los loci estudiados. Se muestra el tamaño en pares de bases (pb) y /ó número de alelos para cada especie. Los casilleros vacíos representan datos no encontrados en la bibliografía consultada.

Locus	<i>C. sociabilis</i> ¹		<i>C. haigi</i> ^{1, 2}		<i>C. rionegrensis</i> ^{3,4}		<i>C. lami</i> ⁵	<i>C. flamarioni</i> ⁶	<i>C. minutus</i> ⁷	
	Nºde alelos	Tamaño (pb)	Nºde alelos	Tamaño (pb)	Nºde alelos	Tamaño (pb)	Nºde alelos	Nºde alelos	Nºde alelos	Tamaño (pb)
soc 1	2	217, 229	7	225-239						
soc 2	1	93	9	89- 113	3	150-154		7		
soc 3	1	80	3	78, 80, 92	4	129-135		6		
soc 4	3	354, 364, 370	5	350-358						
soc 5	2	232, 250	6	218- 244	1	261				
soc 6	2	195, 181	11	175- 197	5	106-116				
soc 7	2	224, 236	7	225- 245	4	180-280-286- 288				
soc 8	1	114	5	109- 117	2	154-156				
hai 1			8	119- 143						
hai 2	1	132	8	134- 154	5	92- 110	2		5	169- 177
hai 3	1	134	9	116-134	2	163-165	3	6	10	152- 164, 168- 170 y 174
hai 4	3	138- 142	13	118- 146	5	167-181	3	3	12	158- 160, 164- 180 y 184
hai 5	1	155	6	159- 169			2	5	5	203- 211
hai 6			4	128- 146			2	4	15	124- 150 y 170
hai 7			7	187- 203	3	100- 106		5		
hai 8	1	95	10	125- 153	4	102- 112				
hai 9	1	181	3	173- 177	4	102- 112	1	5		
hai 10			3	305- 313			1			
hai 11	2	140, 142	11	132- 154	2	146-154	3			
hai 12	1	92	7	83- 101	3	112-114-122		5	9	123- 147
hai 13			6	139- 153						

¹Lacey, 2001 ; ² Lacey & Maldonado, 1999 ; ³Parada *et al.*, 2003 ; ⁴ Sánchez *et al.*, 2009 ; ⁵ El Jundi *et al.*, 2004; ⁶ Fernández-Stolz *et al.*, 2007; ⁷ Gava *et al.*, 2004.

Si bien en *C. pearsoni* se han realizado estudios citogenéticos(Novello *et al.*, 1990, Novello *et al.*, 1996) y de ADN mitocondrial (Tomasco & Lessa, 2007), hasta el momento no han sido efectuados análisis empleando los microsatélites aislados para *C. sociabilis* (Soc) ó *C. haigi* (Hai). Estudios citogenéticos en el “complejo *C. pearsoni*” revelan variación inter e intrapoblacional (Novello *et al.*, 1990). Análisis de ADN mitocondrial (en *C. pearsoni* y en el complejo *C. pearsoni*) sugieren la existencia de poblaciones estables, en donde deriva génica y migración se encuentran en equilibrio.

Los haplotipos de *C. pearsoni* forman un grupo monofilético apoyado robustamente. Al parecer ha ocupado su rango de distribución y ha mantenido un régimen estable de diferenciación por medio de deriva génica, bajo limitado flujo génico por un tiempo. Los patrones de aislamiento por distancia reflejan tal estabilidad. Esto explicaría su considerable diferenciación genética entre poblaciones, pero también la constitución de éstas como grupo monofilético (Tomasco & Lessa, 2007).

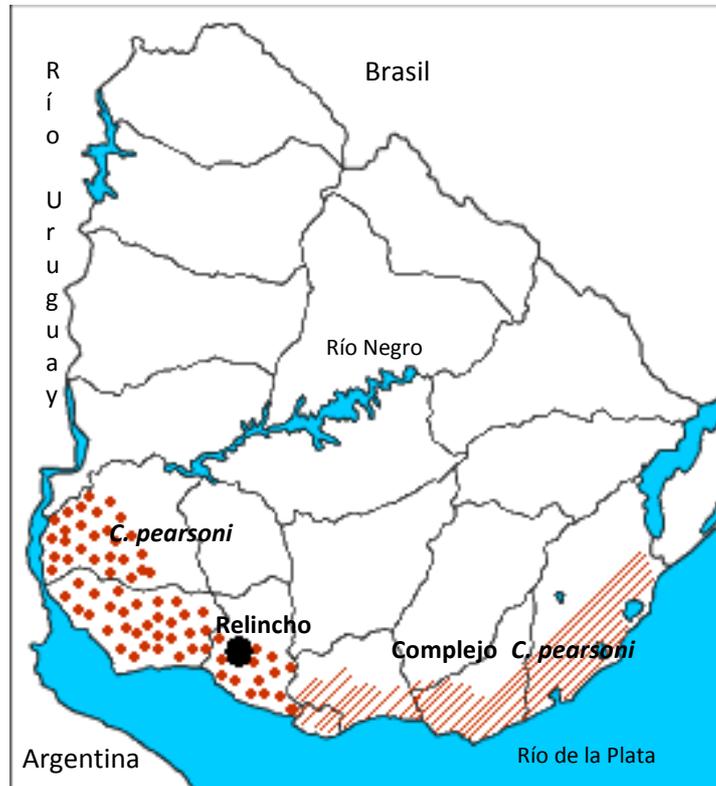


Figura 1: Mapa de Uruguay mostrando la distribución de *C. pearsoni* (●), del "complejo *C. pearsoni*" (//), y la ubicación del establecimiento "El Relincho" (●).

El muestreo genético no invasivo es una forma relativamente nueva para coleccionar datos con gran potencial para biólogos que estudian animales en vida libre. Mediante la extracción de material genético a partir de pelo, fecas, u otras fuentes de ADN, los biólogos pueden recaudar información crítica acerca de poblaciones salvajes sin manipular, capturar, u observar directamente animales (Waits & Paetkau, 2005). En la mayoría de los estudios genéticos realizados en tucu-tucus las extracciones de ADN no fueron a partir de pelos, sino que fueron a partir de muestras de tejidos (Lacey, 2001; Parada *et al.*, 2003; Wlasiuk *et al.*, 2003; El Jundi *et al.*, 2004; Cutrera *et al.*, 2005; Fernández- Stolz *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007; Tomasco & Lessa, 2007; Sánchez *et al.*, 2009).

Hipótesis

Los locus microsatelitales Soc 1, 2, 5, 6, y Hai 4 presentan un grado de polimorfismo tal para la población de *Ctenomys pearsoni* del establecimiento “El Relincho”, que en conjunto constituyen una buena herramienta para estudios de parentesco y estructura poblacional.

Objetivo General

Analizar los patrones de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de una serie de locus de microsatélites en la especie *Ctenomys pearsoni*, y evaluar su potencial para determinar relaciones de parentesco entre individuos, así como el análisis de la estructura genética de una población.

