

Evolución del citocromo b dentro de la tribu Abrotrichini (Rodentia: Sigmodontinae): Fosorialidad y altitud

Por PACO M. MAJIC

Tutor: Enrique P. Lessa

Licenciatura en Ciencias Biológicas: Genética y Evolución.

Facultad de Ciencias, UdelAR.

Montevideo, Uruguay. Diciembre, 2012.



Agradecimientos

A Enrique Lessa por su guía y disponibilidad, y a Ivanna Tomasco por su indispensable ayuda en la resolución de las crípticas demandas del PAML.

Me he restringido a agradecer sólo a aquellas personas que han jugado un papel fundamental en la concreción de este trabajo. Soy de la postura de que si se agradece a todos, se acaba por no agradecer a nadie. Así que familia, amigos, colegas, fuentes de inspiración, no os ofendáis.

Índice

- Resumen.....	5
- Abstract	5
- Introducción.....	6
- Métodos	9
Obtención de secuencias	9
Reconstrucción filogenética.....	10
Mapeo de cambios no sinónimos	10
Selección por ramas.....	10
Selección por sitios	11
- Resultados	12
Filogenia	12
Conteo de cambios aminoacídicos.....	13
Intensidad de selección.....	15
Selección por sitios	15
<i>Chelemys macronyx</i> : variación altitudinal a nivel poblacional.....	17
- Discusión.....	19
Fosorialidad.....	20
Altitud.....	22
- Conclusión.....	24
- Bibliografía	25
- Anexos	28
1) PCR	28
2) Tabla S1.....	29
3) Tabla S2	30
4) Tabla S3	31

Resumen

El citocromo b es una proteína mitocondrial esencial en la respiración celular, por lo que es esperable que su secuencia codificante esté dominada por un régimen de selección purificadora. Es posible, sin embargo, que la incursión en nichos con nuevas demandas fisiológicas cree nuevas presiones selectivas, permitiendo un cierto grado de adaptación funcional en la proteína. Tal podría ser el resultado de la asociación a condiciones de hipoxia involucradas en el buceo, los hábitos subterráneos y la vida a grandes altitudes. Dentro de la tribu Abrotrichini (Rodentia: Sigmodontinae) hay especies que recurren a la fosorialidad, y las hay también que se distribuyen sobre los altos Andes donde la presión parcial de oxígeno es muy baja con respecto al nivel del mar, lo que los hace candidatos a tener algún nivel de selección positiva actuando sobre su citocromo b. Para evaluar esta posibilidad se recurrió a pruebas de verosimilitud para detectar selección positiva por comparación de la tasa de sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) a nivel de ramas dentro de la filogenia y codones particulares dentro de las secuencias del citocromo b. Los resultados evidenciaron la dominancia de la selección purificadora, y descartaron la adaptación del citocromo b como consecuencia de la fosorialidad en los Abrotrichini, pero no como consecuencia de la vida a altas altitudes. De todos modos, para confirmar la existencia de selección positiva por causa de la altitud serían necesarios análisis complementarios de otros genes mitocondriales para descartar posibles reducciones en el tamaño poblacional, con el consiguiente relajamiento en la selección purificadora, como causa de los patrones observados en el citocromo b.

Abstract

Cytochrome b is a mitochondrial protein which is essential for cellular respiration; its coding sequence is therefore expected to be ruled by a regime of purifying selection. However, it is possible that such regime varies as the result of new selective pressures exerted by the physiological demands involved in the spread into new niches, thus allowing a certain degree of functional adaptation of the protein. Such change could result from the hypoxic conditions implicated in diving, subterranean habits and life at high altitudes. Within the Abrotrichini tribe (Rodentia: Sigmodontinae) there are species which are fossorial, as well as others whose distributions reach the High Andes, where oxygen partial pressure is considerably lower than at sea level, which makes them candidates to have some level of positive selection acting on their cytochrome b sequences. This possibility was evaluated through likelihood-based tests for detecting positive selection by comparing the synonymous and non-synonymous substitutions rates (dN/dS) at the level of branches within the phylogeny and at that of particular codons in the sequence. The results confirmed the dominance of purifying selection, and they ruled out adaptation occurring as a consequence of fossoriality, but not as a result of life at high altitudes in the Abrotrichini. Nevertheless, complementary studies on additional mitochondrial genes would be required to confirm the existence of positive selection as the foundation of the observed patterns on the cytochrome b sequences of high-altitude Abrotrichini, since they could also be explained by a relaxation of purifying selection resulting from a reduction in the effective population size.

Introducción

En el marco del debate entre el seleccionismo y el neutralismo existe un punto de concordancia en lo que respecta a que gran parte de las sustituciones de reemplazo en una secuencia génica tienen efectos deletéreos y difícilmente lleguen a fijarse en una población, o sea, que la tendencia en términos generales es la conservación de un fenotipo por la selección purificadora (Álvarez-Valín, 2000; Wagner, 2008; Futuyma, 2009). Esto es así especialmente en genes de importancia metabólica en los cuales alteraciones mínimas pueden tener consecuencias letales para el organismo portador, como es el caso de los genes mitocondriales comunes a todo el dominio Eukarya (Stewart *et al*, 2008). Una de las proteínas codificadas a partir del genoma mitocondrial es el citocromo b. Esta proteína se dispone atravesando la membrana mitocondrial interna y cumple una función esencial en la cadena respiratoria – forma parte integral del complejo citocromo bc_1 que por oxido-reducción recibe electrones de la ubiquinona, para luego cederlos de la misma forma al citocromo c, lo que desencadena la generación del gradiente protónico que permite la generación de ATP con el oxígeno como aceptor final de electrones. A pesar de que la relevancia funcional del citocromo b implica una alta conservación de su secuencia aminoacídica, es posible que existan cambios adaptativos en la misma relacionados a variaciones ecológicas que impliquen alteraciones en la demanda metabólica y los procesos bioquímicos durante la respiración celular, como por ejemplo en los niveles de disponibilidad de oxígeno. El buceo, la vida a altas altitudes y los hábitos subterráneos conforman los tres dominios en los que el transporte normal de gases se altera en los mamíferos (Arieli, 1990). En los tres casos se detectaron posibles indicios de selección natural positiva asociada a la hipoxia actuando sobre el citocromo b y sobre otros genes mitocondriales involucrados en la respiración celular (e. g. McLellan *et al*, 2005; Hassanin *et al*, 2009 y Tomasco & Lessa, 2011 respectivamente).

La vida subterránea es una característica relativamente recurrente en la clase de los mamíferos, particularmente en los ordenes Rodentia e Insectivora (Nevo & Reig, 1990). Ella trae aparejada a lo largo de la filogenia una gran cantidad de convergencias adaptativas para lidiar con las nuevas necesidades y demandas, como el tener que mover grandes cantidades de tierra, restringirse a espacios angostos, cambiar las prioridades sensoriales, entre otros tantos factores (Nevo, 1979; Stein, 2000). Una característica general de las madrigueras subterráneas es la baja proporción de oxígeno (hipoxia) y alta de dióxido de carbono (hipercapnia) con respecto a los niveles atmosféricos de estos dos gases. Estas condiciones suponen el surgimiento también convergente de soluciones

fisiológicas a la incapacidad de poder mantener un ritmo respiratorio como el que se llevaría en la superficie (Arieli, 1990; Buffenstein, 2000; Tomasco *et al*, 2010).

En cuanto a las grandes altitudes, estas son una importante limitante para la dispersión de las especies animales por factores bióticos, como la escasez de alimentos (Arieli, 1990), y por factores abióticos, dentro de los cuales el más destacado es la disminución de la presión barométrica, con la consecuente disminución en la presión parcial de oxígeno (Novoa *et al*, 2003) (Ver Tabla S3). Al igual que los roedores subterráneos, aquellos que han conquistado grandes altitudes han desarrollado adaptaciones que les permiten hacer un uso más eficiente del oxígeno para enfrentar su carencia (Arieli, 1990; Novoa *et al*, 2003).

Los Abrotrichini como modelo

Dentro de la gran radiación de la subfamilia Sigmodontinae (Rodentia: Cricetidae) de las aproximadamente trescientas ochenta especies que la integran, solamente siete han adquirido hábitos cavadores (Rodríguez-Serrano *et al*, 2008) (lo cual es curioso considerando la magnitud de la radiación en sí y la conquista de diversos nichos por numerosas especies dentro de este grupo (Smith & Patton, 1999; Ortiz *et al*, 2011)). Cinco de esas siete especies forman parte de la tribu Abrotrichini (a la que también se le refiere como “clado andino”), dentro de la cual hay además especies que viven en los Altos Andes. De forma que los Abrotrichini, que han sido sólidamente corroborados como integrantes de una unidad monofilética dentro de la radiación de los sigmodontinos (D’Elia, 2003), han incursionado en dos de los tres dominios en los que se altera el transporte normal de gases en mamíferos propuestos por Arieli (1990) (Ver arriba).

Las cinco especies cavadoras dentro de los Abrotrichini son *Chelemys macronyx*, *Chelemys megalonyx*, *Notiomys edwardsii*, *Pearsonomys annectens* y *Geoxus valdivianus*; aunque información reciente parecería sugerir que lo que actualmente se considera *G. valdivianus* son en realidad dos especies y que el género es parafilético con respecto a *P. annectens* (Lessa *et al*, 2010). Todas tienen como adaptaciones morfológicas para la vida bajo tierra garras largas y cola corta en relación al cuerpo, aunque otros aspectos como el tamaño de pinnas auditivas y ojos son más heterogéneos a nivel interespecífico (Pearson, 1984). Sin embargo, en ningún caso se trata de especies subterráneas *per se*, sino que son todas fosoriales por carecer de un nivel de especialización tan alto y ser considerablemente activas fuera de sus madrigueras (Pearson, 1984). Las restantes especies dentro de los Abrotrichini pertenecen todas al género *Abrothrix* y, si bien hay registros del uso por su parte de madrigueras construidas

