

**Posibles mecanismos genómicos de
aislamiento postcigótico en especies
del género *Austrolebias*
(Cyprinodontiformes, Rivulidae)**

Sebastián Oviedo Alcoba

Licenciatura en Ciencias Biológicas – Opción Genética

2009



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Sección Genética Evolutiva

Posibles mecanismos genómicos de aislamiento
postcigótico en especies del género *Austrolebias*
(Cyprinodontiformes, Rivulidae)

Sebastián Oviedo Alcoba

El siguiente trabajo fue realizado en la Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR.

Orientador: Dra. Graciela García (Secc. Genética Evolutiva)

Evaluadores: Dra. Nibia Berois (Secc. Biología Celular)
Dr. Marcelo Loureiro (Secc. Vertebrados)

AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora, Graciela García, por su contribución en mi formación académica, por apoyarme en todo momento y por depositar en mí la confianza para participar en diferentes proyectos en el laboratorio.

A Marcelo Loureiro no sólo por evaluar este trabajo si no también por su ayuda incondicional en el transcurso de la pasantía y por capacitarme en el trabajo en el acuario.

A Nibia Berois por aceptar evaluar este trabajo y por sus subsecuentes sugerencias.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Laura, Julia, Verónica, Silvana, Mareney, María y Daniela, en este momento algunas aquí y otras en el exterior de país, por su apoyo constante, por su ayuda en todos los aspectos de la vida y por incentivarme en todo momento.

A todos los integrantes de Genética Evolutiva y Virología por hacer del quinto piso un lugar agradable para estar.

A todos mis amigos, de facultad, liceo, Parque del Plata y Punta del Diablo, por estar siempre en los buenos y malos momentos.

A mi familia por bancarme y respaldarme en todas las etapas de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
Características y distribución geográfica del género <i>Austrolebias</i>	1
Relaciones filogenéticas del género <i>Austrolebias</i>	3
Posibles eventos de especiación	5
Barreras de aislamiento reproductivo.....	7
Hibridación y recombinación	8
Mapeo genético	9
Marcadores moleculares.....	10
Hipótesis de trabajo	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Especímenes y diseño de cruzamientos	12
Extracción y amplificación del ADN	15
Análisis de los datos	16
<i>Elección de individuos</i>	16
<i>Matrices de datos</i>	17
<i>Índices de polimorfismo</i>	17
<i>Análisis de clusters</i>	18
<i>Construcción de grupos de ligamiento</i>	18
RESULTADOS.....	19
Diseño de cruzamientos	19
Extracción del ADN y amplificación de marcadores RAPDs.....	19
Análisis de los datos	20
<i>Marcadores específicos</i>	20
<i>Índices de polimorfismo</i>	20
<i>Análisis de clusters</i>	21
<i>Grupos de ligamiento</i>	22
DISCUSIÓN.....	27
Diseño de cruzamientos	27
Amplificación del ADN mediante la técnica de RAPD	27

Análisis de clusters.....	28
Grupos de Ligamiento.....	29
Reordenamientos cromosómicos.....	30
Especiación.....	31
Diferencias sexo específico en la recombinación	32
Aislamiento reproductivo.....	33
Perspectivas.....	33
REFERENCIAS.....	34
ANEXO I - INDIVIDUOS.....	43
ANEXO II - PROTOCOLOS.....	44
Extracción de ADN para PCR sin fenol-cloroformo	44
Gel de agarosa 1%.....	44
Gel de acrilamida 6%	45
Tinción con Nitrato de Plata.....	45

RESUMEN

La región Neotropical presenta el mayor número de especies de peces dulceacuícolas del planeta, siendo la familia Rivulidae uno de los taxa con mayor diversidad específica de esta región. El género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) constituye un grupo endémico de peces anuales neotropicales cuya taxonomía ha sido objeto de controversia en los últimos años debido a su gran variabilidad morfológica, cromosómica y genómica, acompañada de recientes eventos de especiación. Estos se caracterizan por vivir en charcos temporales y poseer un ciclo de vida anual, con presencia de sucesivas diapausas reguladas por factores ambientales y genéticos y se distribuyen desde el noreste de Brasil hasta el noreste y sur de Argentina, Uruguay y Paraguay. El objetivo de este trabajo es intentar dilucidar la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo entre tres especies parapátricas del género *Austrolebias* mediante un diseño experimental de cruzamientos interespecíficos entre individuos de *Austrolebias viarius*, *A. charrua* y *A. reicherti*. Como resultado de dicho diseño, del cruzamiento correspondiente a ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* se obtuvieron 2 descendientes híbridos, mientras que para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* se obtuvo una progenie híbrida viable y significativa en número (25 individuos luego de 3 generaciones) lo que permitió continuar con sucesivas retrocruzas con ambos parentales. Posteriormente, mediante la técnica de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) se identificaron marcadores exclusivos en cada una de las especies y en los híbridos viables, a los efectos de determinar grupos de ligamiento con marcadores específicos y mapear regiones genómicas que se pueden asociar a posibles barreras reproductivas. En una primera etapa, teniendo en cuenta solamente la descendencia de las hembras híbridas se obtuvieron un total de 138 marcadores los que constituyeron un total de 10 grupos de ligamiento. Dentro de éstos un grupo está formado únicamente por marcadores de *A. charrua*, otro únicamente por marcadores de *A. reicherti* y los restantes por mosaicos de ambos genomas. Además se pudieron identificar 8 marcadores específicos para *A. charrua* y 2 marcadores para *A. reicherti*. Por último, se analizaron la totalidad de los individuos en el cual se obtuvieron 197 marcadores distribuidos en 17 grupos de ligamiento, 10 formados únicamente por *A. charrua* y 7 únicamente por *A. reicherti*. En este análisis no se obtuvieron grupos formados por mosaicos de ambos genomas. La ausencia de grupos de ligamiento formados por mosaicos de ambos genomas puede deberse a la ausencia de bloques recombinantes asociados a reordenamientos cromosómicos que impidan la recombinación entre los genomas de *A.*

charrua y *A. reicherti*. Dichos procesos podrían representar mecanismos de aislamiento reproductivo postcigóticos entre dichas especies.

INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta existen alrededor de 25.000 especies dentro de los Teleósteos constituyendo más de la mitad de la biodiversidad total de vertebrados (Nelson, 1994). Aproximadamente 8.000 de dichas especies se encuentran en la región Neotropical (Schaefer, 1998) la que comprende casi la totalidad del continente Sudamericano. Según Vari & Malabarba (1998) esta región presenta asimismo el mayor número de especies dulceacuícolas del planeta, estimado actualmente en 5.500 especies, a pesar de que los sistemas hidrológicos neotropicales representan solamente el 0.003 % del total de agua del planeta. Esta gran biodiversidad se debe en mayor medida a la compleja historia geológica del continente (levantamiento de la cordillera de los Andes, unión con Centro América, formación de refugios Pleistocénicos, etc.) lo que facilitó la diversificación de organismos acuáticos durante el Cretácico tardío y el Cenozoico en los dinámicos y cambiantes ríos sudamericanos (Ribeiro, 2006).

Características y distribución geográfica del género Austrolebias.

Uno de los grupos neotropicales más biodiversos es el correspondiente al orden Cyprinodontiformes (Vari & Malabarba, 1998). Dentro de este orden se destaca la familia Rivulidae la cual comprende varios géneros de peces con ciclos de vida anuales, único en los vertebrados. Los peces anuales o “killifishes” se caracterizan por vivir en charcos temporales formados en el período de lluvias. Durante la época de reproducción las hembras depositan los huevos en la turba formada en el fondo de los charcos y luego los machos se introducen en ésta fecundando los huevos. Al sobrevenir la época de seca, los charcos se desecan, los peces adultos y juveniles mueren y los huevos permanecen en estado de latencia eclosionando luego con la llegada de las primeras lluvias. Estos huevos presentan una capa coriónica externa de gran grosor que les permite sobrevivir a las condiciones ambientales extremadamente variables a las que se ven expuestos (Loureiro & de Sá, 1996, 2000). Asimismo el embrión durante su desarrollo presenta tres sucesivas diapausas aparentemente reguladas tanto por factores ambientales como genéticos (Wourms, 1972a; Arezo *et al.*, 2005). Dicha estrategia les permite retardar el momento de la eclosión si las condiciones ambientales son desfavorables. Este proceso en conjunto tiene como consecuencia la ausencia de solapamiento en las diferentes generaciones.