Objetivos específicos

- Extracción de ADN total a partir de muestras biológicas de pelo de individuos capturados.
- Amplificación por PCR de 5 loci de microsatélites desarrollados para las especies *C. sociabilis* y *C. haigi*, en ejemplares de *C. pearsoni*.
- Examinar el grado de polimorfismo de estos loci para *C. pearsoni*.
- Analizar con este conjunto de microsatélites las características de la estructura genética de la población de “El Relincho”.

II- Materiales y métodos.

Esta pasantía de grado se encuentra en el marco del proyecto "Diseño de señales y su posible influencia en la organización socio-reproductiva de los tucu-tucus solitarios (*Ctenomys*; Rhodentia: Ctenomyidae)", Responsable: Gabriel Francescoli. La población de *C. pearsoni* estudiada en este proyecto está ubicada en el establecimiento "El Relincho" (34° 20'S 56° 58'W), Depto. San José (Fig. 1).

Obtención de muestras biológicas

En el marco del proyecto anteriormente mencionado se realizaron entre junio 2005 y julio 2006, una serie de capturas de distintos ejemplares (n=35) de la población "El Relincho". Se utilizaron trampas Oneida Victor Nº 0 amortiguadas con espuma de poliuretano y goma, para minimizar daños de captura. Se colectaron pelos que fueron extraídos con bulbos pilosos y conservados en alcohol 95º hasta el momento de la extracción de ADN. Luego de este procedimiento los animales fueron liberados en las galerías donde fueron capturados. En el Anexo 1 se encuentra el listado de los ejemplares muestreados, indicando sexo y fecha de captura.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN total siguiendo el protocolo Medrano *et al.* (1990), con modificaciones (Anexo 2).

El ADN extraído fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa 1% (Amresco®) marcado con bromuro de etidio y se establecieron así primariamente las condiciones cuali y cuantitativas del ADN. Posteriormente se cuantificó y observó la pureza del ADN mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000). El software del espectrofotómetro estima la concentración de ADN utilizando la ecuación de Beer-Lambert, la cual correlaciona la absorbancia calculada con la concentración (Termo

Fisher Scientific, 2008). En base a la concentración de ADN obtenido, se realizaron diluciones de manera tal de obtener una concentración final de 100ng/ul de ADN molde.

Se observó la pureza del ADN a partir del cociente entre las medidas de absorbancia a 260 nm (A260nm) y a 280nm (A280nm). Se consideran muestras de ADN genómico puras si esta relación queda comprendida entre 1,8 y 1,9 aproximadamente.

Las extracciones de ADN fueron depositadas en la colección de la Unidad de Genética de la Conservación, Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se emplearon una serie de loci microsatelitales desarrollados para *C. sociabilis* (Soc 1, 2 5 y 6) y *C. haig* (Hai 4). Los cebadores *forward* utilizados se encontraban marcados con fluorocromos (Tabla II).

Se desarrolló un protocolo en base a Lacey (2001) y Cosse *et al.*, (2007). La reacción de PCR consistió en un volumen de reacción de 10µl, conteniendo 10ng de ADN, 0,2 µM de cada cebador, 0,2mM de dNTP, 1X Taq buffer con KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µg/µl de BSA y 0,75 unidades de Taq polimerasa (Fermentas®).

Las condiciones del termociclado fueron 94° C durante 5 minutos, seguido de 34 ciclos de 94° C durante 30 segundos, temperatura de anidamiento durante 30 segundos (temperatura de anidamiento en Tabla II), y extensión a 72° C durante 45 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72° C.

Tabla II: Temperaturas de anidamiento (Ta) de los cebadores utilizados y fluorocromos con los que fueron marcados los mismos. Tamaños esperados de los fragmentos amplificados con los distintos cebadores.

Locus	Fluorocromo	Ta (°C)	Tamaño esperado
Soc1	Hex	58	217- 239
Soc2	Fam	58	89- 154
Soc5	Tet	62	218- 261
Soc6	Hex	62	106- 197
Hai4	Fam	58	118- 181

Se diseñó un PCR multiplex en base a la temperatura de anidamiento, el fluorocromo con que estaban marcados los cebadores, y el tamaño de estos loci microsatelitales en otras especies. El multiplex empleado fue Soc1-Soc2.

Se comprobó el éxito de amplificación a través de la migración de 4 µl de productos de PCR en gel de agarosa al 2% (Amresco®). La corrida fue detenida luego de haber migrado 2/3 del gel.

Análisis de los microsatélites

GENOTIPIFICACIÓN

Los productos de amplificación fueron corridos en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems). Para esto se utilizaron 2µl del producto de PCR, adicionándole 0.3µl del marcador de peso molecular LIZ 500, y 8 µl de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems). La migración fue llevada a cabo en capilares de 36 cm de largo, empleándose el polímero POP7 (Applied Biosystems) bajo los siguientes parámetros: 50mA, 15.0 KVolts, 60°C por 1200 segundos.

La asignación de alelos para cada locus se realizó con el programa GenMarker V1.75®, empleando el estándar GS5001_old.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

El programa GENEPOP fue utilizado para testear las hipótesis de desequilibrio de ligamiento y equilibrio Hardy- Weinberg (H-W) para cada uno de los loci analizados (Raymond & Rousset, 1995). El programa realiza un test de X^2 para establecer el nivel de significación estadística en las diferencias existentes entre los valores observados y esperados para las hipótesis planteadas. Consideramos valores estadísticamente significativos aquellos valores de probabilidad ó $p < 0,05$, teniendo en cuenta los grados de libertad (df) (Weir, 1996). En el caso del desequilibrio de ligamiento cuando $p > 0,05$ se considera que los locus no están ligados, mientras que para el equilibrio H-W cuando $p > 0,05$ el marcador molecular tendría un comportamiento neutral. A su vez el software analiza el equilibrio H-W para el conjunto de loci utilizados, de esta manera se determina si la población está en equilibrio H-W ($p > 0,05$) ó no ($p < 0,05$).

En el test de ligamiento entre loci las distintas combinaciones alélicas (entre estos) se pueden generar por segregación independiente o pueden estar determinadas por patrones de ligamiento entre los loci. Se denomina equilibrio de ligamiento cuando las combinaciones alélicas de diferentes loci son logradas por azar (Hartl & Clarck, 1989).

Para analizar las frecuencias alélicas y el contenido de información polimórfico (PIC), se utilizo el programa Cervus 3.0[®]. La fórmula empleada por éste para calcular el PIC es aquella descrita por Botstein *et al.*, 1980 (ecuación 1).

(1)

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Siendo p_i y p_j las frecuencias alélicas para los n alelos de un locus.

Aquellos loci cuyo $PIC > 0,5$ se consideran altamente informativos, razonablemente informativos en los que $0,5 < PIC < 0,25$ y débilmente informativos $PIC < 0,25$ (Botstein *et al.*, 1980).