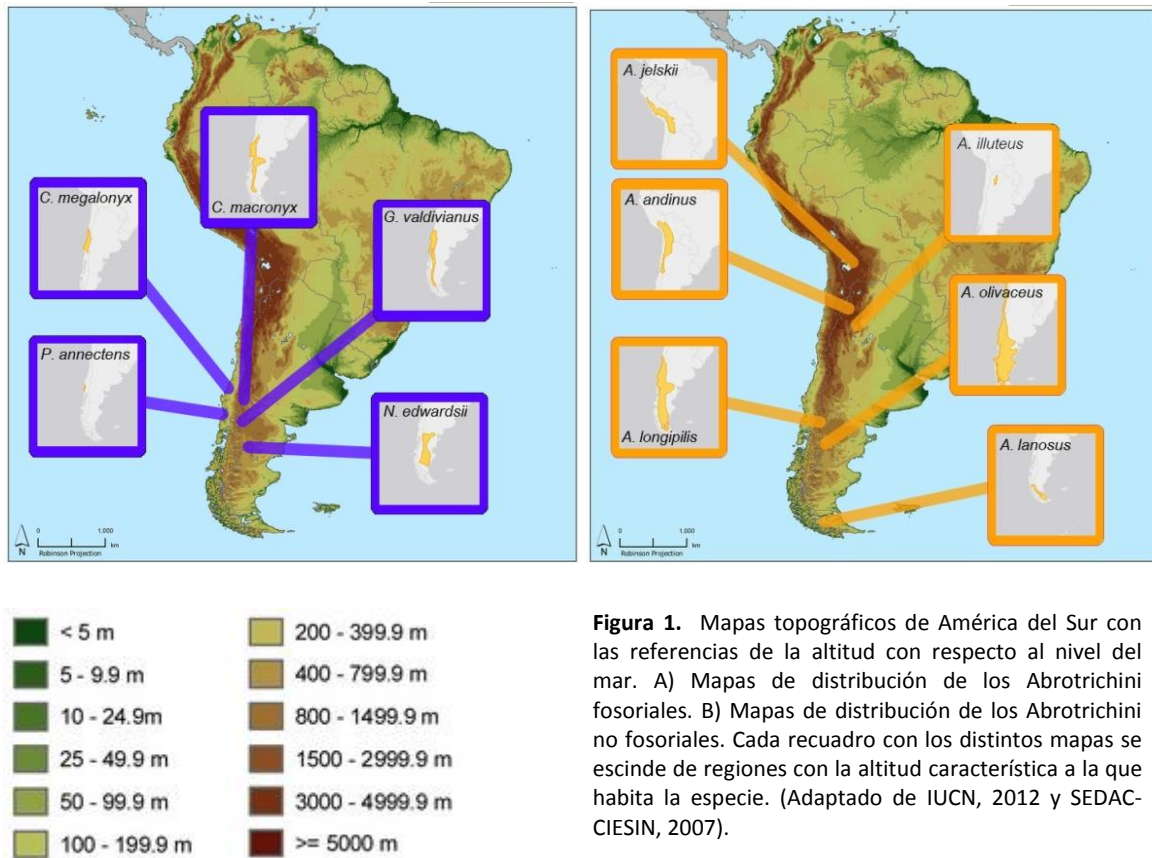


Figura 1. Mapas topográficos de América del Sur con las referencias de la altitud con respecto al nivel del mar. A) Mapas de distribución de los Abrotrichini fosoriales. B) Mapas de distribución de los Abrotrichini no fosoriales. Cada recuadro con los distintos mapas se escinde de regiones con la altitud característica a la que habita la especie. (Adaptado de IUCN, 2012 y SEDAC-CIESIN, 2007).

por especies de roedores caviomorfos (Pearson, 1984), ninguna presenta un mayor desarrollo en las características anatómicas para la excavación y la vida bajo tierra, por lo que son todas consideradas cursoriales.

Toda la tribu Abrotrichini se distribuye al sudoeste del continente sudamericano extendiéndose por Chile, Argentina, Bolivia y Perú, aunque cada especie tiene un rango de distribución propio con diferentes características geográficas y ambientales. Los Abrotrichini fosoriales se encuentran asociados a bosques de *Nothofagus* o sus márgenes húmedos (Pearson, 1984; Teta *et al*, 2006), con la sola excepción de *N. edwardsii*, que habita principalmente la estepa patagónica argentina (Fig. 1A). Los del género *Abrothrix*, por su parte, se extienden en un mayor rango latitudinal que va desde el altiplano a Tierra del Fuego (Fig. 1B), destacándose la diferencia en altitud con respecto al nivel del mar que ofrece la presencia de la cadena montañosa andina. Las especies *Abrothrix jelskii* y *Abrothrix andinus* se localizan en torno a la región del altiplano de los Andes a altitudes de que pueden alcanzar los 5500 metros sobre el nivel del mar, y siempre por encima de los 2000m; *Abrothrix illuteus* se distribuye por el noroeste argentino llegando a alturas que pueden superar los 3000m, y se asocia principalmente a regiones de yunga (Teta *et al*, 2006); las restantes especies, que incluyen a *Abrothrix*

longipilis, a *Abrothrix lanosus* y a *Abrothrix olivaceus*, nunca alcanzan altitudes comparables a las máximas de las de las tres anteriores y se distribuyen más australmente hacia la Patagonia, y en el caso de *A. olivaceus* también hacia el centro-norte de Chile parapatricamente a *A. andinus* (Fig. 1B). Las diferencias en las altitudes a las que viven las distintas especies implican marcados contrastes entre los niveles de oxígeno disponibles para cada una. Gráficamente, el aire a las altitudes máximas alcanzadas por *A. andinus* y *A. jelskii* contiene poco más que el 50% del oxígeno disponible a nivel del mar (Baillie, 2010), mientras que por debajo de los 2000m se mantiene por encima del 80%. Rosenmann & Ruiz (1993) reportan que como consecuencia de esto existe en *A. andinus* un alto conteo de eritrocitos, una plasticidad en el tamaño de los mismos y una alta concentración de hemoglobina en períodos de alta demanda metabólica, de forma contrastante con especies de bajas altitudes. Las distribuciones de *A. andinus*, *A. illuteus* y *A. jelskii* no son las únicas dentro de los Abrothrichini que superan los 2000m de altitud, la de *C. macronyx* también lo hace, aunque parcialmente. Lessa *et al* (2010) identificaron un quiebre filogeográfico en la distribución de *C. macronyx* que separa dos unidades, una al norte de la misma y otra con una mayor extensión dentro de la Patagonia. Tales unidades fueron posteriormente verificadas como dos clados dentro de la especie: el alto andino al norte y el de altitudes medio-bajas al sur, que como indican sus nombres, difieren no sólo en latitud, sino también en altitud (Alarcón *et al*, 2011), al punto de llegar a diferencias del 26% de disponibilidad de oxígeno entre especímenes de cada clado (Ver Tabla S3).

En definitiva, dado que los Abrothrichini, a pesar de su relativamente poca diversidad específica, han logrado incursionar en los dominios subterráneos y de grandes altitudes, pueden ser un modelo informativo para el estudio las alteraciones en el transporte de gases y las adaptaciones a las mismas. Particularmente, la hipótesis aquí planteada es que, como adaptación a los niveles bajos de disponibilidad de oxígeno, las secuencias aminoacídicas del citocromo b de las especies con hábitos fosoriales y/o de las de especies de vida a grandes altitudes hayan acumulado cambios que se hubieran fijado por ofrecer una mayor eficiencia en la cadena respiratoria mitocondrial con respecto a las especies que integran sus respectivos complementos, más allá de la reinante selección purificadora a la que se espera esté sometida la proteína. Concretamente, el objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del citocromo b dentro de esta tribu, buscando la existencia de trazas de selección direccional positiva producto de las incursiones en la fosorialidad y en las grandes altitudes.

Métodos

Obtención de secuencias. Las secuencias de la región codificante del gen mitocondrial citocromo b fueron obtenidas a partir de la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para las especies *Abrothrix adinus*, *A. olivaceus*, *A. jelskii*, *A. longipilis*, *A. lanosus*, *A. illuteus*, *Chelemys megalonyx*, *Chelemys macronyx* (de zonas de más de 2000m y menos de 2000m de altura), *Geoxus valdivianus*, *Pearsonomys annectens* y *Notiomys edwardsii*. En el caso particular de *C. macronyx* se obtuvieron además diez secuencias adicionales, cuatro correspondientes al clado alto andino y seis al clado sureño de altitudes medio-bajas definidos por Alarcón *et al* (2011). Gran parte de las secuencias incluyeron la casi totalidad de las bases contenidas en la región codificante del gen (1140pb), sin embargo las de *N. edwardsii*, *P. annectens* y las de los diez *C. macronyx* adicionales sólo estaban presentes en un 70,5% del total (801pb). Se intentó amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región codificante completa de estas tres especies para su secuenciación y completado (Ver “Materiales Suplementarios” por detalles), pero tal procedimiento fue infructífero por lo que hubo que realizar los restantes ensayos con las secuencias de esas especies incompletas.

Reconstrucción filogenética. Todas las secuencias se alinearon por codones en el software de uso libre MEGA en su versión 5.05 por medio de Clustal W con sus valores predeterminados. Subsecuentemente se construyeron las filogenias por el método de máxima verosimilitud con mil pseudorréplicas para computar el análisis de apoyo por *bootstrap* en el mismo programa y con las restantes opciones en sus valores predeterminados. Se construyeron un árbol de genes que sigue sólo la historia evolutiva del citocromo b y otro en el que se acoplaron las secuencias del citocromo b con la del gen nuclear de la proteína de unión al interfotoreceptor retinoide (IRBP) (secuencias que también fueron obtenidas del GenBank). Como grupo externo se utilizaron las especies *Bolomys temchuki*, *Phylotis xanthopygus* y *Akodon azarae*, las cuales integran tribus filogenéticamente cercanas a la de los Abrotrichini (D’Elia, 2003). De la misma forma se reconstruyó una filogenia de las secuencias obtenidas para diferentes especímenes de *C. macronyx* con *N. edwardsii* como grupo externo.

Mapa de cambios no sinónimos. En MEGA 5.05 también se tradujeron las secuencias utilizando el código genético mitocondrial de vertebrados. Las secuencias aminoacídicas se ingresaron junto con las filogenias previamente construidas en el programa Mesquite 2.75, donde se trazaron los caracteres sobre los árboles (siguiendo las opciones para el

árbol “Analysis” y dentro de esta “Trace over trees”), lo cual permite la visualización de en qué rama es más parsimonioso inferir que haya ocurrido un cambio aminoacídico. A partir de esto se mapearon y cuantificaron los cambios aminoacídicos que ocurrieron en cada rama de la diversificación del linaje con sus respectivas posiciones en la secuencia. Se tuvo en cuenta si existieron diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre los aminoácidos que varían dentro de un sitio, así como su posicionamiento dentro de la estructura proteica considerando los dominios transmembrana, de la matriz mitocondrial y transmembrana, que tienen diferentes relevancias funcionales (McLellan *et al*, 2005).