El género *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) constituye un grupo endémico de peces anuales neotropicales que se distribuye desde el noreste de Brasil hasta el

noreste y sur de Argentina, Uruguay y Paraguay. Varias de las especies que lo comprenden se encuentran distribuidas en los “Bañados del Este” de Uruguay, área declarada sitio de Reserva de la Biósfera (UNESCO 1976), la cual presenta una compleja historia geológica marcada por numerosas transgresiones y regresiones marinas durante el Pleistoceno Superior y Holoceno (Sprechmann, 1980). Dentro de éstas se encuentran *Austrolebias viarius* y tres especies pertenecientes al complejo *A. adloffii* (García *et al.*, 2000, 2001, 2002a, 2002b): *A. charrua* (Costa & Cheffe, 2001), *A. reicherti* (Loureiro & García, 2004) y *A. arachan* (Loureiro *et al.*, 2004). Este complejo también incluye cuatro especies distribuidas en Río Grande do Sul, Brazil: *A. adloffii* (Ahl, 1922), *A. minuano* (Costa & Cheffe, 2001), *A. nigrofasciatus* (Costa & Cheffe, 2001) y *A. nachtigalli* (Costa, 2006) (fig. 1). La taxonomía de este género ha sido objeto de controversia en los últimos años debido a su gran variabilidad morfológica, cromosómica y genómica, acompañada de recientes eventos de especiación (García *et al.*, 2000, 2001, 2004).



Figura 1. Distribución geográfica de *Austrolebias viarius*, *A. charrua* y *A. reicherti*. Se señalan los diferentes charcos temporales en los cuales fueron colectados los especímenes utilizados en el diseño de cruzamientos (tomado de García *et al.*, 2004).

Relaciones filogenéticas del género *Austrolebias*.

Mediante análisis filogenéticos con marcadores mitocondriales (*cit b* y los genes de ARNr 12s y 16s) García *et al.* (2002) evidencian el origen monofilético de la subfamilia Cynolebiatine soportado por un gran apoyo estadístico (fig. 2). Posteriormente (García, 2006) determina la existencia de dos clados hermanos, un clado mayor y monofilético constituido por especies del complejo *A. adloffii* y el restante comprendido por haplotipos de *A. viarius* (fig. 3). Los diferentes análisis filogenéticos realizados en dicho trabajo concluyen que *A. viarius* se sitúa como un taxón hermano y basal con respecto a las especies del complejo *A. adloffii*. Asimismo, dentro de este complejo *A. charrua* y *A. reicherti* se sitúan como especies hermanas donde *A. reicherti* constituye un clado monofilético mientras que *A. charrua* aparece como un taxón compuesto por una politomía basal sin resolver en forma de estrella. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos mediante la utilización de los marcadores nucleares RAPDs (García *et al.*, 2004) donde los individuos correspondientes a *A. charrua* y *A. reicherti* confluyen de forma conjunta en una politomía basal (fig. 4). Además, mediante la utilización de genes mitocondriales todos los individuos pertenecientes al charco 54 (posible zona de contacto entre ambas especies dadas sus distribuciones, fig. 1) quedan incluidos dentro de *A. charrua* (fig. 3) mientras que el análisis de RAPDs agrupa a algunos de estos individuos con *A. reicherti* (fig. 4).

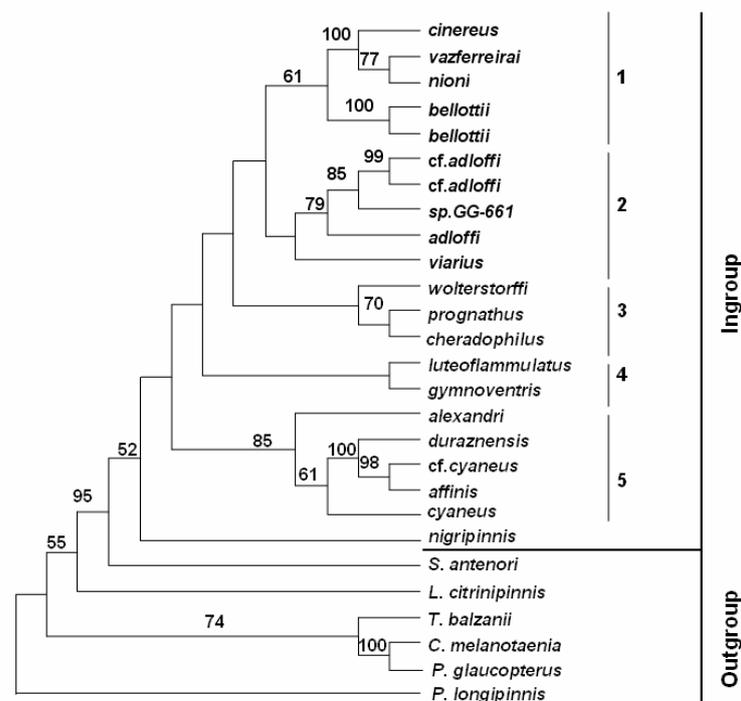


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre especies de *Austrolebias* utilizando secuencias de citocromo b con análisis de búsqueda heurística mostrando el origen monofilético del género. Se muestran los valores de bootstrap mayores de 50% en los nodos relevantes (tomado de García *et al.*, 2002).

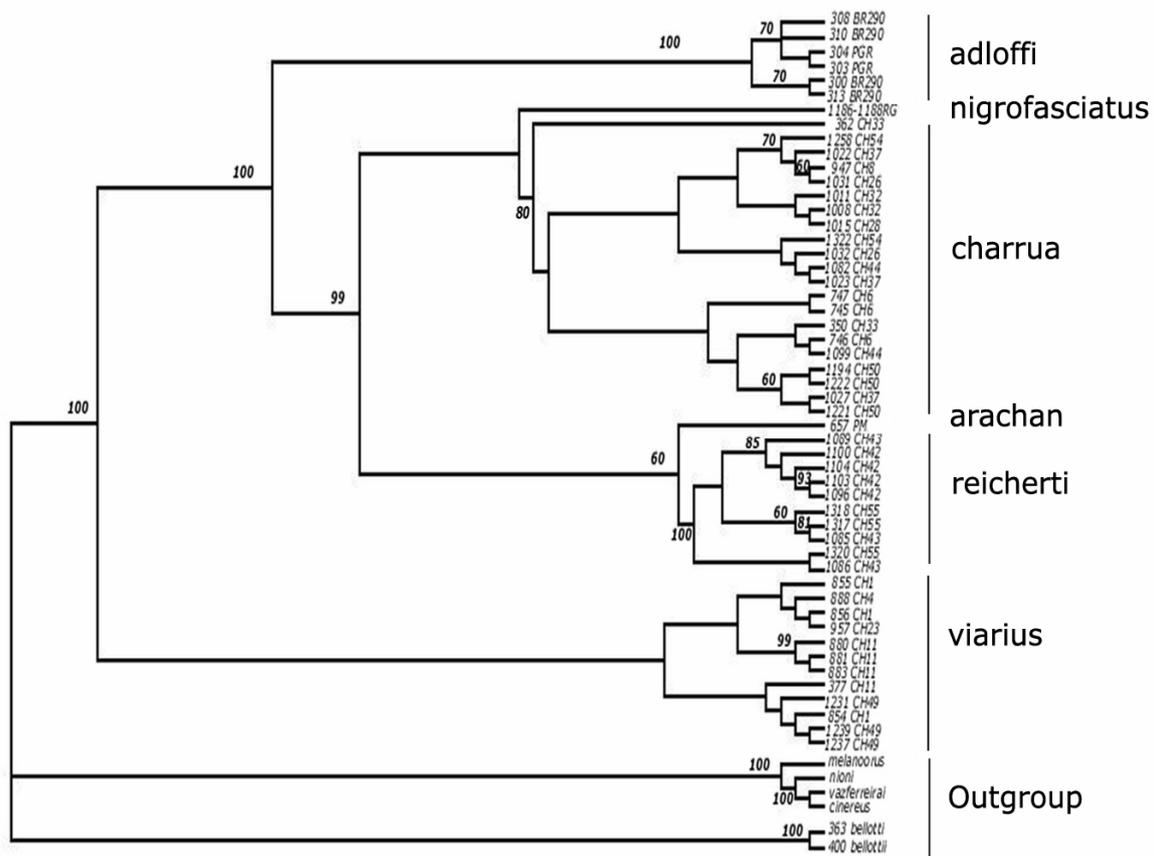


Figura 3. Árbol consenso generado por análisis de parsimonia con 63 secuencias de *cyt b* pertenecientes a diferentes especies de *Austrolebias*. *Austrolebias viarius* se sitúa como un taxón hermano y basal con respecto a las especies del complejo *A. adloffii*. *Austrolebias reicherti* constituye un clado monofilético mientras que *A. charrua* presenta una politomía basal. Se muestran los valores de bootstrap mayores al 50% en los nodos. Cada individuo está identificado en el árbol por su número de catálogo seguido por el correspondiente número de charco (tomado de García, 2006).