La probabilidad de no exclusión parental es la probabilidad de no excluir del análisis de parentesco uno (NE-1P, NE-2P) o un par (NE-PP) de individuos seleccionados al azar que no están emparentados con el individuo en cuestión para un locus dado (Marshall, 1998-2007; Kalinowsky *et al.*, 2007).

En el análisis de identidad se calcula la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar tengan el mismo genotipo. Aunque puede ser calculada de 2 maneras diferentes, en la fórmula básica se asume que los dos individuos no están relacionados (ecuación 2, tomado de Marshall, 1998- 2007; Waits *et al.*, 2001).

(2)

$$P_{(ID)} = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

Las probabilidades de no exclusión parental (NE-1P, NE-2P, NE-PP) y la probabilidad combinada de no exclusión para la identidad ($P_{(ID)}$) fueron calculadas con el software Cervus 3.0[®]. Durante el análisis de las frecuencias alélicas, este programa calcula las probabilidades de no exclusión para cada locus y también las probabilidades combinadas de no exclusión para el conjunto de locus (Marshall, 1998- 2007).

El coeficiente de endogamia intrapoblacional F_{IS} W&C fue calculado con GENEPOP (ecuación 3, Weir & Cockerham, 1984). El índice de fijación o coeficiente de endogamia (F_{IS}) representa la desviación de los genotipos del equilibrio H-W dentro de una población. Puede tener valores que van desde -1 (exceso de heterocigotas) hasta 1 (exceso de homocigotas) (Avice, 1994).

(3)

$$F_{IS} = 1 - H_o / H_s$$

Siendo H_o la heterocigosidad observada y H_s la esperada en condiciones de equilibrio H-W. Cuando $F_{IS}=0$ existe apareamiento al azar ó panmixia (Weir, 1996).

Basándonos en la distribución espacial de los individuos en el campo fueron definidas tres “subpoblaciones” (Fig. 2). Esta subestructuración fue analizada para el conjunto de locus a través del test exacto de diferenciación genotípica, utilizando el software Genepop V4[®]. La hipótesis nula del test asume que los genotipos tienen la misma distribución en toda la población, y esta es evaluada a través de X^2 (Rousset, 2009). Este test de X^2 fue calculado para 3 subpoblaciones (1, 2 y 3) y 2 subpoblaciones (considerando a las subpoblaciones 1 y 2 como una misma subpoblación, denominada subpoblacion1-2 y a la subpoblación 3 separada de estas). El análisis de diferenciación genotípica fue calculado también considerando los individuos machos y hembras por separado.

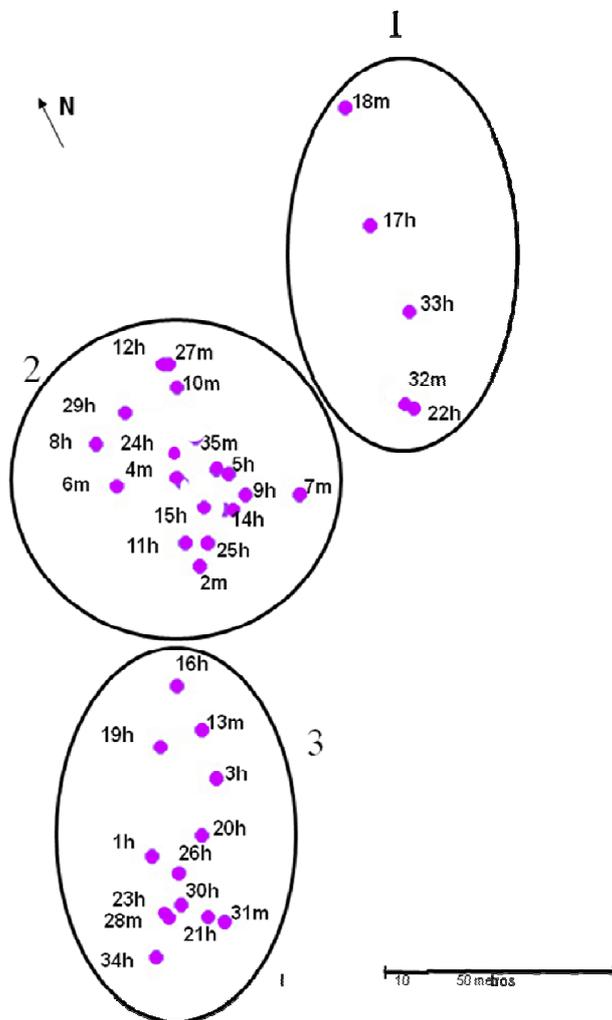


Figura 2: Esquema de la distribución espacial de los individuos en la población, indicándose el número del individuo y el sexo (m para macho y h para hembra). Se muestran las 3 subpoblaciones consideradas en base a la distribución espacial de los individuos en el campo.

La probabilidad de que sea correcta la asignación de un individuo a una subpoblación fue calculada para 3 y 2 subpoblaciones, y en el último caso se calculó para machos y hembras separadamente. Para dicho estudio se empleó el programa computacional GeneClass 2[®] (Piry *et al.*, 2004) bajo el criterio computacional de Rannala & Mountain (1997), y el algoritmo de simulación para la probabilidad computacional de Rannala & Mountain (1997). La hipótesis nula que estos emplean asume que el individuo no es un inmigrante (Rannala & Mountain, 1997).

III- Resultados.

Extracción de ADN y Amplificación por PCR

El protocolo utilizado para la extracción de ADN dio muy buenos resultados. En la Figura 3 puede observarse una corrida en gel de agarosa 1% del ADN extraído. El ADN es visualizado por bandas como las que aparecen en la Fig. 3.

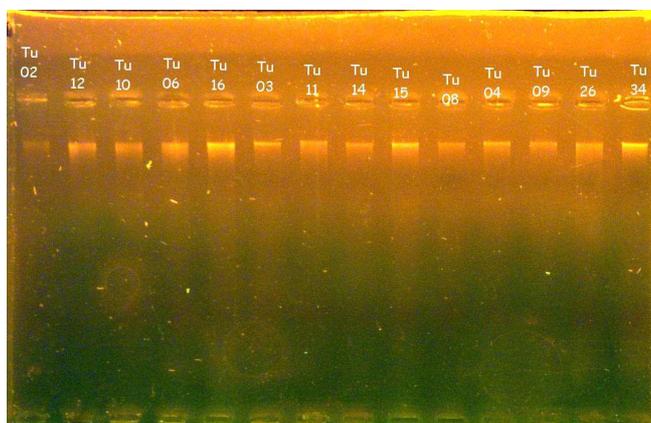


Figura 3: Fotografía de gel de agarosa 1%. El orden de cargado de las muestras de ADN se muestra en la figura.

La concentración y pureza del ADN medida por espectrofotometría fue variable (Tabla III). La relación A_{260}/A_{280} de las muestras estudiadas están comprendida entre 1,19 y 1,77, siendo este último valor el más próximo a los estándar de pureza (Tabla III).