Selección por ramas. La evaluación de la intensidad de selección se llevó a cabo por medio de un estudio de verosimilitud para analizar la variación en la relación entre la cantidad de cambios sinónimos (dS) y no sinónimos (dN), dN/dS (de ahora en más ω), en las secuencias codificantes del citocromo b (Yang & Bielawski, 2000; Yang, 2002) utilizando el programa codeml del paquete PAML 4.5 (Yang, 2007) siguiendo los pasos sugeridos en el manual del programa. La razón ω como indicador de selección natural se basa en los principios de la teoría neutral e implica que si un cambio aminoacídico en una secuencia es selectivamente neutro, su probabilidad de fijación es igual a la de un cambio nucleotídico que genere un triplete que codifique para un mismo aminoácido y, por ende, la cantidad esperada de mutaciones puntuales sinónimas habría de ser igual a la de mutaciones no sinónimas ($dN/dS=\omega=1$). Si, en cambio, la variación en la identidad de un aminoácido produce una ventaja selectiva para el organismo portador, su probabilidad de fijación es más alta que la de una alteración sinónima ($\omega >1$). Cuando los cambios en la secuencia aminoacídica provocan efectos deletéreos, o sea cuando la selección purificadora es la que prima, los cambios sinónimos tienen una probabilidad de fijación superior a la de los no sinónimos ($\omega <1$).

Los niveles de ω se evaluaron a través de cuatro modelos: M1, que permite la variación de ω a nivel de cada rama de la filogenia (ω_i); M2_{f/nf}, que agrupa las ramas que contienen a las especies fosoriales y no fosoriales, existiendo sólo los dos parámetros ω_f y ω_{nf} respectivamente; M2_{h/nh}, que permite la variación de ω a modo de incluir las especies que viven a una altitud mayor a los 2000m (altura la cual la disponibilidad de oxígeno es un 80% la de a nivel del mar) por un lado (ω_h) y las que no por otro (ω_{nh}); y M0, con un solo parámetro para toda la filogenia que sirve de modelo nulo (ω_0). La significancia estadística de los resultados se consideró como el cálculo del doble de la diferencia entre la probabilidad logarítmica del modelo en cuestión y la del modelo de un parámetro M0 ($2\Delta l$), para su contrastación con los valores de la tabla de χ^2 con un p-valor máximo de

0,05. De forma similar se construyeron modelos para ensayos análogos a nivel poblacional dentro de *C. macronyx*.

Selección por sitios. Adicionalmente, se estudió la intensidad de selección actuando sobre sitios aminoacídicos individuales que de otra forma quedarían ocultos bajo el estricto régimen conservador que rige a la secuencia *in toto* por la selección purificadora dominante (Yang, 2002). Para estos ensayos se recurrió a DataMonkey (Kosakovsky Pond & Frost, 2005), un sitio web del paquete HyPhy en donde con las secuencias nucleotídicas y los árboles construidos se puede evaluar la existencia de sitios bajo selección positiva o negativa por diversos métodos, en este caso se usaron SLAC (Kosakovsky Pond & Frost, 2005), REL (Kosakovsky Pond & Frost, 2005), IFEL (Kosakovsky Pond *et al*, 2006) y MEME (Murrell *et al*, 2012) con el modelo HKY de sustituciones como sugerido por el mismo servidor. En orden de mayor a menor precisión en la detección de sitios efectivamente bajo selección, pero también en la probabilidad de omitir algunos: SLAC es un método de conteo a partir de una única reconstrucción de la secuencia ancestral más probable; REL modela variaciones en las tasas de cambios sinónimos y no sinónimos entre sitios de acuerdo con una distribución predefinida, con una presión selectiva en cada sitio inferida por un enfoque empírico bayesiano; y IFEL estima directamente las tasas de sustitución sinónimas y no sinónimas en cada sitio (Kosakovsky Pond & Frost, 2005). A diferencia de los otros tres métodos el MEME permite no sólo una variación de los ω a lo largo de las secuencias, sino que también a través de las ramas de la filogenia, lo que permite detectar selección episódica en sitios individuales (Murrell *et al*, 2012).

Resultados

Filogenia.

Las especies de Abrotrichini con hábitos fosoriales quedaron agrupadas con un estadístico de *bootstrap* de máxima verosimilitud de 92% y las no fosoriales con uno de 96%. Todas las ramas internas dentro del grupo de los fosoriales tuvieron un valor de *bootstrap* mayor a 60% y se agruparon los géneros *Pearsonomys* y *Geoxus* por un lado, y *Notiomys* y *Chelemys* por otro, en lo que parecería indicar una polifilia del último por ser *C. macronyx* el grupo hermano de *N. edwardsii* y no de *C. megalonyx* en esta reconstrucción (Fig. 2)¹. Los resultados en el árbol de dos genes y en los construidos sólo con el citocromo b coincidieron en las relaciones entre las especies fosoriales. En lo que

¹ Como ya había sido sugerido por Rodríguez- Serrano *et al* (2008).

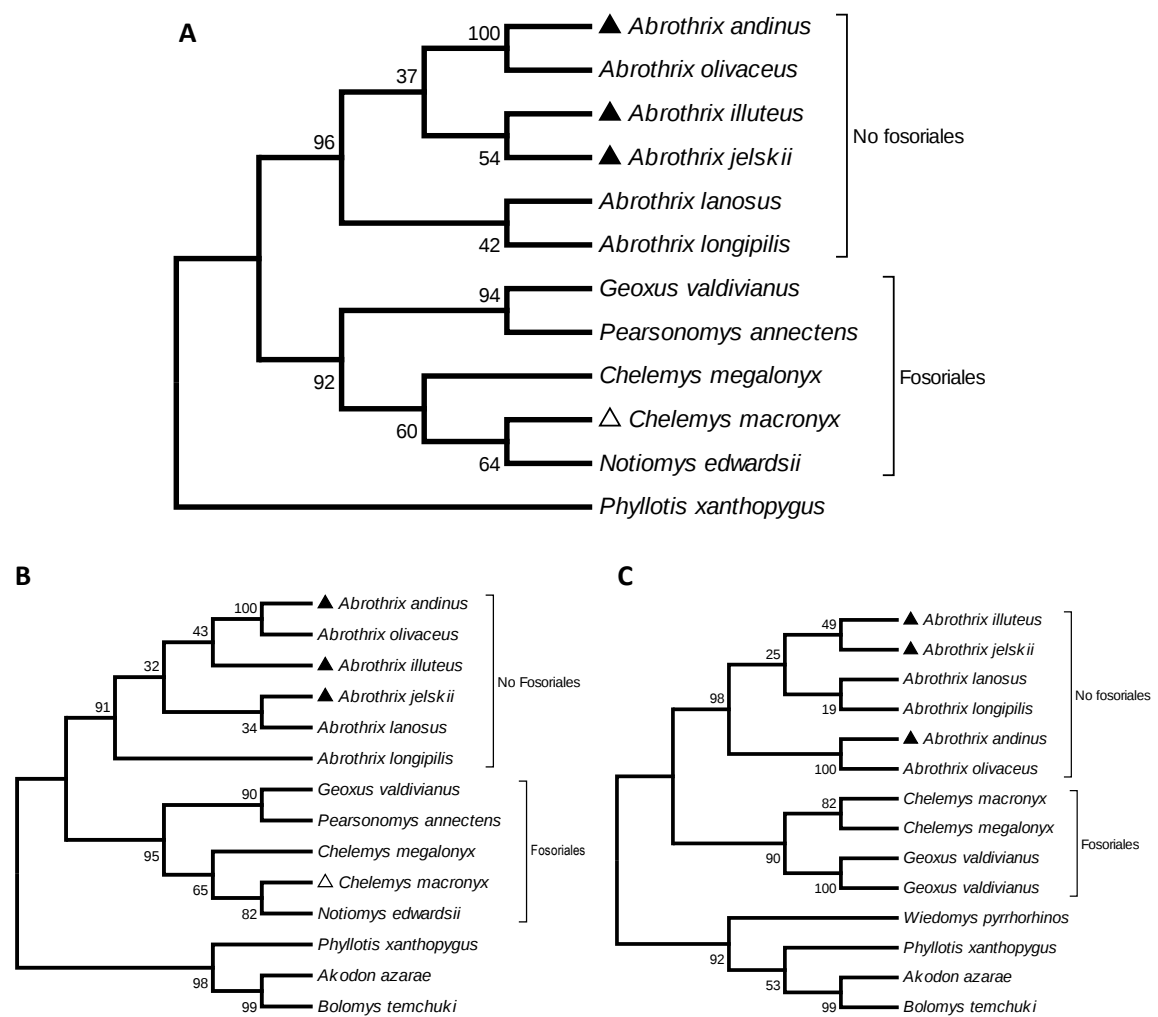


Figura 2. Filogenia de la tribu Abrotrichini construida por el método de máxima verosimilitud a partir de **A)** la conjunción de 801pb de citocromo b e IRBP (logL=-5840,08), **B)** 801pb de citocromo b (logL= -4802,19) y **C)** 1134pb de citocromo b sin las especies *N. edwardsii* y *P. annectens* (logL=-7214,11). Los números sobre los nodos indican el apoyo estadístico del *bootstrap* (1000 remuestreos). Los triángulos negros indican las especies que habitan zonas altas y el blanco refiere a aquella que se extiende en un amplio gradiente altitudinal.

respecta a los *Abrothrix*, si bien la unidad de todo el clado está bien fundamentada, muchas de las ramificaciones no quedaron definidas con total precisión, dando lugar a politomías en determinados nodos. En particular, la posición de *Abrothrix lanosus* parecería ser un tanto conflictiva por agruparse con *Abrothrix longipilis* en el árbol que incluye la secuencia del IRBP y con *Abrothrix jelskii* en el árbol que incluye sólo el citocromo b con 801pb.

Conteo de cambios aminoacídicos.

La Figura 3.A resume el número neto de sustituciones aminoacídicas contadas en cada una de las ramas de la filogenia de especies de los Abrotrichini. Las especies que

presentaron un mayor número total de cambios aminoacídicos fueron *A. jelskii*, *C. macronyx* y *Abrothrix andinus*. Las especies con un menor número de sustituciones fueron *N. edwardsii*, *A. longipilis* y *G. valdivianus*. El patrón se mantuvo incluso luego de realizar la corrección para ser contrastable con la cantidad de cambios en *N. edwardsii* y *P. annectens*, cuyas secuencias sólo constaron de 801pb (Se multiplicó el total de cambios por 0,705, por ser 801 el 70,5% de 1134).