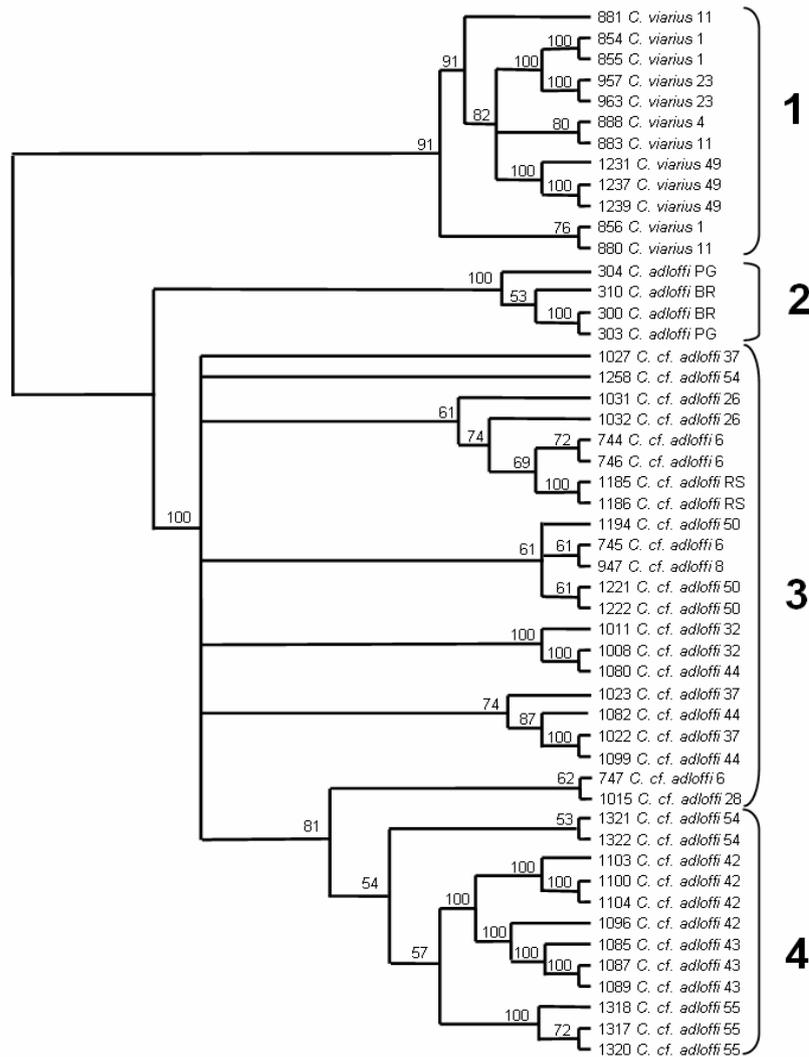


Figura 4. Análisis filogenético de parsimonia realizado mediante la utilización de marcadores nucleares RAPDs. Se observan cuatro clusters de acuerdo a los valores de bootstrap obtenidos. Los individuos correspondientes a *A. charrua* (3) y *A. reicherti* (4) confluyen de forma conjunta en una politomía basal. Cada individuo está identificado en el árbol por su número de catálogo seguido por su correspondiente taxón y el número de charco (tomado de García *et al.*, 2004). BR y PG: muestras de Rio Grande do Sul, Brazil.

Posibles eventos de especiación.

Según Brooks & McLennan (1991) los procesos de especiación no producen meramente especies sino que producen especies hermanas, por lo que no se pueden formular hipótesis acerca de los modos de especiación basados en una única especie. Los mismos no pueden ser estudiados sin antes haber determinado las relaciones de “hermandad” en el sistema de interés (Loureiro, 2004). Basándose en la distribución geográfica, análisis filogenéticos con ADNmt y marcadores nucleares, así como estudios citogenéticos, García *et al.* (2004) y García (2006) plantean la hipótesis de posibles introgresiones por hibridación entre taxones hermanos del complejo *A. adloffii* y la posible ocurrencia de eventos simultáneos

de especiación rápida que llevaron a la diferenciación de estas especies. En este escenario *A. charrua* podría ser considerado como un hipotético taxón polimórfico ancestral a partir del cual divergieron los diferentes linajes pertenecientes al complejo *A. adloffii*. Esta hipótesis se basa en el alto grado de variabilidad genotípica y gran polimorfismo cromosómico que presenta *A. charrua*, diferenciándose cuatro citotipos diferentes (fig. 5), con respecto al resto de los taxones (García, 2006), acompañado además por un gran variabilidad morfológica estimada por caracteres de diseño, merísticos y morfométricos (Loureiro, 2004). La existencia de grupos monofiléticos altamente estructurados dentro del complejo *A. adloffii* (fig. 3) y la elevada diversidad genética dentro de las poblaciones son congruentes con un escenario de metapoblaciones. Estos análisis podrían estar indicando la existencia de barreras de aislamiento reproductivo entre las diferentes especies hermanas del complejo *A. adloffii*.

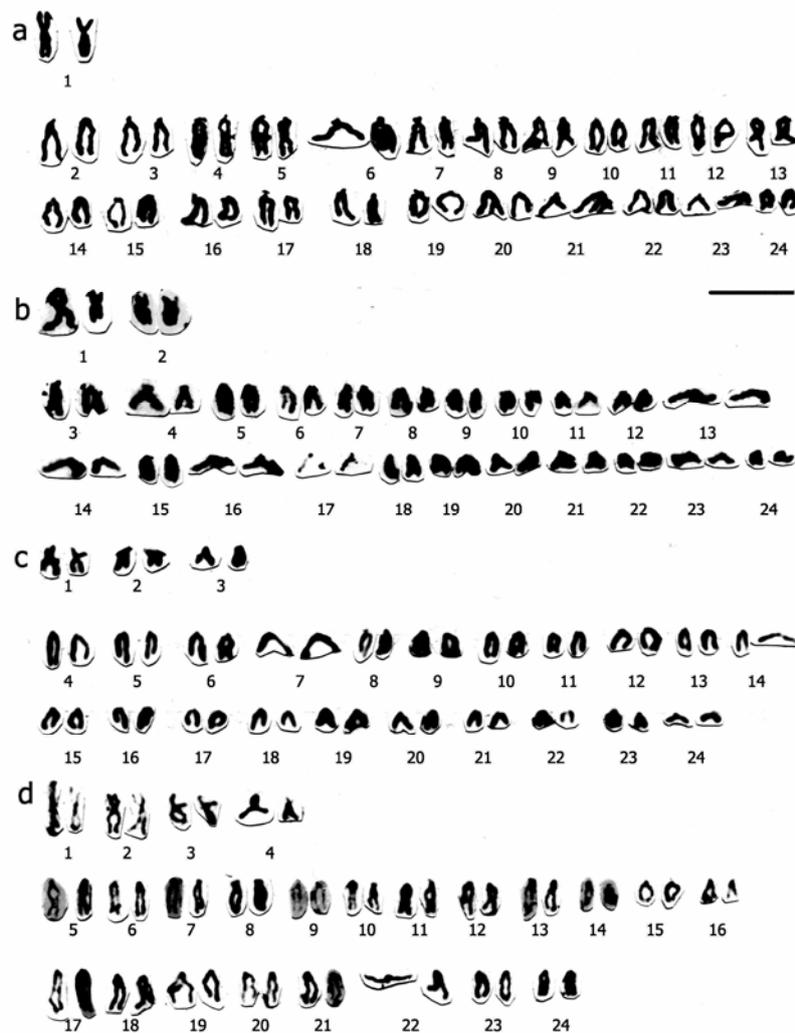


Figura 5. Cariotipos de *A. charrua* pertenecientes a la Laguna Merín (a-c) y Laguna Negra (d). Se diferencian cuatro citotipos diferentes: citotipo (a) $2n=48$, $NF=50$, $(M-SM)=2$, $(ST-A)=46$; citotipo (b) $2n=48$, $NF=52$, $(M-SM)=4$, $(ST-A)=44$; citotipo (c) $2n=48$, $NF=54$, $(M-SM)=6$, $(ST-A)=42$; citotipo (d) $2n=48$, $NF=56$, $(M-SM)=8$, $(ST-A)=40$ (tomado de García, 2006). NF: Número fundamental, M: Metacéntrico, SM; Submetacéntrico, ST: Subtelocéntrico, A: Acrocéntrico

Barreras de aislamiento reproductivo.