Tabla III: Medidas de absorbancia registradas por espectrofotometría a λ 260 y 280 nm, y su relación (A260/A280). Concentración de las muestras (ng/ μ l) estimadas por el software del NanoDrop1000.

Muestra	(ng/ μ l)	A260nm	A280nm	A260/A280
Tu01	140.39	2.808	2.113	1.33
Tu02	131.87	2.637	2.003	1.32
Tu03	101.09	2.022	1.514	1.34
Tu04	111.45	2.229	1.643	1.36
Tu05	38.31	0.766	0.530	1.45
Tu06	232.60	4.652	3.521	1.32
Tu07	112.68	2.254	1.703	1.32
Tu08	115.94	2.319	1.739	1.33
Tu09	126.64	2.533	1.937	1.31
Tu10	203.80	4.076	3.071	1.33
Tu11	91.21	1.824	1.341	1.36
Tu12	194.55	3.891	2.888	1.35
Tu13	398.99	7.980	6.028	1.32
Tu14	248.18	4.964	3.840	1.29
Tu15	311.87	6.237	4.777	1.31
Tu16	303.85	6.077	4.735	1.28
Tu17	214.10	4.282	3.274	1.31
Tu18	233.80	4.676	3.537	1.32
Tu19	120.49	2.410	1.821	1.32
Tu20	184.74	3.695	2.744	1.35
Tu21	498.67	9.973	7.915	1.26
Tu22	484.99	9.700	7.688	1.26
Tu23	169.79	3.396	2.561	1.33
Tu24	468.39	9.368	7.866	1.19
Tu25	459.74	9.195	7.243	1.27
Tu26	143.51	2.870	2.170	1.32
Tu27	463.34	9.267	6.326	1.46
Tu28	413.82	8.276	6.263	1.32
Tu29	204.80	4.096	2.921	1.40
Tu30	202.80	4.056	3.191	1.27
Tu31	680.78	13.616	7.679	1.77
Tu32	403.75	8.075	6.235	1.30
Tu33	112.63	2.253	1.887	1.19
Tu34	369.43	7.389	5.478	1.35
Tu35	438.60	8.772	6.807	1.29

Las amplificaciones fueron exitosas tanto para PCR multiplex como para simples. En la Fig. 4 se observan dos gels de agarosa 2% (izquierda y derecha) a los cuales se les tomo la misma fotografía a pesar de no haber sido corridos en

simultáneo. Se muestran las distancias que habrían migrado muestras de 100 y 200 pares de bases (pb) para poder estimar el tamaño de los productos de PCR corridos.

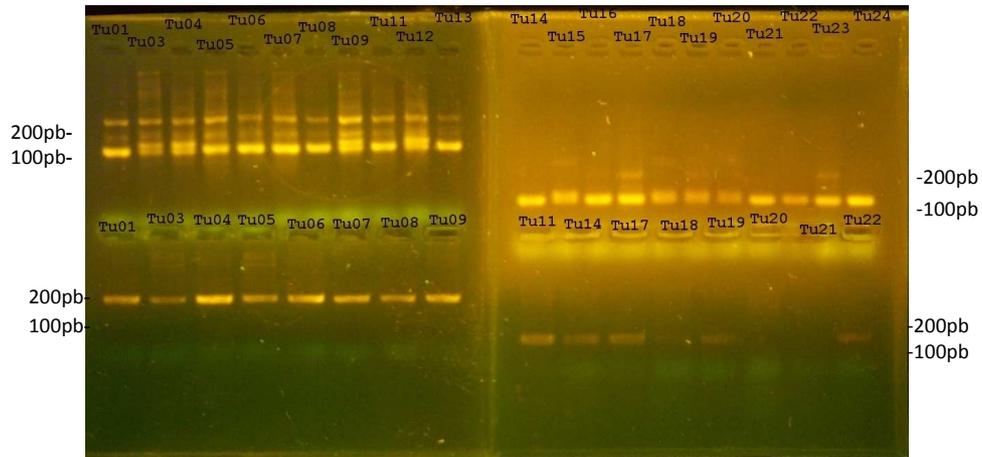


Figura 4: Fotografía de gel de agarosa 2%. En la parte superior se corrió el PCR multiplex soc1- soc2, y en la inferior el PCR simple hai4. En la figura se muestra el orden de sembrado de los productos de PCR para las distintas muestras. A los lados aparecen las referencias de 100 y 200 pares de bases (100pb y 200pb).

Análisis de microsatélites

GENOTIPIFICACIÓN

Se determinaron los alelos para cada individuo en los distintos loci (Anexo 3) examinando la forma y el patrón de picos obtenido de los fragmentos corridos (Fig. 5). En el caso de los multiplex se observó cierto ruido en el diagrama de picos, pero éste no interfirió en la lectura de los mismos.

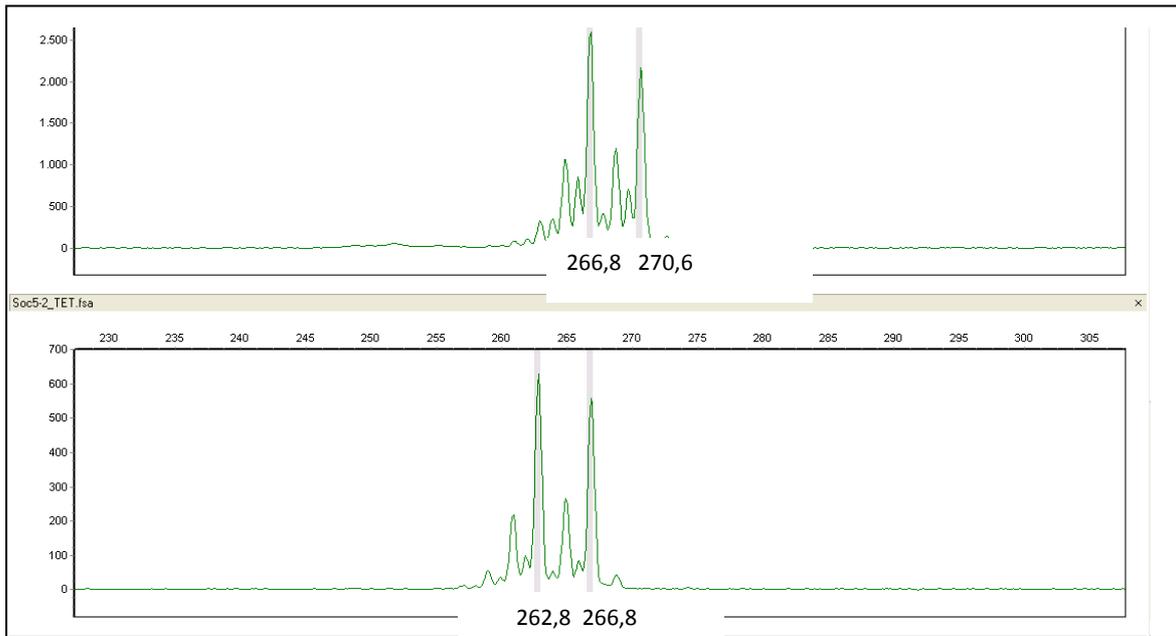


Figura 5: Imagen extraída del programa GenMarker V1.75[®]. Se observa el patrón de picos obtenido para el locus Soc 5 en dos muestras: Tu 02 en la parte superior (alelos 266/270) y Tu 10 en la inferior (262/266).

CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

Los loci analizados resultaron ser polimórficos, siendo variable el número de alelos encontrados en cada caso (Tabla IV, frecuencias alélicas en Anexo 4).

El análisis de desequilibrio de ligamiento no fue significativo para ningún par de loci, de manera que éstos segregan de manera independiente (Tabla V). Los valores de p y desvíos estándar del test de X^2 para el equilibrio H-W en cada locus figuran en la Tabla IV. La mayoría de los loci utilizados mostraron estar en equilibrio H-W, sólo uno de ellos no lo estaba, Soc 6. Por lo tanto éste es el único que no tendría un comportamiento neutral. Se calculó el test de equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) por el método de Fisher, tanto para el conjunto de 5 loci utilizados como para el conjunto de aquellos que mostraron un comportamiento neutral (en el cual se excluyó Soc 6). Para el conjunto de 5 loci el test ($X^2 = 20,4776$) tuvo una probabilidad de 0,0250 con 10 grados de libertad. Por otra parte para el conjunto de loci que demostraron un

comportamiento neutral, se obtuvo valor de $p=0,2019$ con 8 grados de libertad ($\chi^2=10,9967$).

Los loci Soc1, Soc2, Soc5 y Hai4 resultaron ser altamente informativos ($PIC > 0,5$) mientras que Soc6 lo fue razonablemente ($0,5 < PIC < 0,25$). El valor global de PIC fue 0,5909. Las probabilidades globales de no exclusión para el primer (NE-1P) y segundo (NE-2P) padre fueron 0,252 y 0,080 respectivamente, mientras que para el par parental (NE-PP) fue 0,015. Se calculó la probabilidad combinada global de no exclusión para la identidad ($P_{(ID)} = 0,0001$). El promedio del Fis para el conjunto de locus fue 0,031. En la Tabla IV se resumen los valores de PIC, heterocigosidad, Fis, probabilidades de no exclusión parental e identidad, para cada uno de los locus analizados.

Tabla IV: Se exhiben el número de individuos analizados (N) y el de alelos (k) para cada locus. También se muestran sus PIC, probabilidades de no exclusión tanto para el primer (NE-1P) y segundo (NE-2P) padre como para el par parental (NE-PP) y para la identidad ($P_{(ID)}$). Las heterocigosidades observadas (H (O)) y esperadas (H (E)) se presentan en la tabla. Los valores de p y desvíos estándar (S.E) para el test de χ^2 para el equilibrio Hardy-Weinberg fueron obtenidos para cada locus, al igual que los valores de Fis (W&C).

Locus	N	k	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	$P_{(ID)}$	H(O)	H (E)	P	S.E	Fis (W&C)
Soc 1	35	5	0.625	0.742	0.575	0.398	0.157	21	24,8116	0.3338	0.0127	+0.156
Soc 2	34	4	0.556	0.800	0.652	0.496	0.210	21	21,4030	0.6479	0.0063	+0.019
Hai 4	34	6	0.696	0.667	0.487	0.298	0.109	24	25,9851	0.0819	0.0065	+0.077
Soc 5	33	5	0.583	0.774	0.620	0.452	0.189	26	22,6462	0.1825	0.0147	-0.151
Soc 6	32	4	0.495	0.825	0.704	0.560	0.262	18	19,0159	0.0111	0.0014	+0.054

Tabla V: Resultados del test χ^2 (chi cuadrado), grados de libertad (df) y valores de p para el desequilibrio de ligamiento, entre los pares de locus.

Locus pair	χ^2	df	P
Soc1 & Soc2	0.181	2	0.913
Soc1 & Hai4	1.749	2	0.417
Soc2 & Hai4	1.851	2	0.396
Soc1 & Soc5	2.643	2	0.267
Soc2 & Soc5	0.641	2	0.726
Hai4 & Soc5	3.165	2	0.205
Soc1 & Soc6	0.621	2	0.733
Soc2 & Soc6	1.516	2	0.469
Hai4 & Soc6	1.024	2	0.599
Soc5 & Soc6	0.890	2	0.641

En el análisis de subestructuración poblacional, se observó que las subpoblaciones 2 y 3 son diferentes, mientras que la 1 no se diferencia de la 2 ni de la 3 (Tabla VI). Cuando se agrupan en una misma subpoblación los individuos de las subpoblaciones 1 y 2 (SPob1-2) se observa que esta es diferente a la subpoblación 3 tanto para los machos como para el total de individuos, no observándose diferencias para las hembras (Tabla VI).

Tabla VI: Se muestran los valores del test de χ^2 , las probabilidades (p) y grados de libertad para los distintos pares de subpoblaciones. Se analizaron machos y hembras en conjunto (m y h) en todos los pares de subpoblaciones, mientras que para la comparación de la subpoblacion1-2(SPob1-2) con la subpoblacion 3 (SPob 3) también lo fueron por separado. SPob significa subpoblación.

Sexo	Pares de subpob.	χ^2	df	p
m y h	SPob2 & SPob3	2. 2593	10	0.0123
m y h	SPob2 & SPob1	3. 2768	10	0.9741
m y h	SPob3 & SPob 1	3. 7509	10	0.9578
m y h	SPob1-2 & SPob3	2. 1587	10	0.0173
m	SPob1-2 & SPob3	24. 1606	10	0.0071
h	SPob1-2 & SPob3	5. 5839	10	0.8489

La probabilidad de que la asignación de un individuo a una subpoblación sea correcta fue calculada para 3 subpoblaciones (subpoblaciones 1, 2 y 3) obteniéndose una asignación correcta del 57, 1%. Cuando fue calculada para 2 subpoblaciones (subpoblación 1-2 y subpoblación 3) este fue del 71, 4% para ambos sexos, 100% para machos y 52, 2% para hembras.

IV- Discusión

Las muestras de ADN (a excepción de Tu 31) a pesar de que estaban por debajo de los estándares de pureza, mostraron buenos resultados en la amplificación por PCR. Por esta razón podemos afirmar que tanto el protocolo empleado para la extracción de ADN a partir de muestras de pelo, así como el utilizado para la reacción de PCR fueron exitosos.

Los valores de p del test X^2 para desequilibrio de ligamiento no fueron estadísticamente significativos para los distintos pares de locus. De los 5 loci analizados ninguno se encuentra en desequilibrio de ligamiento sino que están en equilibrio y por lo tanto su segregación es azarosa en la formación de los gametos. Esto significa que la información de cada locus es independiente.