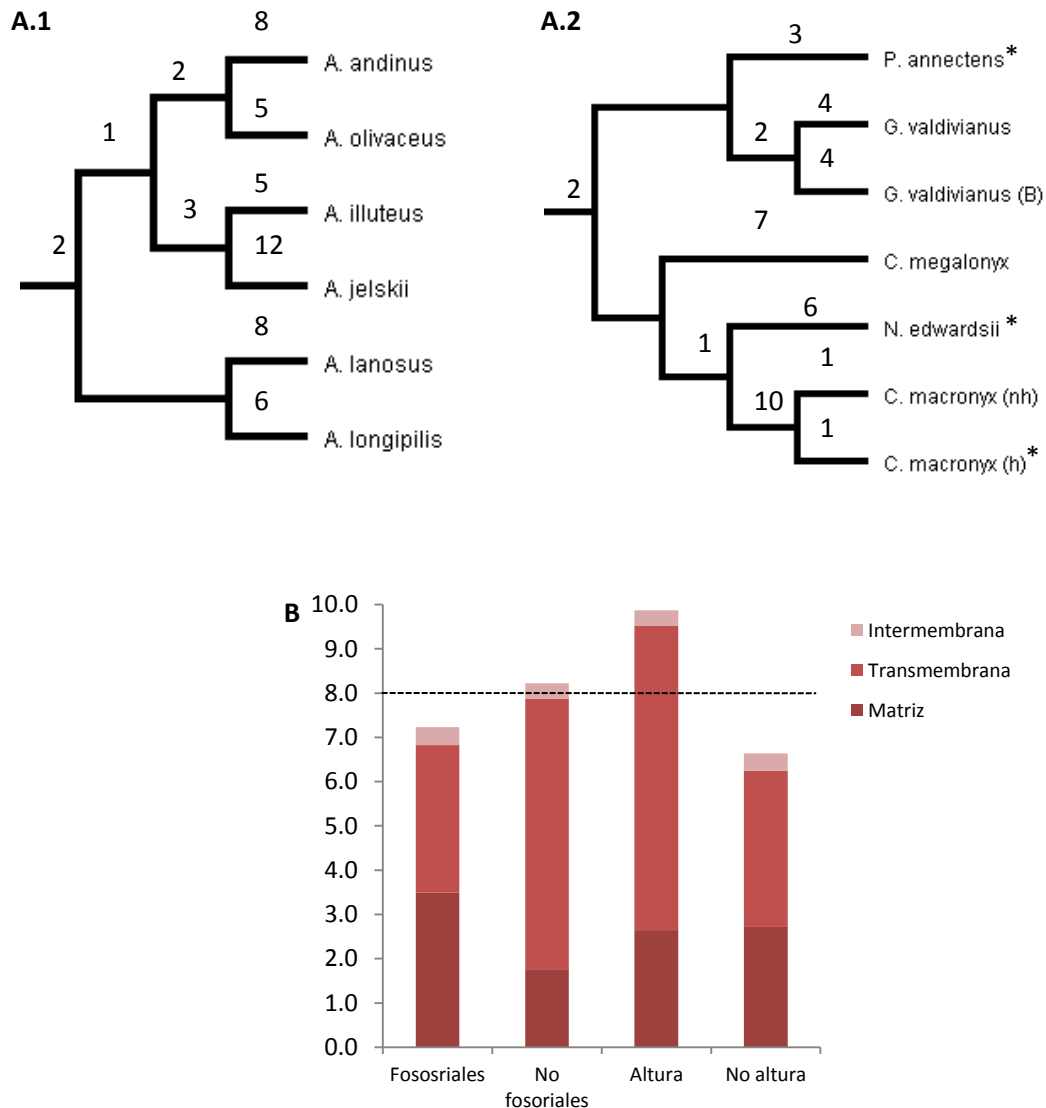


Figura 3. **A)** Conteo del número de sustituciones por ramas (internas y externas) dentro de los clados de los Abrothrichini no fosoriales (A.1) y fosoriales (A.2). Los números sobre las ramas indican la cantidad de cambios en esa rama sin corregir. Los asteriscos indican las especies para las que se utilizaron secuencias incompletas del citocromo b y cuyo conteo aminoacídico no fue corregido por 0,705. **B)** Gráfica del promedio de sustituciones en las secuencias de Abrothrichini fosoriales, no fosoriales, que viven en la altura y que no viven en la altura. La línea cortada indica el promedio global de sustituciones y los tres tonos de rojo indican las sustituciones en los dominios proteicos según su posicionamiento con respecto a la membrana mitocondrial (Ver referencias en la figura).

El promedio de sustituciones entre todas las especies consideradas fosoriales, residentes en la altura y sus complementos muestran niveles más altos en el de las especies de altura ($9,87 \pm 2,08$) que las de no altura ($6,64 \pm 1,80$). Además existe una ligera diferencia entre las especies fosoriales y no fosoriales ($\Delta=1,00$). El promedio global fue de 8,01 sustituciones por rama tras la corrección.

Cuantitativamente, no existe una diferencia prominente entre el número de sustituciones en los aminoácidos de los dominios del citocromo b ubicados en el espacio intermembrana mitocondrial entre fosoriales y no fosoriales, y alta altitud y baja altitud (Fig.3.B). Además, la cantidad es baja en comparación con la de los dominios transmembrana y de la matriz. Los fosoriales tienen en promedio un número más alto de sustituciones en el dominio de la matriz mitocondrial que los no fosoriales, mientras que al contrastar alta altitud y baja altitud en este respecto, los valores son iguales. Los Abrotrichini de zonas altas tienen una cantidad promedio de cambios aminoacídicos mayor que los de zonas bajas en sus dominios transmembrana.

Cualitativamente, cerca de la mitad de las sustituciones contrajeron cambios en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. El contraste entre el promedio de este tipo de cambios entre Abrotrichini fosoriales y no fosoriales no fue muy pronunciado (3,50 y 3,71 respectivamente), pero entre los de alta altitud y los de baja altitud fue en cambio mayor (4,75 y 3,11 respectivamente) (Tabla S2).

Intensidad de selección.

A partir del árbol de dos genes y del árbol del citocromo b, se realizó la comparación por ramas de la tasa de fijación de sustituciones sinónimas y no sinónimas. La diferencia entre los resultados a partir de cada árbol fue mínima, y se presentan en la tabla 1 y la figura 4 los del ensayo realizado a partir del árbol de dos genes. Como se esperaba, la cantidad de cambios sinónimos fue ampliamente mayor que la de los de reemplazo, siendo los valores de ω considerablemente menores a 1 (sin alcanzar siquiera nunca cifras dentro de las décimas). La diferencia entre ω_f (fosoriales) y ω_{nf} (no fosoriales) no fue demasiado pronunciada, ni cuando se tuvieron en cuenta a *N. edwardsii* y a *P. annectens* (en los ensayos con 267 codones), ni cuando no. Además cuál de estos dos ω es mayor cambia en cada caso. Lo mismo no ocurre entre los ω que evalúan las especies de grandes altitudes (ω_h) fue consistentemente mayor en los Abrotrichini de zonas bajas (ω_{nh}). Los resultados fueron significativos ($2\Delta l < 3,84$) con respecto al modelo nulo M0 sólo cuando se evaluaron los parámetros ω_h y ω_{nh} con secuencias de 1134pb y en el modelo M1, donde cada rama de la filogenia cuenta con un ω independiente.

Tabla 1. Estimación de ω (dN/dS) en la secuencia casi completa del citocromo b para todos los Abrotrichini salvo *N. edwardsii* y *P. annectens* (379 codones*) y para la secuencia de los primeros 267 codones (267 codones).

Modelo	ω	2 Δ I	ω	2 Δ I
	379 codones*		267 codones	
M0	ω_0 0,0342	-----	ω_0 0,0267	-----
M2 _{f/nf}	ω_{nf} 0,0363	0,17	ω_{nf} 0,0248	0,32
	ω_f 0,0316		ω_f 0,0291	
M2 _{h/nh}	ω_h 0,0526	5,09	ω_h 0,0332	0,64
	ω_{nh} 0,0290		ω_{nh} 0,0252	
M1	ω_i (Fig. 4)	21,42	ω_i (Fig. 4)	18,01

M0: Modelo nulo con " ω_0 " como único parámetro; M2: modelo con dos parámetros, fosoriales y no fosoriales (f/nf), y altitud y no altitud (h/nh); M1: Un parámetro por rama en la filogenia. " ω " indica los valores de los parámetros en cada caso y "2 Δ I" la significancia con respecto al modelo nulo (ver Métodos). Los valores para ω_i se presentan en la figura 4.

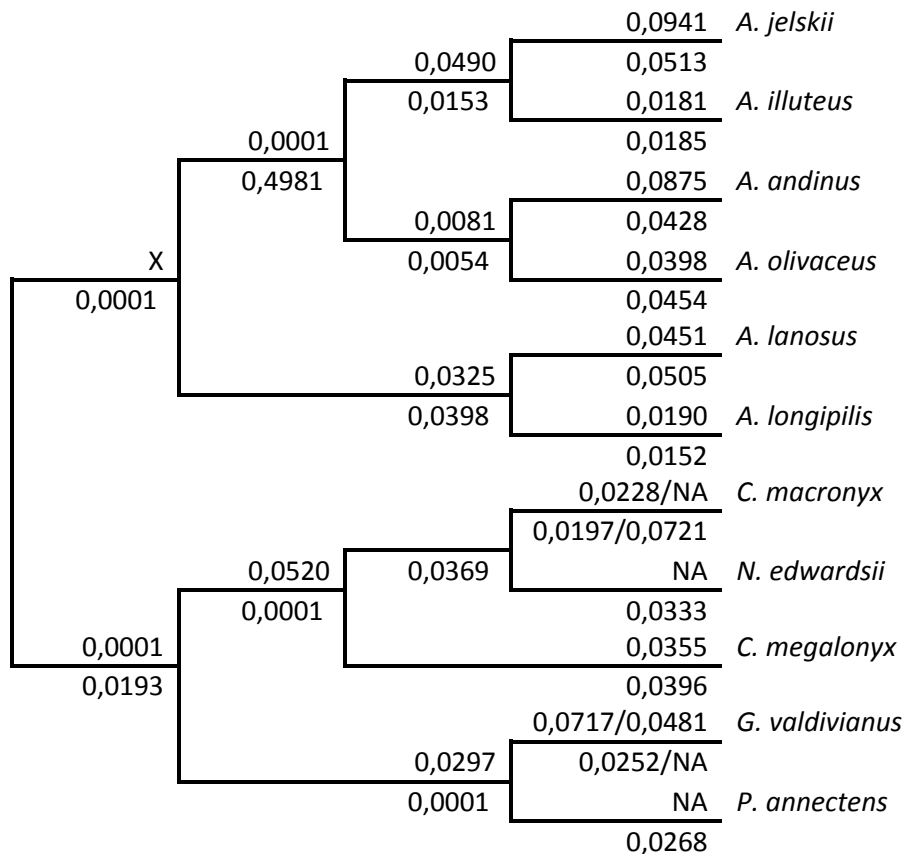


Figura 4. ω para cada una de las ramas internas y externas de la tribu Abrotrichini. Por encima de cada rama se indican los valores obtenidos a partir de la secuencia de 1134pb y por debajo los obtenidos a partir de 801pb incluyendo a *N. edwardsii* y *P. annectens*. "NA" indica los casos en los que no se tuvo en cuenta tal especie. En la rama terminal que lleva a *C. macronyx* se indican los valores de ω para un individuo que habitaba zonas bajas antes de la barra "/" y uno que lo hacía en la altura después. En el caso de *G. valdivianus* también se consideraron dos secuencias.