Coyne & Orr (2004) definen el término “*barreras de aislamiento reproductivo*” como “*aquellas características biológicas de los organismos que impiden el intercambio de genes con miembros de otras poblaciones*”. Además realizan una clasificación de los diferentes tipos de barreras de aislamiento reproductivo, basándose en trabajos realizados décadas atrás por Dobzhansky (1937a), en:

- 1) Barreras precopulatorias.
- 2) Barreras postcopulatorias precigóticas.
- 3) Barreras postcigóticas (esterilidad del híbrido e inviabilidad).

Este trabajo se va a centrar en las **barreras de aislamiento reproductivo postcigótico** dentro de las cuales podemos distinguir entre:

A. Extrínsecas: el aislamiento postcigótico depende del ambiente (tanto biótico como abiótico)

- 1. Inviabilidad ecológica:** los híbridos se desarrollan de forma normal pero sufren una disminución de la viabilidad al no poder encontrar un nicho ecológico favorable.
- 2. Esterilidad ecológica:** los híbridos presentan gametogénesis normal pero sufren una disminución en la efectividad de la fecundidad debido a que no logran obtener parejas, esto se da como consecuencia de un fenotipo que no resulta atractivo para los individuos del sexo opuesto.

B. Intrínsecas: el aislamiento postcigótico refleja un problema de desarrollo en el híbrido que es relativamente independiente del ambiente.

- 1. Inviabilidad del híbrido:** los híbridos sufren defectos en el desarrollo que causan inviabilidad total o parcial.
- 2. Esterilidad del híbrido:** puede ser fisiológica o etológica.

A pesar de la existencia de estos mecanismos, la presencia de eventos de hibridación entre especies fuertemente emparentadas es una realidad en muchos casos como veremos a continuación.

Hibridación y recombinación.

Posibles eventos de hibridación han sido propuestos y testeados en especies de girasoles salvajes (*Helianthus* sp.) donde incluso se ha propuesto el origen de una nueva especie homoploide vía hibridación entre especies parentales cromosómica o genéticamente divergentes (Rieseberg *et al.* 1995, Ungerer *et al.* 1998). Brown *et al.* (2004) también plantean dicho proceso de especiación en *Drosophila* destacando la aparición de rearrreglos cromosómicos (inversiones) en las especies híbridas que facilitan el aislamiento reproductivo y por lo tanto la persistencia de dichas especies. Estos rearrreglos mantienen bloques o “sets” de genes ligados previniendo su ruptura por eventos de recombinación en la progenie híbrida, La recombinación ha sido reconocida históricamente como la fuerza que facilitaría la fusión entre taxones híbridos (Felsenstein, 1981; Trickett & Bultin, 1994) pero los rearrreglos cromosómicos pueden inhibir dicha recombinación e impedir la fusión (Ortíz-Barrientos *et al.*, 2002). En apoyo a esta idea, Rieseberg *et al.* (1999) muestran que en zonas híbridas de girasoles del género *Helianthus* las tasas de flujo génico entre cromosomas colineales son mayores que entre aquellos que presentan inversiones. Según King (1993) los rearrreglos cromosómicos pueden impedir la meiosis en los híbridos y por lo tanto ser causa de esterilidad. Noor *et al.* (2001a) plantean la hipótesis de que las inversiones cromosómicas en especies de *Drosophila* actúan como una primer barrera impidiendo el desarrollo de híbridos fértiles entre especies en simpatria reteniendo alelos que confieren esterilidad. En dicho trabajo todas las especies que no estaban separadas por inversiones eran alopátricas mientras que las que diferían en una o más inversiones eran simpátricas.

Las tasas de recombinación y por lo tanto el número de quiasmas visibles pueden variar también a un nivel cromosómico, por ejemplo, la recombinación parece estar suprimida en la proximidad de los centrómeros e incrementada en la proximidad de los telómeros y al mismo tiempo, los brazos cortos de los cromosomas poseen tasas de recombinación mayores a la de los brazos largos (Zickler & Kleckner, 1999; Singer, 2002). En varias especies también se aprecia una diferencia en la frecuencia de crossing-over durante la meiosis entre machos y hembras (Lenormand, 2003). Haldane (1922) y Huxley (1928) concluyen que cuando las tasas de recombinación meiótica varían entre los dos sexos, usualmente en el sexo heterogamético la recombinación se ve reducida (este postulado es conocido como “la regla de Haldane”). En mamíferos varias especies muestran una tasa promedio de recombinación reducida en el sexo heterogamético. En humanos la tasa de recombinación de la hembra en comparación al macho es de 1.6:1.0 (Dib *et al.*, 1996), en perros y cerdos 1.4:1.0 (Dietrich *et al.*, 1996; Marklund *et al.*, 1996), en ratones 1.25:1.0 (Neff *et al.*, 1999). En *Drosophila* la reducción es tan extrema

que durante la gametogénesis del macho no se forman quiasmas y por lo tanto se suprime por completo la recombinación (Morgan, 1914). En peces también se conocen varias especies que cumplen con la regla de Haldane; mediante el mapeo genómico se han podido determinar diferencias en las tasas de recombinación sexo-específica en la trucha “arcoiris” (Sakamoto *et al.*, 2000), en zebrafish (Knapik *et al.*, 1998), en catfish (Waldbieser *et al.*, 2001), entre otras especies. El conocimiento de las diferentes tasas de recombinación para ambos sexos es importante a la hora de determinar el diseño experimental a implementar, por ejemplo, para la realización del mapeo genético de una especie.

Mapeo genético.

Si bien los mapas genéticos son solo la génesis para comprender las complejidades evolutivas de una especie, han probado ser una poderosa herramienta en los estudios genéticos de los complejos genomas de animales y plantas, jugando un rol muy importante en la clarificación de la organización y evolución genómica, localización de caracteres monogénicos y poligénicos (cuantitativos), identificación de marcadores ligados al sexo, investigación de procesos del desarrollo por mutaciones, estudios de diversidad genética, etc. Para que un mapa genético sea de utilidad debe contener marcadores moleculares en un número abundante, homogéneamente distribuidos, altamente polimórficos y de fácil lectura en cualquier laboratorio (Postlethwait *et al.*, 1994). Estos mapas son producidos típicamente utilizando diseños de cruzamientos a partir de cruces o retrocruzas donde los parentales de la F1 surgen de líneas que son divergentes para algún aspecto de interés en estudios de QTLs (“quantitative trait loci” o loci de caracteres cuantitativos).

Los mapas genéticos de ligamiento son los más frecuentes y están típicamente compuestos por arreglos lineales de marcadores que se asocian en diferentes grupos de ligamiento (Morizot *et al.*, 1990). Estos se construyen simplemente mediante el análisis de las diferencias en la tasa de recombinación de pares de marcadores genéticos transmitidos por uno de los parentales. Los marcadores que están físicamente cercanos uno del otro poseen una reducida posibilidad de separarse durante la meiosis (es decir que se produzca un evento de recombinación entre ellos) y por lo tanto se transmitirá este genotipo parental en una alta frecuencia a la progenie. Por el contrario, marcadores que se encuentran muy alejados entre si pueden experimentar un evento de crossing-over en el 100 % de las meiosis producidas. De esta forma el cálculo de la frecuencia de entrecruzamiento (o porcentaje de recombinantes) es utilizado como un indicador cuantitativo para estimar la distancia relativa entre los loci a lo largo del cromosoma en la construcción de mapas de ligamiento. Estas distancias deben ser

consideradas con prudencia ya que dependen de la formación de quiasmas (eventos de crossing-over) durante la meiosis, y la probabilidad de que esto ocurra, como ya se señaló anteriormente, varía a lo largo del cromosoma (*hot spots* y *cold spots*). Asimismo, la formación de un quiasma en las moléculas de ADN que sufren el evento de recombinación puede impedir la formación de otro quiasma en el cromosoma. Esto se conoce como “interferencia quiasmática” y es una característica de los diferentes genomas que hay que tener en cuenta para la correcta construcción de los mapas genéticos. Para ello existen básicamente tres funciones de mapeo que tienen este proceso en consideración: la función de Morgan que asume una interferencia completa (no hay formación de otros crossing-over), la de Haldane que asume la ausencia de interferencia (formación de múltiples crossing-over de acuerdo a la distribución de Poisson), y la de Kosambi que asume una interferencia quiasmática intermedia (Manly & Olson, 1999). Teniendo en cuenta estas características se definió la unidad de mapa genético (u.m.) o centiMorgan (cM) como la distancia genética para un porcentaje de recombinación del 1%.