Aunque 4 de los 5 marcadores (Soc1, como Soc2, Soc5 y Hai 4) se encuentran bajo equilibrio H-W, Soc6 presentó una desviación de este equilibrio por lo cual nos planteamos varias alternativas para explicarlo. Una de ellas podría ser que este locus se encuentre asociado a un carácter sometido a alguna fuerza de selección. Debido a que en otras especies de *Ctenomys* dicho locus mostró un comportamiento neutral (Lacey, 2001; Wlasiuk *et al.*, 2003), seguramente esta explicación no se ajuste a esta situación. Por otro lado, los loci microsatelitales pueden presentar alelos nulos. Cuando un alelo de cierto locus sufre una mutación en la región flanqueante complementaria al cebador, puede reducirse el éxito en la amplificación de ese alelo específico. De esta manera individuos que eran heterocigotos con uno de estos alelos, son genotipados como homocigotos para el alelo no mutado y este alelo mutante es denominado alelo nulo (Chapuis & Estoup, 2007). El resultado de la existencia de alelos nulos es un exceso de homocigotos para el locus en cuestión. Los alelos nulos pueden ser detectados en estudios poblacionales mediante el análisis cuidadoso de las proporciones para H-W cuando el déficit de heterocigotos no tiene otro origen (Chapuis & Estoup, 2007). Errores de muestreo podrían haber sesgado este resultado

en Soc 6. Si éste fuera el caso, para corregirlo deberíamos ampliar el número de individuos analizados realizando un mayor esfuerzo de muestreo.

Cuando se analizó el equilibrio H-W para la población con el conjunto de loci analizados, se obtuvieron valores de probabilidad significativos y por lo tanto la población no se encontraría en equilibrio de H-W. Sin embargo al repetir este análisis excluyendo Soc6 (locus que no estaría en equilibrio), se obtienen valores de probabilidad no significativos y podemos asumir que la población se encuentra bajo equilibrio y por lo tanto Soc6 estaría influyendo en la desviación del equilibrio observada en el primer análisis. De manera que esta variación observada en la población se debe al sesgo generado por el locus Soc 6. Consideramos que esto podría ser resuelto al aumentar el número de individuos estudiados. Cuando una población se encuentra bajo equilibrio H-W decimos que es panmítica, esto es que no hay migración, selección y que los apareamientos ocurren al azar (Hartl & Clark, 1989).

Los valores de PIC, tanto para la mayoría de los loci como para el global, resultaron ser altamente informativos. Soc6 presentó un valor de 0,495 y por lo tanto es razonablemente informativo ya que $0,5 < PIC < 0,25$. De esta manera podríamos afirmar que el contenido polimórfico de los loci empleados sería apropiado para realizar estudios poblacionales y de parentesco.

Los valores obtenidos para las probabilidades combinadas de no exclusión parental (NE-1P, NE-2P Y NE-PP) nos proveen una elevada confiabilidad cuando asignemos paternidad con los 5 loci. La probabilidad combinada de no exclusión para la identidad nos permitirá identificar individuos.

Los resultados de Fis para los distintos loci así como también su promedio fueron levemente diferentes de cero. Esto nos permite establecer que existe cierta estructuración poblacional. Las poblaciones de la mayoría de las especies, ó quizá todas, tienen cierto grado de estructuración, el cual puede ser debido a una variedad de agentes mutuamente no exclusivos. En genética de poblaciones las sub-poblaciones son consideradas el nivel más pequeño de estructuración poblacional, también

llamado *deme*. Fis no solo nos brinda información sobre de apareamiento al azar, sino que también nos indica si en nuestra muestra hemos incluido uno ó más *demes*. Si las muestras pertenecen a un mismo *deme* no habrá ningún cambio significativo en el valor de Fis. Sin embargo, cuando es incluida una muestra perteneciente a una unidad de apareamiento diferente ocurrirá un considerable aumento de Fis (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

A través del análisis de estructuración poblacional se pudo comprobar que existen 2 subpoblaciones y las mismas estarían determinadas por los machos. Las subpoblaciones que se pudieron distinguir fueron la subpoblación 1-2 y la subpoblación 3. Estos resultados concuerdan con los Fis obtenidos, revelando una leve estructuración poblacional. La diferencia observada entre los sexos, podría estar indicando que las hembras se mueven con más frecuencia o más lejos, por lo tanto los machos presentarían una mayor diferenciación entre las subpoblaciones y no así las hembras. A diferencia de esto, en *C. talarum* son los machos los que presentan mayor dispersión (Cutrera *et al.*, 2005). Esta comparación refleja las diferencias existentes entre las especies de *Ctenomys*.

CONCLUSIONES FINALES

Los 5 loci estudiados aquí son considerados apropiados para estudios de parentesco ya que resultaron alta ó razonablemente polimórficos, y sus probabilidades de no exclusión permitirán identificación individual y de paternidad.

Los resultados revelaron que existen dos subpoblaciones (subpoblación 1-2 y subpoblación 3), determinadas fundamentalmente por la composición genotípica de los machos analizados. Por lo cual se observó una leve estructuración poblacional. La información genética y de microsatelites obtenida sugiere un comportamiento de dispersión diferencial entre los sexos. La diferenciación genética entre los machos demuestra que estos podrían ser filopátricos, siendo las hembras quienes se dispersarían más.

V- Bibliografía:

- Altuna, C. A. & Lessa, E. P. 1985. Penial morphology in uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *J. Mamm.*, 66: 383- 389. Citado por: Altuna, C. A., Francescoli, G., Tassino, B., Izquierdo, G. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología*, 7: 47- 54.
- Altuna, C. A., Francescoli, G. & Izquierdo, G. 1991. Copulatory pattern of *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) from Balneario Solís, Uruguay. *Mammalia*, nº2: 316- 318.
- Altuna, C. A. 1991. Microclima de cuevas y comportamientos de homeostasis en una población del grupo *Ctenomys pearsoni* del Uruguay (Rodentia, Octodontidae). *Bol. Soc. Zool. Uruguay*. 2ª época, 6: 35- 46.
- Altuna, C. A., Francescoli, G., Tassino, B., Izquierdo, G. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología*, 7: 47- 54.
- Awise, J. C. 1994. *Molecular Markers. Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York, NY. Citado por: Sánchez, L. 2009. ¿Es *Ctenomys rionegrensis* una especie estrictamente solitaria? Evaluación de las relaciones de parentesco de individuos procedentes de capturas múltiples. Licenciatura en Biología. Informe de pasantía. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo. (Tutor: Ivanna Tomasco).
- Balloux, F. & N. Lugon- Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155- 165.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Busch, C., Antinuchi, C. D., Del Valle, C. J., Kittlein, M. J., Malizia, A. I., Vasallo, A. I., Zenuto, R. R. 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. Pág: 183- 226 en Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N. Eds. *Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Chapuis, M. P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation population differentiation. *Molecular Biology Evolution*, 24(3): 621- 631.