Tabla 2. Codones que los distintos métodos identificaron como candidatos a encontrarse bajo selección positiva.

Codón	Cambios	Rama	Método	Significancia
42	Met→Ile	<i>G. valdivianus</i> <i>A. jelskii</i>	MEME	p-valor=0,0063
	Ile→Gly	<i>G. valdivianus</i>		
43	Ile→Phe	<i>C. megalonyx</i>	REL	BF= 68,32
249	Val→Ile	<i>C. macronyx</i>	REL	BF= 53,47
281	Leu→Leu	(<i>A. andinus</i> , <i>A. olivaceus</i>)	IFEL	p-valor= 0,085
330	Ala→Ser	<i>Abrothrix</i> basal	MEME	p-valor=0,040
	Ser→Ala	(<i>A. illuteus</i> , <i>A. jelskii</i>)		
	Ser→Ser	<i>A. longipilis</i>		

Se indican cuál es el aminoácido que reemplaza cuál aminoácido (en los casos en que los cambios producen diferencias en las propiedades fisicoquímicas están indicados en negrita), en qué rama/s se producen tales cambios, por qué método se identificó y el valor que evalúa la significancia estadística.

Con las remarcables excepciones de *A. andinus* y *A. jelskii* que difirieron en los ω de sus ramas terminales por casi el doble cuando se los evaluó con sus secuencias completas (1134pb) e incompletas (801pb) – lo que recalca la acumulación mayor de cambios de reemplazo que de sustituciones sinónimas en los últimos 300pb en las secuencias de las dos especies con respecto a las otras – los valores de ω para las ramas terminales se mantuvieron dentro de un rango con diferencias sólo a nivel de las milésimas (Fig. 4). Las especies en cuyas ramas terminales los parámetros ω alcanzaron los valores más grandes fueron *A. jelskii* (1134pb), *A. andinus* (1134pb), *C. macronyx* habitando en zonas altas (801pb) y *G. valdivianus* (1134pb) con valores por sobre 0,07, mientras que los más chicos por debajo de los 0,02 tanto para 801pb como para 1134pb correspondieron a *A. illuteus*, *A. longipilis* y también *C. macronyx*, pero el de zonas bajas.

Selección por sitios.

Los distintos ensayos de selección por sitios mostraron que la gran mayoría de los codones se encuentran bajo selección negativa (Datos no mostrados) y cada uno descubrió sitios distintos bajo selección positiva para los valores de significancia evaluados (aunque en general al aumentar los valores mínimos de significancia los sitios se repitieron entre los distintos métodos), siendo cinco en total (Tabla 2). Dentro de los sitios bajo selección positiva, sólo aquellos detectados por MEME contienen cambios aminoacídicos que produjeron diferencias en las propiedades fisicoquímicas del codón

(Tabla 2). El método SLAC, que es el más conservador (Kosakovsy Pond & Frost, 2005), no permitió encontrar ningún sitio bajo selección positiva. Los sitios 281 y 330 contienen cambios que no son precisamente de reemplazo, pero que se los detectó como sitios bajo selección positiva por la necesidad de que hayan ocurrido dos cambios nucleotídicos para mantener la codificación para los mismos aminoácidos, y pueden, aunque no necesariamente, haber involucrado un cambio en la identidad del aminoácido en el transcurso; ambos codones son, además, los únicos que no son exclusivos de ramas terminales.

***Chelemys macronyx*: variación altitudinal a nivel poblacional.**

En vista del interesante contraste entre los ω de los *C. macronyx* de zonas altas y de zonas bajas (Fig. 4) se prosiguió con un análisis a nivel poblacional de esta especie. Con las secuencias parciales (780pb) del citocromo b de diez individuos de *C. macronyx* se reconstruyeron las relaciones genealógicas entre ellos. Los resultados coinciden con los presentados por Alarcón *et al* (2011), quienes definen dos clados: el norteño de altos Andes (NHA) y el sureño de altitud media-baja (SMLA) (Fig. 5).

En lo que respecta a las pruebas de selección, la diferencia de ω entre los dos clados (ω_{NHA} y ω_{SMLA}) mostró una gran disparidad entre ambos, siendo mayor ω_{NHA} (Tabla 3) en una proporción similar a la calculada previamente entre sólo dos secuencias (Fig. 4). Sin embargo el p-valor por χ^2 no alcanzó los valores de 0,05, por lo que no se descartaría el modelo nulo. No obstante, los valores de ω individuales para cada rama (ω_i) mostraron un valor de 0,0618 para la rama que lleva al clado NHA, 0,3474 para la terminal de

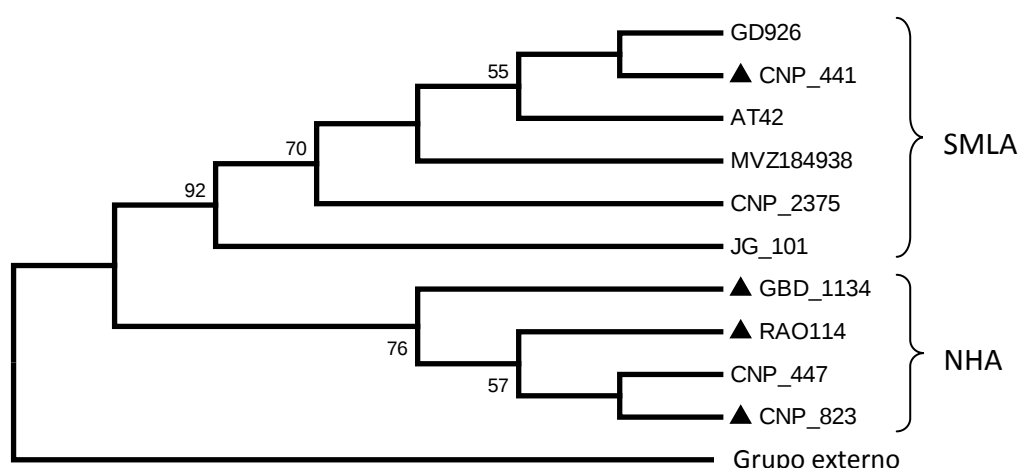


Figura 5. Reconstrucción filogenética por ML con la secuencia del citocromo b (780bp) de individuos de *Chelemys macronyx*. Los triángulos indican los individuos que fueron muestreados a una altitud de más de 2000m (Ver Tabla S3). “NHA” corresponde al clado norteño de altos Andes y “SMLA” el clado sureño de altitud media-baja según Alarcón *et al* (2011). Sobre los nodos se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 50.

Tabla 3. Resultados de la prueba de selección para la secuencia de la región codificante de 780pb del citocromo b de diez especímenes de *Chelemys macronyx* de diferentes localidades dentro de su distribución.

Modelo		ω	lnL	2 Δ
M0	ω_0	0,0390	-1218,94	
M2_{NHA/SMLA}	ω_{NHA}	0,0872	-1218,20	1,48
	ω_{SMLA}	0,0191		
M2_{h/nh}	ω_h	0,1502	-1215,37	7,14
	ω_{nh}	0,0001		
M2_{NHA+h/SMLA-h}	ω_{NHA+h}	0,0951	-1216,55	4,78
	ω_{SMLA-h}	0,0001		
M1	ω_i	-----	-1212,94	12,00

“lnL” indica el valor de logaritmo de la probabilidad y “ χ^2 ” la significancia (ver Métodos). “(DNM)” representa los datos no mostrados en la tabla, en el texto se resumen los más importantes. “ ω_0 ” refiere al dN/dS del modelo nulo (M0), “ ω_i ” al del modelo completo (M1), y los restantes subíndices de los ω refieren al de los modelos (M2) que incluyen a los clados NHA y SMLA (Fig. 4), a los especímenes colectados en regiones de más de 2000m (h) y a los colectados a menos de 2000m (nh), y a los dos clados con CNP_441 intercambiado (NHA+h y SMLA-h).

RAO114 del NHA y 0,1137 para la de CNP_441 del SMLA, siendo 0,0001 el de las restantes ramas. De forma interesante, cuando se verificó la altura a la que se muestrearon los especímenes de *C. macronyx* (Tabla S3), se observó que CNP_441, a pesar de ser del clado de altitud media-baja, habitaba una zona de 2200m de altura sobre el nivel del mar. Esto es una altitud prácticamente igual que la de CNP_823 (2240m) y considerablemente mayor que la de CNP_447, que ni siquiera alcanza los 2000m (1620m) (Tabla S3; Fig. 5), siendo ambos individuos del clado alto andino.

El paso siguiente fue el repetir las pruebas de selección en dos variantes: una incluyendo CNP_441 en un ω compartido con el clado NHA (ω_{NHA+h}) y removiéndolo del ω del clado SMLA (ω_{SMLA-h}), y la otra contrastando los especímenes obtenidos a altitudes de más de 2000m sobre el nivel del mar con las que lo fueron por debajo de ese valor (ω_h y ω_{nh} , respectivamente). Ambos modelos fueron significativamente mejores que el modelo nulo y generaron valores de ω mucho mayores cuando los parámetros incluyeron los especímenes de las zonas más altas (y CNP_447 en el caso de ω_{NHA+h}) (Tabla 3).