Marcadores moleculares.

Existen diferentes clases de marcadores moleculares que pueden ser utilizados en la construcción de mapas genéticos de ligamiento. Éstos básicamente pueden clasificarse en dos categorías (Danzmann & Gharbi, 2001):

1. Marcadores secuencia específica: RFLP (Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción), CAPS (Secuencias amplificadas clivadas), S-SCAP (Polimorfismo en la amplificación secuencia específica), SSCP (Polimorfismo conformacional de hebra simple), AS-PCR (PCR alelo específica), VNTR (Minisatélites), STR o SSR (Microsatélites) y SNP (Polimorfismo de nucleótido simple)
2. Marcadores independientes de la secuencia: AP-PCR (PCR con cebadores arbitrarios), AFLP (Polimorfismo en el largo del fragmento amplificado), RAPD (Polimorfismo del ADN amplificado al azar) y DAF (*Fingerprinting* amplificado del ADN)

Los marcadores que integran esta segunda categoría han probado ser de gran utilidad en establecer los primeros mapas de ligamiento en varias especies de peces (por ejemplo, en zebrafish *Danio rerio* (Postlethwait *et al.*, 1994); en la trucha “arcoiris” *Oncorhynchus mykiss* (Young *et al.*, 1998); en medaka *Oryzias latipes* (Naruse *et al.*, 2000); en guppy *Poecilia reticulata* (Khoo *et al.*, 2003) debido a que pueden ser generados con relativa facilidad por el

investigador (Ferguson & Danzmann, 1998) y parecen ser altamente polimórficos en la mayoría de las especies en que han sido examinados. Al mismo tiempo, al no necesitar un conocimiento previo de la secuencia de ADN “blanco” es virtualmente posible implementar estos marcadores en cualquier especie de peces de la que se pueda extraer ADN.

Los RAPDs han demostrado ser marcadores nucleares de fácil acceso y los menos dificultosos a la hora de producirlos en abundancia (Khoo *et al.*, 2003). Han sido utilizados en numerosos trabajos que comprenden una gran variedad de organismos, como vegetales (en la lechuga *Lactuca* spp. (Michelmore *et al.*, 1991); en *Arabidopsis thaliana* (Reiter *et al.*, 1992); en el pino *Pinus* spp. (Echt & Nelson, 1997); etc.), insectos (en el gusano de seda *Bombyx mori* (Yasukochi, 1998); en el escarabajo *Tribolium castaneum* (Beeman & Brown, 1999); en *Drosophila buzzatii* (Laayouni *et al.*, 2000), teleósteos (en híbridos de *Xiphophorus* (Kazianis *et al.*, 1996); en zebrafish *Danio rerio* (Johnson *et al.*, 1994; Postlethwait *et al.*, 1994); en guppy *Poecilia reticulata* (Khoo *et al.*, 2003); y varias especies del género *Austrolebias* (García *et al.*, 2004). La técnica de RAPD es una alternativa razonable a la hora de seleccionar un marcador molecular dado que utiliza una muy pequeña cantidad de ADN, tiene un costo muy bajo, es relativamente rápida de realizar, no requiere un entrenamiento específico y no necesita un marcaje radiactivo. Por otro lado, esta técnica ha recibido críticas debido a su baja reproducibilidad y falta de homología con otros marcadores (Rieseberg, 1996). Además, en trabajos realizados en soja se han observado fragmentos RAPD que no presentan una herencia Mendeliana (Reiter *et al.*, 1992), es decir bandas que amplifican en individuos de una progenie y que estaban ausentes en los parentales. Sin embargo, estas inconsistencias pueden ser solucionadas mediante la optimización de las condiciones de PCR, una cuidadosa elección de los “primers” o cebadores y un mejoramiento en los métodos de separación y detección de los fragmentos de ADN. Una limitación real de estos marcadores es la falta de discriminación de los individuos homocigotas dominantes (+/+) de los heterocigotas (+/-), como sucede con el resto de los marcadores dominantes. De igual forma, esto se puede solucionar creando diseños de cruzamiento que nos permitan genotipar a los individuos en una genealogía. Hoy en día existen numerosos programas informáticos para la construcción de mapas genéticos que nos permiten un manejo realista de nuestros datos, permitiéndonos la configuración de diferentes variables para un mejor ajuste.

Este trabajo se basará en la continuación de un diseño experimental de cruzamientos realizado en el laboratorio con individuos de las especies *A. charrua*, *A. reicherti* y *A. viarius*, provenientes de 3 charcos temporales naturales distribuidos al sur-este de Uruguay (fig. 1) con el fin de testear posibles mecanismos de aislamiento reproductivo entre dichas especies.

Hipótesis de trabajo

La reorganización genómica en especies hermanas del complejo *A. adloffii*, implicando una rápida evolución cariotípica, puede llevar a la formación de bloques de genes no recombinantes facilitando el aislamiento reproductivo postcigótico entre híbridos naturales y de laboratorio.

Objetivo general

Detectar posibles regiones genómicas asociadas a mecanismos de aislamiento reproductivo postcigótico en híbridos de laboratorio entre especies hermanas del complejo *A. adloffii* mediante la utilización de marcadores RADPs.

Objetivos específicos

1) Proseguir con los cruzamientos en el laboratorio en los casos en los que se haya obtenido una progenie híbrida viable, 2) identificar marcadores moleculares exclusivos en cada una de las especies y en los híbridos mediante la técnica de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), 3) determinar grupos de ligamiento con marcadores específicos y mapear regiones genómicas en las que no existan eventos de recombinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes y diseño de cruzamientos.

Los individuos utilizados procedieron de colectas realizadas según la distribución geográfica descrita para las especies *A. viarius* (Vaz-Ferreira & Melgarejo, 1984), *A. charrua* (Costa & Cheffe, 2001) y *A. reicherti* (Loureiro & García, 2004). Los charcos elegidos para recolectar los ejemplares fueron: el charco 3 para *A. viarius*, el charco 8 y 32 para *A. charrua* y el charco 56 para *A. reicherti* (fig. 1). Esta elección se realizó de forma de cruzar individuos de *A. viarius* con individuos de charcos cercanos (charco 8), intermedios (charco 32) y lejanos (charco 56) con el fin de indagar posibles barreras postcigóticas. También fueron empleados ejemplares provenientes de cruzamientos de laboratorio entre dichas especies.

Basándonos en un diseño experimental de cruzamientos entre individuos de las especies *A. viarius*, *A. charrua* y *A. reicherti* realizado con anterioridad en el laboratorio, se prosiguió con el único cruzamiento en el que se obtuvo una progenie híbrida viable, el

cruzamiento C22 perteneciente a ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti*. En la tabla 1 se muestran los cruzamientos realizados anteriormente y la viabilidad de los huevos en cada uno de ellos. Cada cruzamiento se denominó con la letra “C” y un número correspondiente. La viabilidad se determinó observando bajo la lupa y constatando la presencia de embriones. En la mayoría de los casos la viabilidad de los huevos no sobrellevó a la adecuada eclosión de los alevines.

Tabla 1. Diseño de cruzamientos realizado entre *A. viarius*, *A. charrua* y *A. reicherti*. En cada caso se muestra el nombre del cruzamiento realizado, el número de huevos viables (v) y el número de huevos no-viables (nv).