- Cosse, M., González, S., Maldonado, J. 2007. Cross- amplification of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genetics and Molecular Research*, 6 (4): 1118-1122.
- Cutrerera, A. P., Lacey, E. A., Busch, C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology*, 14: 2511- 2523.
- D'Elia, G., Lessa, E. P., Cook, J. A. 1998. Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *Z. Säugeterkunde*, 63: 285- 296.
- El Jundi, T. A. R. J. & Freitas, T. R. O. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia- Ctenomyidae). *Hereditas*, 140: 18- 23.
- Fernández- Slotz, G. P., Slotz, J. F. B., 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.
- Garza, J. C., Williamson, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305- 318.
- Gava, A., Freitas T. R. O. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 85 (6): 1201- 1206.
- Hartl, D. L & Clark, A. G. 1989. *Principles of Population Genetics*. 2 ed. Sinauer Associates, Sanderland, Massachusetts.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099- 1106.
- Kays, R.W., Gittleman, J. L., Wayne, R. K. 2000. Microsatellite analysis of kinkajou social organization. *Molecular Ecology*, 9: 743- 751.
- Lacey, E. A., Maldonado, J. E. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco- tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology*, 8: 1754- 1756.
- Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N. 2000. Introducción. Pág: 2- 14 en Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N. Eds. *Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Lacey, E. A., 2000. Spatial and Social System of Subterranean Rodents. Pág: 257- 294 en Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N. Eds. *Life Underground: the Biology of the Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, USA.

- Lacey, E. A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco- tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity*, 86: 628- 637.
- Lannguth, A., Abella, A. 1970. Las especies uruguayas del género *Ctenomys* (Rodentia- Octodontidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 129: 1- 20.
- Lessa E. P., Lannguth, A. 1983. *Ctenomys pearsoni*, N. SP. (Rodentia, Octodontidae), del Uruguay. *Resúmenes y Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales*: 86- 88.
- Lessa, E. P. & Cook, J. A. 1998. The Molecular Phylogenetics of Tuco- Tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) Suggests an Early Burst of Speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9 (1): 88- 99.
- Lessa, E. P. 2005. Guía de estudios de genética de poblaciones. Laboratorio de Evolución. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. & Pemberton, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639- 655.
- Marshall, T. 1998- 2007. Cervus 3.0 help. Field Genetics Ltd. Copyright Tristan Marshall.
- Mora, M. S., Lessa, E. P., Cutrera, A. P., Kittlein, M. J., Vasallo, A. I. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco- tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and hábitat- specific histories. *Molecular Ecology*, 16: 3453- 3465.
- Novello, A., Lessa, E., Sambarino, C., Monzón, S. 1990. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Uruguay. *Z. Säugetierkunde*, 55: 43- 48.
- Novello, A., Cortinas, M. N., Suárez, M. & Musto, H. 1996. Cytogenetics and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Chromosome Research*, 4: 335- 339.
- Parada, A. 2003. Análisis de parentesco dentro de una población de *Ctenomys rionegrenses* (Rodentia: Octodontidae) polimórfica en el color del pelaje, empleando microsatélites. Licenciatura en Biología. Informe de pasantía. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo. (Tutores: G. Wlasiuk & E. Lessa)
- Pearson, O. P. y M. I. Christie. 1985. Los tuco-tucos (género *Ctenomys*) de los Parques Nacionales Lenin y Nahuel Huapi, Argentina. *Hist. Nat., Corrientes*, 5 (37): 337- 343. Citado por: Altuna, C. A., Francescoli, G. & Izquierdo, G. 1991. Copulatory pattern of *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) from Balneario Solís, Uruguay. *Mammalia*, nº2: 316- 318.

- Piry S, Alapetite A, Cornuet, J.-M., Paetkau D, Baudouin, L., Estoup, A. (2004) GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C. R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 285- 288.
- Rannala, B. & Mountain, J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Sci. USA*, 94: 9197- 9221.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Heredity*, 86: 248- 249.
- Reig, O. A., Busch, C., Ortells, M. O., Contreras, J. R. 1990. An overview of evolution, systematic, population biology and cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pág. 71- 96. Nevo, E. & Reig, O. A. Eds. en *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular levels*. Alan, R. Liss, New York.
- Rousset, F. 2009. Genepop 4.0 for Windows and Linux.
- Sánchez, L. 2009. ¿Es *Ctenomys rionegrensis* una especie estrictamente solitaria? Evaluación de las relaciones de parentesco de individuos procedentes de capturas múltiples. Licenciatura en Biología. Informe de pasantía. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo. (Tutor: Ivanna Tomasco).
- Schlötter, C., Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211- 215.
- Tassino, B. 2006. Estructura poblacional y biología reproductiva del tucu- tucu de Río Negro (*Ctenomys rionegrensis*): relaciones entre el comportamiento y los procesos evolutivos. Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Montevideo, Uruguay.
- Termo Fisher Scientific Inc. 2008. Termo Scientific, Nanodrop 1000 Spectrophotometer. User's Manual. Apéndice 19-2. Thermo Fisher Scientific Inc., 3411 Silverside Road, Bancroft Building, Suite 100, Wilmington, DE 19810 U.S.A, phone: 302-792-7155, fax: 302-792-7155, e-mail: info@nanodrop.com, WEB: <http://www.nanodrop.com>.
- Tomasco, I. 2004. Filogeografía del tucu- tucu *Ctenomys pearsoni*: variación del ADN mitocondrial y sus implicancias para la diferenciación cromosómica. *Mastozoología Neotropical*, 11: 122.
- Tomasco, I. H. & Lessa, E. P. 2007. Filogeografía del tuco. Tuco *Ctenomys pearsoni*: variación en el $_{MT}$ ADN y sus implicaciones para la diferenciación cromosómica. Pág: 859- 882 en Kelt, D. A., E. P. Lessa, J. Salaza- Bravo, and J. L. Patton. Eds. *The Quintessential*

Naturalist: Honoring the Life and Legacy of Oliver P. Pearson. University of California Publications in Zoology.

- Waits, L.P., Luikart, G & Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256.
- Waits, L.P. & Paetkau, D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69 (4): 1419- 1433.
- Weir, B. S. And Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358- 1370. Citado por: Roda, P., Callejas, C., Reyes, A. y Ochando, M. D. 1996. Caracterización genética en *Ceratitidis capitata* Wied. asociada a fruto hospedador .I. Análisis isoenzimático. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 71- 78.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Wlasiuk, G. 1998. Microsatélites: una herramienta para estudios poblacionales y de parentesco. Licenciatura en Bioquímica. Trabajo Especial I, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo. (Tutor: E. Lessa).
- Wlasiuk, G., Garza, J. C., and 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.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1- 16.
- Zenuto, R. R., Lacey, E. A., Busch, C. 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Molecular Ecology*, 8: 1529- 1532.

VI- Anexos

Anexo 1

Para cada individuo capturado se muestra el sexo (h= hembra, m= macho) y la fecha de captura. Estos datos fueron otorgados por Gabriel Francescoli y Graciela Izquierdo en el marco del proyecto "Diseño de señales y su posible influencia en la organización socio-reproductiva de los tucu-tucus solitarios (*Ctenomys*; Rhodentia: Ctenomyidae)", Responsable: Gabriel Francescoli.