Las pruebas de selección por sitios del DataMonkey no lograron detectar ningún codón bajo selección positiva con los valores de significancia empleados, y sólo existen cuatro sustituciones en los primeros 267 codones de la secuencia del citocromo b: una en la rama de CNP_441, una común a todo el clado NHA, una exclusiva de RAO114 y otra

exclusiva de GBD_1134. Si bien ninguno involucra cambios en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos codificados, tampoco parecerían corresponder a uno de los sitios hipervariables según Irwin *et al* (1991).

Discusión

La reconstrucción de la historia evolutiva del gen del citocromo b no permite resolver con demasiada exactitud algunas de las relaciones entre especies por los bajos valores de *bootstrap* de determinados nodos. Una de las especies más conflictivas y cuyo posicionamiento filogenético podría tener implicancias conflictivas en el resultado del resto de los análisis es *Abrotrix lanosus*. Feijoo *et al* (2010) ya habían reconocido esta dificultad en los análisis moleculares, pero por estudios de morfología comparada concluyen que el grupo hermano de *A. lanosus* sería *A. longipilis* y no *A. jelskii*. Los resultados basados en la región codificante completa del citocromo b reafirman tal conclusión, puesto que *A. lanosus* se agrupa con *A. longipilis* y *A. jelskii* lo hace con *Abrotrix illuteus* (Fig. 2C). Esto brinda apoyo a la elección del árbol que fue usado en este trabajo para los restantes ensayos.

La norma en los resultados fue que los valores de los parámetros ω fueron invariablemente menores a 1, o sea que el número de cambios de reemplazo siempre fue superado por el de los cambios sinónimos. Consecuentemente, se ratifica el dominio de la selección purificadora actuando sobre la secuencia codificante del citocromo b. Sin embargo, la intensidad relativa de la selección purificadora no es globalmente homogénea: el número de cambios aminoacídicos en la secuencia varía entre las especies y entre distintas regiones de la proteína. En particular, la fosorialidad y la altitud, las dos variables candidatas a ser agentes selectivos por su asociación a la hipoxia, ofrecen dos patrones contrastantes en la evolución molecular del citocromo b de los Abrotrichini:

Fosorialidad

Cuando se permitió la variación de los parámetros de forma que hubiera un ω para los Abrotrichini fosoriales y otro para los no fosoriales, el modelo nulo fue el que prevaleció en todos los casos. Además, la diferencia entre los parámetros apoyaría la ausencia de adaptación en la secuencia del citocromo b producto de la fosorialidad. Más allá de la posibilidad de que las mutaciones proveedoras de una ventaja adaptativa simplemente no hubieran ocurrido, existen otras posibles razones que podrían fundamentar la baja fijación de cambios de reemplazo con respecto a los sinónimos en el clado fosorial:

- 1) Fosoriales, no subterráneos: los estudios de Pearson (1984) sobre *Chelemys macronyx*, *Geoxus valdivianus* y *Notiomys edwardsii* remarcaban el hecho de que si bien la existencia de adaptaciones morfológicas clásicas a los hábitos fosoriales definitivamente existen en estas especies, éstas son más bien moderadas. Además, las cuevas no son cerradas, sino abierta y es normal que los individuos tengan conductas cursoriales sin confinarse a sus madrigueras subterráneas (aunque es resaltable que *G. valdivianus* tiene un largo de garras relativo al tamaño corporal mayor incluso que la del topo *Scapanus latimanus*). Por estas razones, la presión ejercida por la hipoxia, que se presenta de una manera menos intensa por la extensión de las actividades en la superficie, puede no ser lo suficientemente fuerte o constante como para provocar la fijación de cambios adaptativos en un gen con los niveles de conservación que tiene el citocromo b. En los casos de animales con hábitos cavadores en los que se detectó una posible selección positiva actuando sobre el citocromo b, siempre se trató de especies subterráneas con un nivel mayor de adaptación para la vida bajo tierra como los tucu-tucus del género *Ctenomys* (Da Silva *et al*, 2009; Tomasco & Lessa, 2011), o los casos extremos de *Spalax ehrenbergi* (Nevo *et al*, 1999) y especies de ratas topo africanas de la familia Bathyergidae como *Heterocephalus glaber* (Da Silva *et al*, 2009).
- 2) Ventilación del suelo: El intercambio de gases con la atmósfera, de forma que se gane O₂ y se pierda CO₂ es esencial para la respiración radicular de las plantas y otros organismos subterráneos (Brady & Weil, 2008). La ventilación edafológica también presenta una importante limitante para la selección de los hábitats por parte de los roedores subterráneos y los efectos de la vegetación sobre la misma puede determinar sus distribuciones (Busch *et al*, 2000). Por ejemplo, Comparatore *et al* (1991) describieron que las zonas fisiológicamente más favorables para el roedor subterráneo *Ctenomys talarum* eran aquellas con una mayor densidad y altura de la vegetación. Si bien globalmente no se ha encontrado una correlación directa entre el flujo de gases del suelo y la abundancia vegetal, los bosques de *Nothofagus*, que habitan la mayoría de los Abrotrichini fosoriales, podrían ser indicadores y propiciadores de buenas condiciones subterráneas que amortigüen los efectos de la baja presión parcial de O₂ y la alta de CO₂. Para confirmar esta teoría serían necesarios estudios edafológicos e intracomunitarios de las interacciones dentro de los bosques Valdiviano y Magallánico.

- 3) Otras adaptaciones podrían ser suficientes: Una mayor densidad de capilares en los tejidos esquelético, cardíaco y pulmonar, una fracción mitocondrial mayor en células musculares y grandes cantidades de mioglobina, así como respuestas fisiológicas a nivel de la ventilación pulmonar, el bombeo cardíaco, la afinidad y capacidad de carga hematológica con respecto al oxígeno y el balance ácido-básico de la sangre son adaptaciones que muchas veces convergen en los roedores subterráneos como medidas para combatir la hipoxia y la hipercapnia asociada a su nicho (Buffenstein, 2000). La aparición en alguna medida de cualquiera de estas adaptaciones en los Abrotrichini podría haber resultado suficiente para lidiar con la hipoxia, por lo que la fijación de los cambios de reemplazo no deletéreos en la secuencia del citocromo b, al no generar ninguna ventaja diferencial, podría estar a la merced de la deriva génica exclusivamente.
- 4) Modificación en la rama basal: Más allá de no ser lo más parsimoniosamente probable, Rodríguez-Serrano *et al* (2008) han planteado la posibilidad de que el ancestro común a todas las especies dentro de la tribu Abrotrichini hayan tenido hábitos fosoriales y que estos se hayan perdido secundariamente en la rama basal al género *Abrothrix*. En el marco de esta hipótesis es posible que algún cambio adaptativo en la secuencia aminoacídica del citocromo b haya surgido en la rama basal a la tribu. Tal cambio podría haber favorecido en cierta medida la vida en los nichos hipóxicos, pero también puede haberse mantenido en las restantes especies por ser selectivamente neutros en condiciones normóxicas. Tales cambios son irreconocibles como adaptativos para los ensayos aquí realizados, pero podrían evaluarse por medio de ensayos que incluyan tribus filogenéticamente cercanas a la de los Abrotrichini para valorar el ω en la rama basal de la última.

Las cuatro posibles razones no son mutuamente excluyentes; puede ser que los Abrotrichini fosoriales no estén sobreexpuestos a condiciones hipóxicas, que sus madrigueras las construyan en suelos de buena ventilación, que hayan desarrollado alguna adaptación contra los ya mitigadamente bajos niveles de oxígeno, y que ya hubiera cierto grado de adaptación en su citocromo b.

Aunque se pueda afirmar que no existe una presión selectiva lo suficientemente fuerte actuando sobre el citocromo b de todo el clado fosorial, los ensayos no permiten evaluar a nivel individual en dos especies en particular, *C. macronyx* (que se discutirá más adelante) y *G. valdivianus*. Si bien la falta de *Pearsonomys annectens* en los ensayos de 1134pb puede ser la razón subyacente de los altos ω de las ramas terminales de *G.*

valdivianus y por tanto los resultados con 801pb que mostraron niveles ampliamente menores son los que deben ser considerados, es interesante la diferencia en los cambios de reemplazo entre los dos especímenes de *G. valdivianus* incluidos en los análisis, aún cuando ambos pertenecen al clado norteño identificado por Lessa *et al* (2010). Además, ambos especímenes presentaron cambios independientes en el codón 42, candidato a estar bajo selección positiva en el análisis por sitios y ramas, incluso con una variación en las propiedades bioquímicas del aminoácido en uno de los casos. Este mismo codón ha sido propuesto como un sitio candidato a encontrarse bajo selección positiva desestabilizadora en varios otros linajes independientes de roedores subterráneos (Tomasco & Lessa, 2011), en quirópteros de grandes requerimientos metabólicos (Shen *et al*, 2010), cetáceos (McLellan *et al*, 2005) y este trabajo muestra que también en *Abrothrix jelskii* de grandes altitudes. Todos estos resultados pueden implicar los cambios en el codón 42 en una optimización del papel del citocromo b en la cadena respiratoria, o pueden ser coincidencias fortuitas dentro de un sitio hipervariable como lo consideran Irwin *et al* (1991). Después de todo, en este caso los cambios sólo se encontraron en ramas terminales y no en basales.

Altitud

Los Abrotrichini de altitudes de más de 2000m tienen globalmente un mayor número de cambios de reemplazo en sus secuencias que los de zonas bajas, así como un mayor parámetro ω que en este caso incluye ramas polifiléticas. Estos patrones son consistentes con la selección direccional positiva o un relajamiento en la selección purificadora como consecuencia de la baja disponibilidad de oxígeno a grandes altitudes. Particularmente, *Abrothrix andinus* y *A. jelskii* son los que presentan los niveles más altos de ambas variables individualmente, así como también el mayor número de cambios aminoacídicos con alteraciones en las propiedades fisicoquímicas. *A. illuteus* en cambio muestra patrones más similares o incluso menores que los de los Abrotrichini de zonas bajas.