♂ \ ♀	<i>A. viarius</i> (charco 3)	<i>A. charrua</i> (charco 8)	<i>A. charrua</i> (charco 32)	<i>A. reicherti</i> (charco 56)
<i>A. viarius</i> (charco 3)	C 7: 9 v 14 nv C 23: 11 v 5 nv C 34: 17 v 7 nv	C 8: 11v 2 nv C 24: 21 v 26 nv C 33: 3 v 1 nv	C 9: 43 v 21 nv C 25: 6 v 5 nv C 49: 6 v 2 nv	C 12: 0 v 0 nv C 26: 5 v 34 nv C 37: 0 v 1 nv
<i>A. charrua</i> (charco 8)	C 11: 71 v 15 nv C 27: 8 v 25 nv C 40: 24 v 17 nv	C 14: 5 v 2 nv C 41: 13 v 9 nv C 50: 21 v 1 nv	C 15: 96 v 5 nv C 45: 17 v 2 nv C 54: 5 v 3 nv	C 18: 0 v 4 nv C 35: 0 v 0 nv C 44: 35 v 20 nv
<i>A. charrua</i> (charco 32)	C 10: 33 v 15 nv C 28: 6 v 0 nv C 43: 21 v 2 nv	C 20: 4 v 39 nv C 46: 5 v 0 nv C 53: 18 v 0 nv	C 21: 5 v 50 nv C 42: 12 v 1 nv C 52: 6 v 0 nv	C 22: 16 v 13 nv C 36: 0 v 0 nv C 51: 17 v 4 nv
<i>A. reicherti</i> (charco 56)	C 13: 27 v 20 nv C 29: 0 v 0 nv C 38: 74 v 3 nv	C 16: 16 v 4 nv C 30: 1 v 7 nv C 39: 0 v 45 nv C 30': 1 v 2 nv	C 19: 0 v 0 nv C 31: 50 v 13 nv C 48: 23 v 0 nv	C 17: 0 v 0 nv C 32=C 32': 11 v 0 nv C 47: 38 v 6 nv

La F1 de dicho cruzamiento (2 hembras y 2 machos) se retrocruzaron con ejemplares de las especies parentales (*A. charrua* y *A. reicherti*) provenientes de los mismos charcos, ya que al tratarse de peces anuales no es posible realizar las retrocruzas con los propios parentales (cada cruzamiento se denominó con la letra “D” y un número correspondiente, ver Anexo I tabla 2). También se realizaron cruzamientos “intracharcos” para ambas especies como cruzamientos de control y en función de mantener los stocks del laboratorio.

Para cada uno de los cruzamientos se utilizó solamente un macho y una hembra de cada especie que permanecieron en una pecera aislados del resto de los individuos durante un período de 5 a 8 días. Luego se retiró la turba (donde son depositados los huevos) y se guardó en bolsas de nylon perfectamente diferenciadas a temperatura ambiente por un período de 2 a 3 meses, ya que la diapausa III en este grupo es obligatoria y los embriones deben permanecer en este estadio un mínimo de 2 meses. En nuestro caso se optó por no verificar la viabilidad de los huevos para evitar su manipulación. En una segunda etapa y luego de transcurrir el tiempo necesario, se pusieron a eclosionar los huevos con el fin de testear la viabilidad de la F2. Para ello se colocaron las diferentes turbas en peceras pequeñas de forma que

permanezcan totalmente sumergidas en agua, con una correcta oxigenación y a una temperatura ambiente no muy elevada. Luego se dejó transcurrir un mínimo de 72 hs para verificar la eclosión de los huevos. Los alevines fueron alimentados con artemia por un período de 45 a 60 días retirando el exceso de alimento periódicamente para evitar la formación de hongos. Luego de este período, los juveniles fueron trasladados a peceras de mayor tamaño para su alimentación con “tubifex” hasta alcanzar la madurez sexual y poder ser cruzados nuevamente. Los reproductores fueron seleccionados según su tamaño y coloración pretendiendo optar por los ejemplares en mejor estado para cada uno de los cruzamientos. Los cruzamientos se llevaron a cabo utilizando individuos híbridos de la F2 e individuos salvajes de *A. charrua* y *A. reicherti* (diseño de cruzamientos “E”, Anexo I tabla 2) en las mismas condiciones empleadas con anterioridad para los individuos de la F1. En este diseño también se realizaron cruzamientos intracharco como explicamos anteriormente. Luego las turbas fueron retiradas y almacenadas nuevamente por un periodo de tiempo suficiente para permitir el normal desarrollo de los embriones.

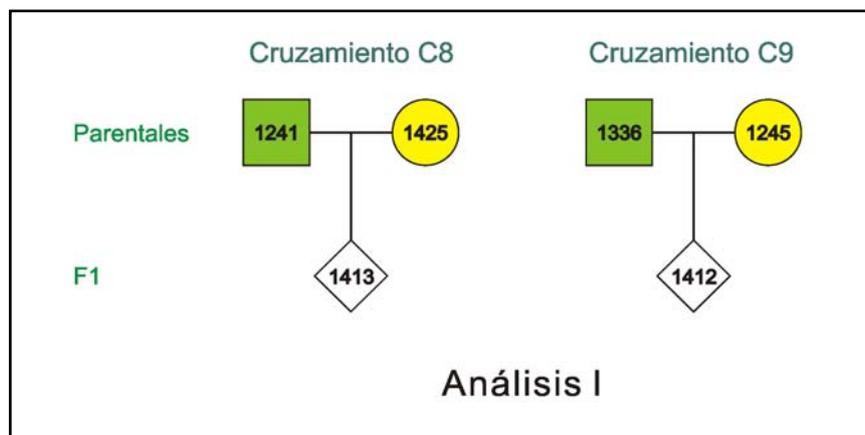


Figura 7. Diseño experimental de cruzamientos realizado para ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (cruzamientos C8 y C9). Cuadrados: machos. Círculos: hembras. Rombos: sexo desconocido. En amarillo los individuos de *A. charrua*, en verde los de *A. viarius* y en blanco los híbridos.

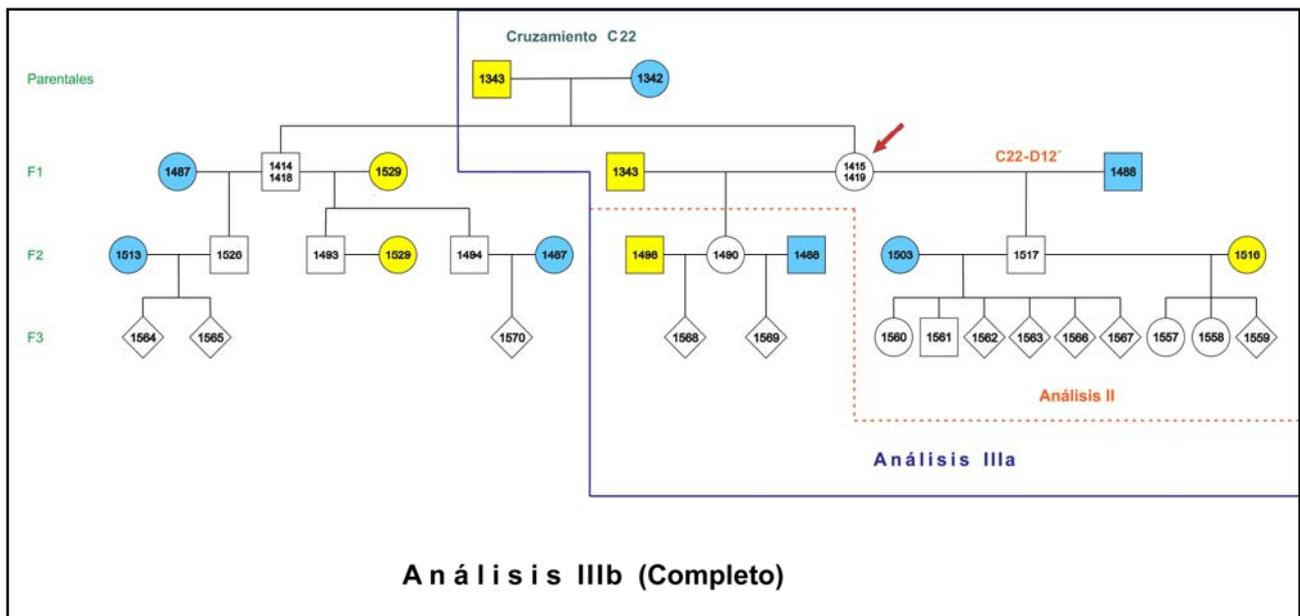


Figura 8. Diseño experimental de cruzamientos realizado a partir del cruzamiento C22 (σ *A. charrua* x ϕ *A. reicherti*). Se muestran los diferentes diseños para cada uno de los análisis efectuados: Análisis II (recuadro naranja), Análisis IIIa (recuadro azul) y Análisis IIIb con la totalidad de los individuos (recuadro negro). En amarillo los individuos de *A. charrua*, en celeste los de *A. reicherti* y en blanco los híbridos. Cuadrados: machos, círculos: hembras y rombos: sexo desconocido.