Individuo	Sexo	Fecha de Captura
Tu01	h	24/6/2005
Tu02	m	25/6/2005
Tu03	h	25/6/2005
Tu04	m	25/6/2005
Tu05	h	25/6/2005
Tu06	m	25/6/2005
Tu07	m	26/6/2005
Tu08	h	26/6/2005
Tu09	h	26/6/2005
Tu10	m	26/6/2005
Tu11	h	26/6/2005
Tu12	h	19/7/2005
Tu13	m	20/7/2005
Tu14	h	20/7/2005
Tu15	h	21/7/2005
Tu16	h	21/7/2005
Tu17	h	3/8/2005
Tu18	m	3/8/2005
Tu19	h	4/8/2005
Tu20	h	4/8/2005
Tu21	h	4/8/2005
Tu22	h	4/8/2005
Tu23	h	12/9/2005
Tu24	h	21/3/2006
Tu25	h	21/3/2006
Tu26	h	21/3/2006
Tu27	m	21/3/2006
Tu28	m	21/3/2006
Tu29	h	21/3/2006
Tu30	h	21/3/2006
Tu31	m	21/3/2006
Tu32	m	21/3/2006
Tu33	h	21/3/2006
Tu34	h	21/3/2006
Tu35	m	19/7/2006

Anexo 2

Protocolo empleado en este estudio para las extracciones de ADN a partir de muestras de pelo.

EXTRACCION DE ADN (tejidos Medrano *et al.*, 1990)

DIA 1

1. Cortar tejido con material estéril
2. Colocar en eppendorf
3. Centrifugo 1min. si la muestra fue conservada en alcohol para eliminarlo.
4. Se lava con buffer STE 1ml.
5. Centrifugo 1 min.
6. Descarto el STE
7. Agregar buffer de lisis (550 ul) + proteinasa K (10 mg/ml) (20 ul)
8. Dejar en baño a 55 °C con agitación dos horas, o a 37°C por toda la noche

Buffer de lisis

50mM Tris HCl, pH 8,0; 50mM EDTA, pH 8,0; 1% SDS; 100mM NaCl; 1% beta mercaptoetanol

Buffer STE

Ver Maniatis

DIA 2

1. Adicionar 5,5 ul. RNAsa A y dejar incubando 1 hora mas a 55 °C
2. Centrifugar 14.000 rpm por 10 min.
3. Transferir sobrenadante a otro eppendorff y medir (ul.) con la pipeta
4. Agregar NaCl, lo tenemos a 5M, y lo tengo que llevar a 2M

$$V_i = \frac{V_f (\text{Sobrenadante}) \times 2 (\text{Concentración final})}{5 (\text{Concentración inicial})} = x$$

Hacer tabla

Nº individuo	V.ini	V.ini X 0.66	V.ini + V.NaCl	(V.ini + V.NaCl) / 2	V.c/tubo*2
		V.NaCl		c/tubo	V.Etanol
	p.3	p.4		p.7	p.8

5. Vortexear 5 seg. cada muestra
6. Centrifugar 14000 rpm durante 30 min.
7. Distribuir el sobrenadante en dos tubos eppendorff (aprox. 400ul. cada uno)
8. Adicionar el doble en volumen de Etanol absoluto frío (aprox. 800ul.) en este momento se debería observar el ADN
9. Se deja precipitando en la heladera toda la noche

DÍA 3

1. Centrifugar 30 min. a máxima rpm
2. Desechar sobrenadante
3. Adicional 1ml de Alcohol 70%
4. Centrifugar 5min. a 6000 rpm-descartar sobrenadante
5. Adicional 1ml de Alcohol 70%
6. Centrifugar 5min. a 6000 rpm- descartar sobrenadante
7. Incubar 30 min. a 37°C o hasta secar
8. Agregar 50 ul 1xTE (Tris EDTA o agua destilada)

Anexo 3.

Alelos obtenidos mediante el análisis de los fragmentos con el software GenMarker V

1. 75[®]. Los casilleros en blanco representan información no obtenida en este estudio.

Individuo	Locus									
	soc 1		soc2		hai4		soc5		soc6	
Tu01	277	277	137	137	168	178	264	268	219	219
Tu02	275	277	161	161	168	174	266	270	217	217
Tu03	277	279	137	161	174	174	262	262	215	219
Tu04	269	275	137	161	168	174	266	270	215	221
Tu05	273	273	137	139	174	178	262	270	219	219
Tu06	273	275	139	139	174	178	266	266	215	219
Tu07	273	275	139	139	174	174	262	266	219	219
Tu08	277	277	137	139	174	178	270	272	215	219
Tu09	273	277	137	161	174	180	262	266	219	219
Tu10	275	277	139	161	174	174	262	266	217	221
Tu11	269	277	137	139	174	180	262	266	215	219
Tu12	275	275	137	161	174	178	262	266	215	219
Tu13	273	275	137	139	168	180	262	270	215	215
Tu14	273	273	137	137	174	178	264	266	215	215
Tu15	269	279	137	161	168	174	266	270	215	221
Tu16	275	275	139	139	168	180	262	266	215	219
Tu17	273	277	137	139	178	178	262	270	215	219
Tu18	273	275	137	161	174	174				
Tu19	275	279	137	161	174	174	262	262	215	219
Tu20	275	279	137	161	168	178	266	266	215	215
Tu21	273	273	137	137					215	215
Tu22	275	275	137	139	182	182	262	266	215	219
Tu23	275	275	137	137	166	168	266	270	215	219
Tu24	275	275	139	139	168	168	266	270	215	215
Tu25	269	275	137	137	174	174	266	266	215	219
Tu26	275	275	137	137	166	178	262	266	219	219
Tu27	275	275	139	161	174	178	262	266	219	219
Tu28	273	275	137	137	166	168	262	266	215	219
Tu29	273	275	137	139	168	182	260	262		
Tu30	271	273	137	139	178	182	266	270	215	219
Tu31	273	273	135	137	166	168	262	266	215	219
Tu32	275	277	137	139	174	178	262	266	215	215
Tu33	275	275	137	161	168	168	266	266	215	219
Tu34	273	275	137	137	166	168	266	266	219	219
Tu35	273	275			174	178	264	266		

Anexo 4.

Frecuencias alélicas en los distintos locus obtenidas con el programa Cervus 3.0®.

Locus	Alelos	Frecuencias
Soc 1	269	0.0400
	273	0.2600
	275	0.4600
	277	0.2000
	279	0.0400
Soc 2	135	0.0161
	137	0.5000
	139	0.3065
	161	0.1774
Hai 4	166	0.0714
	168	0.1786
	174	0.4107
	178	0.2321
	180	0.0714
	182	0.0357
Soc 5	262	0.3393
	264	0.0357
	266	0.4643
	270	0.1429
	272	0.0179
Soc 6	215	0.4444
	217	0.0556
	219	0.4630
	221	0.0370