A. andinus y *A. jelskii* son exclusivos de zonas de altitudes considerables y alcanzan las más altas con un importante margen de diferencia sobre el resto de los Abrotrichini. *A. illuteus*, en cambio, aunque llegue a encontrarse entre 2000 y 3000m de altura sobre el nivel del mar, típicamente se lo encuentra sobre los 1000m principalmente entre 1800 y 2300m asociado a bosques de neblina (Jayat *et al*, 2008; Ortiz *et al*, 2011). Esto puede estar dado porque *A. illuteus* no se encuentre bajos regímenes constantes de baja presión de oxígeno como las otras dos especies y por eso no existan adaptaciones

mayores en la cadena respiratoria mitocondrial, también es posible que haya colonizado recientemente las regiones de mayor altitud y no haya transcurrido el tiempo suficiente para que ocurrieran o se fijaran mutaciones favorables, o que el flujo génico entre los que viven a grandes alturas y los que lo hacen a bajas sea tal que no permita la fijación de posibles cambios adaptativos. Un estudio a nivel poblacional de *A. illuteus* sería necesario para aclarar la historia biogeográfica de esta especie y la influencia del gradiente altitudinal andino sobre la misma. Asimismo, su estado de conservación según la IUCN es de casi amenazada (NT) por efectos de reducción antropogénica de la extensión y calidad de su hábitat (Jayat *et al*, 2008), por lo que las grandes altitudes podrían eventualmente servir de refugio y las adaptaciones a la hipoxia ser una necesidad.

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo son los patrones observados en el citocromo b entre los especímenes de *C. macronyx*, donde sólo se detectaron cambios de reemplazo en los especímenes del clado alto andino y en el único individuo del otro clado colectado a alturas superiores a los 2000m, dando valores de ω significativamente mayores con respecto al conjunto de los especímenes de zonas bajas. Si bien las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos luego de las sustituciones se mantienen, cabe la posibilidad de que la fijación de estos cambios sea producto de una relajación en la selección purificadora intraespecífica con un cierto grado de convergencia funcional entre el clado alto andino y la porción de los *C. macronyx* que se dispersaron a partir de los refugios glaciares patagónicos (Lessa *et al*, 2010; Alarcón *et al*, 2011) hasta las zonas de mayores altitudes al norte donde el otro clado ya se encontraba. De todos modos sería necesaria una evaluación más precisa con las secuencias completas del citocromo b. Después de todo, la ausencia de los últimos 300pb en los ensayos con 801pb podría haber ocultado la diferencia entre los ω de *A. jelskii* y *A. andinus* con el resto de la tribu de no ser por los realizados con los 1134pb. El seguimiento de esta subpoblación de *C. macronyx* podría brindar pistas importantes en el entendimiento del proceso de incursión en los nichos de grandes altitudes, así como en el proceso evolutivo de genes dominados por la selección purificadora (e.g. a través del análisis de la variación de frecuencias alélicas dentro de una población) en caso de solidificarse la hipótesis de la relajación de la misma en este caso en particular.

Los resultados presentados en relación a la altitud pueden ser efectivamente producto de una selección direccional como consecuencia de la demanda de una mayor eficiencia de los procesos metabólicos celulares por la baja disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, la selección positiva no es el único factor que puede explicar la variación en los ω entre las

especies de grandes y pequeñas altitudes, sino que también lo puede hacer un proceso estrictamente neutral como una constricción del tamaño poblacional efectivo, implicando un relajamiento en la selección purificadora (Yang & Bielawski, 2000; Fay & Wu, 2001; Yang, 2002; Tomasco & Lessa, 2011). Las condiciones a grandes altitudes son adversas, principalmente por la baja presión y la baja disponibilidad de oxígeno, pero también por la mayor variabilidad climática, grandes niveles de radiación UV y la relativamente baja abundancia y diversidad de alimentos (Hassanin *et al*, 2009). Por lo tanto, los patrones observados en las secuencias del citocromo b de *A. andinus*, *A. jelskii* y los *C. macronyx* de zonas altas pueden no ser consecuencia directa de la selección positiva, sino que pueden ser el resultado del haber atravesado un cuello de botella durante la incursión en las grandes altitudes. Para poder descartar las dilataciones demográficas como el factor propiciador de la acumulación de cambios de reemplazo en las especies de altura una posible herramienta sería el análisis a nivel de otros genes mitocondriales (Tomasco & Lessa, 2011). Debido a la falta de recombinación en el cromosoma mitocondrial, los genes incluidos en el mismo están completamente ligados. Por lo tanto, si los patrones observados en el citocromo b de los Abrotrichini de grandes alturas son por causa de reducciones en el tamaño poblacional, todos los genes mitocondriales codificantes de proteínas deberían de presentar comportamientos similares. Si, por el contrario, la selección positiva es la causa, es esperable que sólo algunos de los genes implicados en el metabolismo celular lo hagan.

Conclusión

Este estudio reafirma la dominancia de la selección purificadora sobre la secuencia del citocromo b y prueba que la de los Abrotrichini fosoriales, por algún motivo u otro, no parecerían haber sufrido adaptaciones asociadas a las demandas fisiológicas de la vida subterránea en este gen. Los Abrotrichini de grandes altitudes en cambio presentan una tasa de fijación de cambios de reemplazo en relación a los sinónimos mayor que los de zonas más bajas. Esto podría ser producto de una adaptación a la hipoxia asociada a las grandes alturas, pero también podría ser el resultado de un relajamiento de la selección purificadora por constricciones demográficas de las especies durante la colonización de las montañas. Para descartar una u otra posibilidad se puede repetir la evaluación aplicándola a un mayor número de genes mitocondriales.

Referencias

- Alarcón, O., D'Elia, G., Lessa, E.P. & Pardiñas U.F.J. (2011) Phylogeographic Structure of the Fossorial Long-Clawed Mouse *Chelemys macronyx* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Zoological Studies*, 50(5): 682-688
- Álvarez-Valín, F. (2000) Evolución molecular: neutralismo y seleccionismo. En *El prisma de la evolución*, editado por Altuna, C. & Ubilla, M., Capítulo 12: 243-359. Facultad de Ciencias, Udelar.
- Arieli, R. (1990) Adaptation of the mammalian gas transport system to subterranean life. En *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Level*, editado por Nevo, E & Reig, OA, 251-268. *Progress in clinical and Biological Research*, vol. 335. Nueva York: Wiley-Liss.
- Baillie, K. (2010) Altitude air pressure calculator. En: http://www.altitude.org/air_pressure.php, tomado el 13/11/2012.
- Brady, N. C. & Weil, R. R. (2008) The nature and properties of soils. Capítulo 7: 266-283. *Pearson Prentice Hall*, Nueva Jersey, EEUU.
- Buffenstein, R. (2000) Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habits. En *Life underground: the biology of subterranean rodents*, editado por Lacey, E. A.; Patton, J. L. & Cameron, G. Y., Capítulo 2: 62-110. *The University of Chicago Press*, Chicago, USA y Londres, UK.
- Busch, C.; Antinuchi, C. D.; del Valle, C.; Kittlein, M. J.; Malizia, A. I., Vasallo, A. I. & Zenuto, R. R. (2000) Population ecology of subterranean rodents. En *Life underground: the biology of subterranean rodents*, editado por Lacey, E. A.; Patton, J. L. & Cameron, G. Y., Capítulo 5: 183-226. *The University of Chicago Press*, Chicago, USA y Londres, UK.
- Castresana, J. (2001). Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 465–471.
- Comparatore, V. M., Maceira, N. & Busch, C. (1991) Habitat relations in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha: Octodontidae) in a natural grassland. *Zeitschrift für Säugetiere*, 56: 197- 206.
- Da Silva, C.C.; Tomasco, I.H.; Hoffman, F. G. & Lessa E. P. (2009) Genes and Ecology: Accelerated Rates of Replacement Substitutions in the Cytochrome b Gene of Subterranean Rodents. *The Open Evolution Journal*, 3: 17-30.
- D'Elia, G. (2003) Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics*, 19: 307–323.
- Fay, J. C. & Wu, C. (2001) The neutral theory in the genomic era. *Genomes and Evolution*: 642-646.
- Feijoo, M., D'Elia, G., Pardiñas, U. F. J. & Lessa, E. P. (2010) Systematics of the southern Patagonian-Fuegian endemic *Abrothrix lanosus* (Rodentia: Sigmodontinae): Phylogenetic position, karyotypic and morphological data. *Zeitschrift für Säugetiere*, 75: 122- 137.
- Futuyma, D. (2009) Genetic Drift: evolution at random. En *Evolution*, capítulo 10: 256-277. *Sinauer*, Massachusetts, EEUU.

- Hassini, A., Ropiquet, A., Couloux, A. & Cruaud, C. (2009) Evolution of the Mitochondrial Genome in Mammals Living at High Altitude: New Insights from a Study of the Tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae). *Journal of Molecular Evolution*, 68: 293-310.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1991) Evolution of cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Jayat, J., Pardinas, U. & Ojeda, R. (2008) *Abrothrix illuteus*. En: *IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2*. <www.iucnredlist.org>. Consultado el 3 de diciembre de 2012.
- Kosakovsky Pond, S. L. & Frost, S. D. W. (2005a) Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics*, 21: 2531-2533.
- Kosakovsky Pond, S. L. & Frost, S. D. W. (2005b) Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1208-1222.
- Kosakovsky Pond, S. L., Frost, S. D. W., Grossman, Z., Gravenor, M. B., Richman, D. D. & Brown, A. J. L. (2006) Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. *PLoS Computational Biology* 2: e62.
- Lessa, E.P., D'Elia, G. & Pardiñas, U.F.J. (2010) Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Molecular Ecology*, 19: 3031–3037.
- McLellan, D. A., Palfreyman, E. J., Smith, M. J., Moss, J. L., Christensen, R. G. & Sailsbery, J. K. (2005) Physicochemical Evolution and Molecular Adaptation of the Cetacean and Artiodactyl Cytochrome *b* Proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3): 437-455.
- Murrell, B., Wertheim, J. O., Moola S., Weighill, T., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S. L. (2012) Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLoS Genetics*, 8(7): e1002764.
- Nevo, E. (1979) Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10: 269-308.
- Nevo, E., Beiles, A. & Spradling, T. (1999) Molecular evolution of cytochrome *b* of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel. *Journal of Molecular Evolution*, 49: 215- 226.
- Novoa, F. F., Ruiz, G. & Rosenmann, M. (2003) El oxígeno y la vida en alta altitud: adaptaciones en vertebrados terrestres. En *Fisiología ecológica y evolutiva*, editado por Bozinovic, F., 227-246. *Ediciones Universidad Católica de Chile*, Santiago, Chile.
- Ortiz, P.E., Jayat, J.P. & Pardiñas, U.F.J. (2011) Fossil sigmodontinae rodents of Northwestern Argentina. En *Cenozoic Geology of Central Andes of Argentina*, editado por Saltify, JA & Marquillas, RA, 301-316. *SCS Publisher*, Salta, Argentina.
- Pearson, O. P. (1984) Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *Journal of Zoology, The Royal Society of London*, 202: 225-237.
- Rodríguez-Serrano, E., Palma, R. E. & Hernández, C. E. (2008) The evolution of ecomorphological traits within the Abrothrichini (Rodentia: Sigmodontinae): A bayesian phylogenetics approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 473–480.