Por último, se prosiguió con la eclosión de los individuos de la F3 los cuales fueron mantenidos en el laboratorio para su posterior disección. Se extrajo hígado y trozos de aletas en juveniles y adultos, mientras que los alevines que murieron en etapas tempranas de su desarrollo fueron preservados enteros. En todos los casos las muestras fueron fijadas en etanol al 95% para su posterior utilización. La totalidad de los individuos utilizados en el diseño de cruzamientos fueron disecados, numerados e ingresados en el catálogo de Peces de la Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR.

Extracción y amplificación del ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de hígado y trozos de aleta (a excepción de los alevines donde se realizó a partir del individuo entero) usando digestión con proteinasa K, precipitación de proteínas con cloruro de sodio y precipitación del ADN con etanol absoluto en frío, según el protocolo modificado de Medrano *et al.* (1990) sin fenol cloroformo (Anexo 1). Luego se estimó la concentración relativa del ADN extraído mediante corrida electroforética en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, utilizando para ello un marcador de peso molecular de 1kb cuyas bandas presentan una concentración conocida. La

corrida se realizó en buffer TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989) a 80V durante aproximadamente 45 minutos.

Para la amplificación de la ADN se utilizó la técnica de RAPD con los decanucleótidos de composición arbitraria OPA10, 14, 15, 18 y 19 (Kit OperonTechnologies) (tabla 3). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: en un volumen total de reacción de 10 μ l, una concentración final de MgCl₂ 0.3 mM, primer 0.5 μ M, de cada dNTP 0.2 mM, *Taq* ADN Polimerasa 0.5 U (Invitrogen), buffer de la reacción 10x y 1 μ l de muestra de ADN. La reacción de PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial de 5 min. a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 min. a 94° de desnaturalización, 1 min. a 36°C de annealing y una extensión por 1 min. a 72°. Por último se realizó una extensión final a 72° durante 7 min. Para estas reacciones se utilizó un termociclador automático PTC-100 de MJ. Research Inc. Los productos amplificados se separaron por electroforesis utilizando geles de acrilamida al 6% con 140 V por 5 horas en buffer TBE 1x, para su posterior teñido con nitrato de plata de acuerdo al protocolo de Sanguinetti *et al.* (1994).

Tabla 3. Oligonucleótidos seleccionados para los experimentos de RAPDs.

Código	Secuencia 5' → 3'	M.W.	pmoles	ug/tubo
OPA10	GTGATCGCAG	3059	5088	15.5
OPA14	TCTGTGCTGG	3041	5783	17.5
OPA15	TTCCGAACCC	2939	5783	17.0
OPA18	AGGTGACCGT	3059	5088	15.5
OPA19	CAAACGTCGG	3028	4988	15.0

Análisis de los datos.

Elección de individuos.

Debido al gran número de individuos con el que contamos en nuestro diseño de cruzamientos y de forma de poder analizar exhaustivamente nuestros datos se decidió realizar el estudio de los mismos en 3 etapas por separado de acuerdo a los híbridos viables resultantes:

1. analizar los cruzamientos correspondientes a ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (cruzamientos C8 y C9) y su descendencia híbrida en los cuales no fue posible continuar las retrocruzas debido a la temprana muerte de los alevines. Para los diferentes análisis se consideraron ambos cruzamientos de forma conjunta (fig. 7, análisis I).

2. analizar el cruzamiento C22-D12' (correspondiente a la retrocruza de las ♀ *híbridas* (1415 y 1419) x ♂ *A. reicherti*) (fig. 8, análisis II) con sus respectivos parentales y la progenie obtenida debido al número significativo de descendientes híbridos conseguidos.
3. comparar nuestros resultados en la construcción de mapas de ligamiento con:
 - 3a. La progenie total en los cruzamientos de ♀ *híbridas* (1415 y 1419) x ♂ *A. reicherti* y ♀ *híbridas* (1415 y 1419) x ♂ *A. charrua* (fig. 8, análisis IIIa) (añadiendo a nuestro análisis los datos de los híbridos 1568 y 1569).
 - 3b. El total de los individuos incluidos en el diseño de cruzamientos completo a partir del cruzamiento C22 (fig. 8, análisis IIIb).

Matrices de datos.

A continuación se comenzó la visualización de los patrones de bandeo correspondientes a cada uno de los oligonucleótidos utilizados estimando el tamaño de las bandas según su comparación con un marcador de peso molecular y creando así las matrices de presencia/ausencia respectivas para cada uno de los marcadores amplificados. La ausencia del marcador se indicó con “0” y la presencia del mismo con “1”, teniendo en cuenta que únicamente se consideraron aquellas bandas cuyo peso molecular se encontrara entre 170 y 1850 pb para evitar errores de apreciación. Los marcadores fueron nombrados según el nombre del oligo utilizado y el peso molecular en pb de la banda amplificada (por ejemplo un marcador amplificado con el oligo OPA 10 que presentó un peso molecular de 180 pb se nombra OPA10.180). También se realizó una depuración de los marcadores obtenidos contrastando los geles amplificados en este trabajo con geles anteriores provistos por la Sección de Genética Evolutiva (Facultad de Ciencias, UDELAR) para testear la repetitividad de las bandas. En el análisis del cruzamiento C22-D12' (análisis II) se decidió no incluir el OPA19 debido a su inadecuada amplificación luego de varios intentos. De esta forma se intentó determinar marcadores moleculares exclusivos a cada una de las especies y a los descendientes híbridos.

Índices de polimorfismo.

A partir de las matrices obtenidas se calculó el índice de polimorfismo en cada uno de los cruzamientos realizados y para cada uno de los oligos utilizados, tomándose como locus polimórfico aquel que presentase una variante en al menos dos muestras.

$$\text{Índice de polimorfismo (IP)} = \frac{\text{número de loci polimórficos amplificados}}{\text{Total de loci amplificados}}$$

Análisis de clusters.

Utilizando las matrices de marcadores RAPDs obtenidos para los cruzamientos de ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9) y de ♀ *híbrida* x ♂ *A. reicherti* (C22-D12', análisis II) se efectuaron análisis de clusters a los efectos de evaluar la correspondencia de parentesco entre los individuos involucrados en cada uno de ellos. Se trata de análisis estadísticos por los cuales se busca un agrupamiento jerárquico en base de datos multivariados utilizando algoritmos definidos previamente. Para realizar estos cálculos se utilizó el programa informático PAST versión 1.24 (Hammer & Harper, 2004) y el algoritmo que se escogió fue el índice de similitud de Dice. Este índice permite comparar matrices de datos de presencia/ausencia (0 y 1) poniendo más peso en las coincidencias de las muestras que en los desaciertos.

Construcción de grupos de ligamiento.