Rosenmann, M. & Ruiz, G. (1993) Seasonal changes of blood values in the Andean mouse *Abrothrix andinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105: 119-123.

Smith, F. M. & Patton, J. L. (1999) Phylogenetic Relationships and the Radiation of Sigmodontine Rodents in South America: Evidence from Cytochrome *b*. *Journal of Mammalian Evolution*, 6: 89-128.

Stein, B. R. (2000) Morphology of subterranean rodents. En *Life underground: the biology of subterranean rodents*, editado por Lacey, E. A.; Patton, J. L. & Cameron, G. Y., Capítulo 1: 19-61. *The University of Chicago Press*, Chicago, USA y Londres, UK.

Stewart J. B.; Freyer, C.; Elson, J. L. & Larsson, N-G.(2008) Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nature Reviews Genetics* 9: 657-662.

Teta, P., Pardiñas, U.F.J. & D'Elia, G. (2006) "Abrotrichinos". En *Mamíferos de Argentina: Sistemática y Distribución*, editado por Barquez, RM, Díaz, MM & Ojeda, RA, 192-197. *SAREM*, Tucumán, Argentina.

Tomasco, I. H., Del Río, R., Iturriaga, R. & Bozinovic, F. (2010) Comparative respiratory strategies of subterranean and fossorial octodontid rodents to cope with hypoxic and hypercapnic atmospheres. *Journal of Comparative Physiological Biology*, 180: 877-884.

Tomasco, I. H. & Lessa, E. P. (2011) The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 64–70.

Wagner, A. (2008) Neutralism and selectionism: a network based reconciliation. *Nature Reviews Genetics*, doi:10.1038/ngr2473.

Yang, Z. (2002) Inference of selection from multiple species alignments. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12: 688-694.

Yang, Z. (2007) PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1586-1591.

Yang, Z & Bielawski, J. P. (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Tree*, 15: 496- 503.

Anexos

1) PCR.

Dado que las secuencias para el *cytb* de *Notiomys edwardsii* y *Pearsonomys annectens* no comprendían el gen en su totalidad, estas se intentaron completar a partir de tejidos (Con voucher G5T01 y FML 672 respectivamente) de cada una de las especies. De la misma forma también se obtuvieron secuencias a partir muestras correspondientes a dos individuos de la especie *Chelemys macronyx*, uno muestreado en una localidad con una gran altura sobre el nivel del mar (RAO114) y el otro en una zona más bien baja (IEE5463). El primer paso correspondió a la destrucción mecánica de los tejidos disponibles, con el fin de facilitar el acceso a los contenidos intracelulares. Posteriormente se adicionaron disolventes para lisar las membranas e isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos por centrifugación, que luego fueron resuspendidos por un lavado con etanol. La concentración de ADN en cada muestra se estimó utilizando un Nanodrop ASP-3700, para luego producir las diluciones de 4µg/ml a utilizarse para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se intentó amplificar la región del genoma mitocondrial que incluye la región del gen del *cytb* ausente en las obtenidas del NCBI a partir de las muestras de ADN extraídas. Para ello se utilizaron las combinaciones de los cebadores MVZ05 (CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G) con TDKD (CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG) y MVZ05 con MVZ14 (GGT CTT CAT CTY HGG YTT ACA AGA C) y se probaron distintas concentraciones de Mg₂Cl entre 1,5mM y 4mM cada 0,5mM para buscar la más apropiada para las secuencias de las muestras. Las concentraciones de los restantes componentes de la reacción se mantuvieron constantes: Buffer de reacción 1X, 0,3mM de cada dNTP, 0,2µM de cada cebador y 0,080 unidades por µl de Taq Polimerasa Platinum. Se produjo una mezcla madre con un volumen neto de 62,5µl, a partir de la cual se transfirieron 12,5µl a otros cuatro tubos a los cuales se les agregaron otros 12,5µL de la dilución a 4µg/ml de cada una de las muestras con ADN; a los restantes 12,5µl de la mezcla madre se les agregó un igual volumen de agua para que sirviera de control negativo. Las condiciones programadas en el termociclador fueron: 94°C por 3min en la desnaturalización inicial; 94°C por 0,30seg, 55°C por 0,30seg y 72°C por 1min en 35 ciclos; y 72°C por 5min para permitir la extensión final de las copias.

2) Tabla S1.

Tabla S2. Características de las secuencias de citocromo b (Cytb) e IRBP utilizadas y detalles de su procedencia.

Especie	Cytb			IRBP		
	Acceso	pb	Ref	Acceso	pb	Ref
- <i>Abrothrix andinus</i>	AF108671	1144	A	AY277418	759	B
- <i>Abrothrix olivaceus</i>	AY275111	1140	B	AY277421	759	B
- <i>Abrothrix jelskii</i>	AY275114	1140	B	AY277442	759	B
- <i>Abrothrix longipilis</i>	GU564006	1144	C	AY277419	759	B
- <i>Abrothrix illuteus</i>	HQ189528	1137	D	HQ189529	1155	D
- <i>Abrothrix lanosus</i>	EU683432	1178	E	EU683430	759	E
- <i>Chelemys macronyx</i>	U03533	1144	A	AY277441	759	B
RAO114	HM167839	800	F			
CNP441	JF706715	801	G			
GBD1134	JF706710	801	G			
CNP447	JF706713	801	G			
CNP823	JF706714	801	G			
JG101	JF706709	801	G			
GD926	HM167826	801	F			
CNP2375	JF706717	801	G			
AT42	HM167825	801	F			
MVZ184938	HM167835	800	F			
- <i>Chelemys megalonyx</i>	DQ309559	1112	H	EU091259	760	H
- <i>Notiomys edwardsii</i>	U03537	801	A	AY163602	759	B
- <i>Pearsonomys annectens</i>	AF108672	801	A	AY851749	759	B
- <i>Geoxus valdivianus</i>	AY275116		B	AY277448	759	B
	U03531	1144	A			
- <i>Phyllotis xanthophyus</i>	AY275128	1140	B	AY163632	759	B
- <i>Wiedomys pirrorhinos</i>	AY275134	1140	B			
- <i>Akodon azarae</i>	EF622507	1140	I	AY277422	759	B

“Acceso” refiere al código de acceso de la secuencia en el GenBank, “pb” al número de pares de base que conforman las secuencias, y “Ref” al trabajo original en el que se usaron las secuencias, las letras refieren a cada uno de los siguientes trabajos: A) Smith & Patton (1999), B) D’Elia (2003), C) Palma *et al* (2010), D) Teta *et al* (2010), E) Feijoo *et al* (2010), F) Lessa *et al* (2010), G) Alarcón *et al* (2011), H) Rodríguez-Serrano *et al* (2008), I) Pardiñas *et al* (2005).

3) Tabla S2.

Tabla S2. Sustituciones de reemplazo que involucran una variación en las propiedades fisicoquímicas.

Codón	Cambio	Rama	Ubicación
2	Gln→Ala	<i>N. edwardsii</i> <i>A. lanosus</i> <i>A.jel-A.ill</i>	Mz
23	Gln→Ala	<i>G. valdivianus</i> (2) <i>A. andinus</i>	Mz
25	Ser→Pro	<i>C. macronyx</i> (2)	Mz
29	Ser→Ala	<i>C. macronyx</i> (2)	Mz
42	Ile→Gly	<i>G. valdivianus</i>	TM
107	Tyr→Phe	<i>N. edwardsii</i> <i>G. valdivianus B</i>	Mz
108	Met→Gln	<i>C. macronyx</i> (L)	Mz
110	Ser→Pro	<i>A. longipilis</i>	Mz
190	Gln→Met	<i>G. valdivianus</i>	TM
	Gln→Ala	<i>A. illuteus</i> <i>N. edwardsii</i>	
213	Ser→Pro	<i>A. longipilis</i>	Mz
214	Asn→Asp	<i>G. valdivianus B</i> <i>A. lan-A.lon</i> <i>A. jelskii</i>	Mz
266	Ala→Gln	<i>C. megalonyx</i>	IM
303	Ala→Gln	<i>C. megalonyx</i> <i>A. jelskii</i> <i>A. andinus</i>	TM
308	Asn→Lys	<i>A. andinus</i>	TM
309	Ser→Phe	<i>A. longipilis</i>	TM
323	Equivocal		
330	Ala→Ser	<i>Abrothrix</i> basal	TM
	Ser→Ala	<i>A.jel-A.ill</i>	
345	Tyr→ Lys	<i>G. valdivianus</i>	TM
349	Gln→Met	<i>C.mac-C.meg-N?</i>	TM
356	Ile→Ser	<i>A. jelskii</i>	TM
357	Leu→Ser	<i>A. andinus</i>	TM
371	Met→Gln	<i>A. olivaceus</i>	TM
375	Asn→Asp	<i>A. jelskii</i>	TM

“Mz” indica que el cambio ocurrió en el dominio del citocromo b ubicado en la matriz mitocondrial, “IM” en el espacio intermembrana y “TM” en la porción incluida en la membrana interna.

4) Tabla S3.

Tabla S3. Especímenes de *Chelemys macronyx* con sus respectivas altitudes de colecta y características atmosféricas.

	Altitud (m)	Clado	%	P (mmHg)
RAO114	2570	NHA	74	563,91
CNP441	2200	SMLA	78	593,98
GBD1134	2450	NHA	75	571,43
CNP447	1620	NHA	83	631,58
CNP823	2240	NHA	77	586,47
CNP440	1070	SMLA	89	676,69
JG101	25	SMLA	100	759,40
GD926	330	SMLA	96	729,32
CNP2375	1040	SMLA	89	676,69
AT42	1380	SMLA	85	646,62
MVZ	1540	SMLA	84	639,10

Los especímenes están nombrados siguiendo a Alarcón *et al* (2011), de donde además se tomaron las coordenadas para conocer las altitudes de colecta. La altitud se indica en metros. “NHA” indica la pertenencia al clado norteño de los altos Andes y “SMLA” el sureño de altitudes medio-bajas. “%” corresponde al porcentaje de disponibilidad de oxígeno en relación a nivel del mar. “P” se refiere a la presión barométrica medida en mmHg a tales altitudes.