El análisis de los datos se realizó con el programa informático MapManager QTX (Manly & Olson, 1999) dada su eficacia en la construcción de mapas de ligamiento (Khoo *et al.* 2003). Las matrices en crudo fueron convertidas a un formato de “ancestralidad conocida” con el fin de reflejar el pedigree de los individuos. Los alelos para cada genotipo parental y de la progenie fueron propuestos de forma que reflejen su herencia a partir de la generación anterior. Si la ancestralidad era inconclusa debido a la falta de información de los progenitores, el marcador era considerado como de “ancestro desconocido” y no fue incluido en el análisis. Solo se tuvieron en cuenta aquellos marcadores presentes solamente en uno de los parentales y en por lo menos uno de los descendientes híbridos de forma de poder genotipar los individuos y establecer su forma de herencia. Al ingresar los datos se tuvo en cuenta el diseño de cruzamientos efectuado (intercross, line cross) y el tipo de herencia de los marcadores (dominante). La obtención de los grupos de ligamiento se efectuó poniendo como condición un valor de $p=1e^{-6}$ siendo "p" la probabilidad de un error Tipo 1, es decir la probabilidad de un ligamiento falso positivo. Valores de $p=0,05$ y $p=0,01$ fueron considerados únicamente como sugestivos, mientras que valores de $p=1e^{-5}$ y $p=1e^{-6}$ fueron considerados como prueba evidente de ligamiento. Se utilizó la función de mapeo de Kosambi ya que ésta supone una interferencia quiasmática intermedia, en comparación a la función de Morgan que

asume una interferencia completa (no hay formación de otros crossing-over) y la de Haldane que asume la ausencia de interferencia (formación de múltiples crossing-over de acuerdo a la distribución de Poisson). Teniendo en cuenta estas características se definió la unidad de mapa genético (u.m.) o centiMorgan (cM) como la distancia genética para un porcentaje de recombinación del 1%. Asimismo se compararon los marcadores propios de cada una de las especies investigadas con los grupos de ligamiento obtenidos de forma de determinar marcadores diagnósticos para éstas y establecer posibles bloques no recombinantes.

RESULTADOS

Diseño de cruzamientos.

En primer lugar se logró obtener individuos adultos y viables en los acuarios tanto para las tres especies en estudio como para la descendencia híbrida, lo que nos permitió completar con éxito nuestro diseño. Del cruzamiento de ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* y sus sucesivas retrocruzadas se obtuvieron un total de 25 individuos híbridos, distribuidos en 7 machos, 9 hembras y 9 individuos que no pudieron ser sexados debido a su temprana muerte. Este número de progenie es significativamente mayor al alcanzado en las etapas previas de cruzamientos (tabla 1).

Extracción del ADN y amplificación de marcadores RAPDs.

De un total de 49 individuos utilizados en los diferentes diseños de cruzamientos solamente no se pudo extraer satisfactoriamente ADN en 2 de ellos. En uno de los casos el ejemplar no se encontraba en buenas condiciones (presencia de hongos) mientras que el otro ejemplar fue utilizado completamente en un experimento de extracción (dado su pequeño tamaño) que no fue exitoso.

Para el cruzamiento de ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9) se obtuvo un total de 232 marcadores amplificados dando un promedio de 46,4 loci amplificados por oligo. En el caso del cruzamiento de ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (C22-D12', análisis II) en una primera etapa amplificaron un total de 274 marcadores con un promedio de 68,5 por oligo. Una vez realizada la comparación con los datos obtenidos anteriormente en el laboratorio de Genética Evolutiva para chequear la repetitividad de las bandas se redujo el número a 258 marcadores con un promedio por oligo de 64,5.

Análisis de los datos

Marcadores específicos.

Se identificaron marcadores propios de cada una de las especies que pueden por lo tanto constituir marcadores diagnóstico para éstas (tabla 4). En cada caso se consideraron aquellos marcadores presentes en todos los individuos de cada una de las especies y que no aparecían en la descendencia híbrida. Se obtuvieron 8 marcadores para *A. charrua* y 2 para *A. reicherti* (análisis II)

Tabla 4. Posibles marcadores diagnóstico para *A. reicherti* y *A. charrua*.

Especie	Marcador
<i>A. reicherti</i>	OPA10.492
<i>A. reicherti</i>	OPA10.502
<i>A. charrua</i>	OPA15.511
<i>A. charrua</i>	OPA15.1010
<i>A. charrua</i>	OPA18.501
<i>A. charrua</i>	OPA10.513
<i>A. charrua</i>	OPA18.455
<i>A. charrua</i>	OPA10.405
<i>A. charrua</i>	OPA15.969
<i>A. charrua</i>	OPA18.396

Índices de polimorfismo.

1. Para los cruzamientos C8 y C9 (♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua*) el polimorfismo total tomando en cuenta los 5 oligos utilizados fue de 0,57. El OPA 14 mostró ser el más polimórfico con un índice de 0,81 mientras que el OPA 18 el menos polimórfico con un índice de polimorfismo de 0,48. El resto de los oligos tuvieron valores intermedios (tabla 5).

2. En el cruzamiento C22-D12' (♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti*) se obtuvo un polimorfismo total de 0,70, siendo el OPA 18 (IP=0,76) y el OPA 14 (IP=0,58) los que presentaron mayor y menor índice de polimorfismo respectivamente (tabla 5).

3. Por último, teniendo en cuenta la totalidad de la descendencia híbrida del cruzamiento C22 se obtuvo un índice polimórfico de 0,81, donde el OPA 18 mostró tener el mayor IP (0,85) y el OPA 14 el menor IP (0,70) (tabla 5).

Tabla 5. Índices de polimorfismo calculados para los diferentes análisis. El oligonucleótido OPA 19 fue utilizado solamente en el cruzamiento ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua*.

	OPA 10	OPA 14	OPA 15	OPA 18	OPA 19	Total
♂ <i>A. viarius</i> x ♀ <i>A. charrua</i> (Análisis I)	0.52	0.81	0.57	0.48	0.53	0.57
♂ <i>A. charrua</i> x ♀ <i>A. reicherti</i> (C22-D12', Análisis II)	0.75	0.58	0.69	0.76	-	0.70
♂ <i>A. charrua</i> x ♀ <i>A. reicherti</i> (Completo, Análisis IIIb)	0.85	0.70	0.81	0.85	-	0.81

Análisis de clusters.

Se construyeron dos genealogías basadas en los coeficientes de similitud por comparación de cada pareja formada entre todos los individuos correspondientes a los cruzamientos ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (fig. 9) y ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (fig. 10). Podemos observar que básicamente todos los individuos se agrupan según su parentesco en ambos árboles. En el segundo árbol (fig. 10), donde obtuvimos una progenie significativamente mayor, los híbridos aparecen como una “entidad” diferente que se va diversificando en el tiempo.

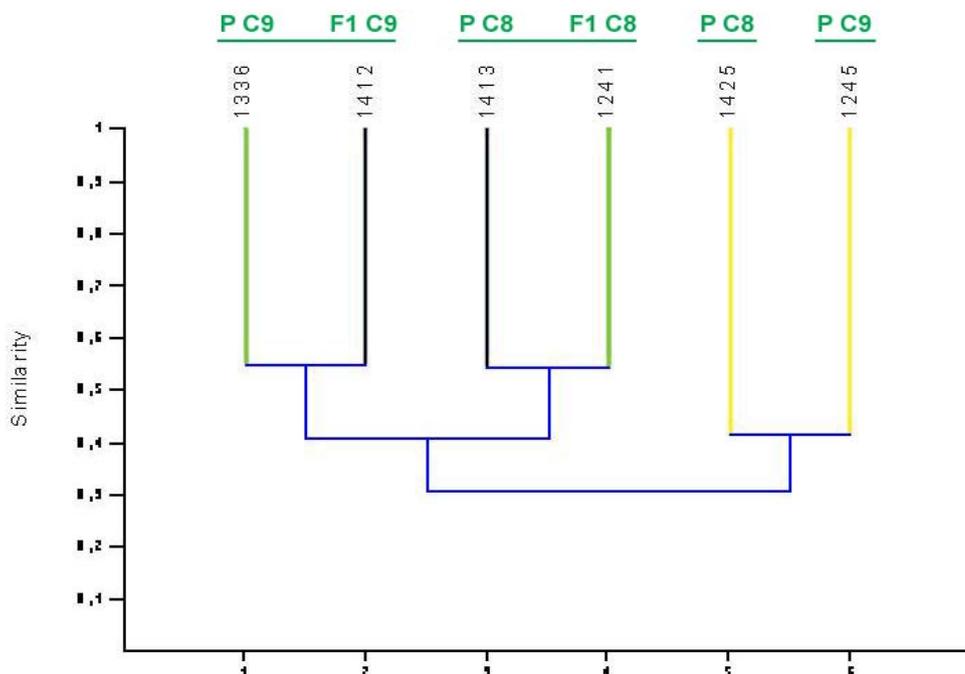


Figura 9. Análisis de clusters para los cruzamientos ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9) utilizando el índice de similitud de Dice. En verde individuos de *A. viarius*, amarillo *A. charrua* y negro híbridos. Se señalan los parentales (P) y la F1 de cada cruzamiento (ver figura 8).

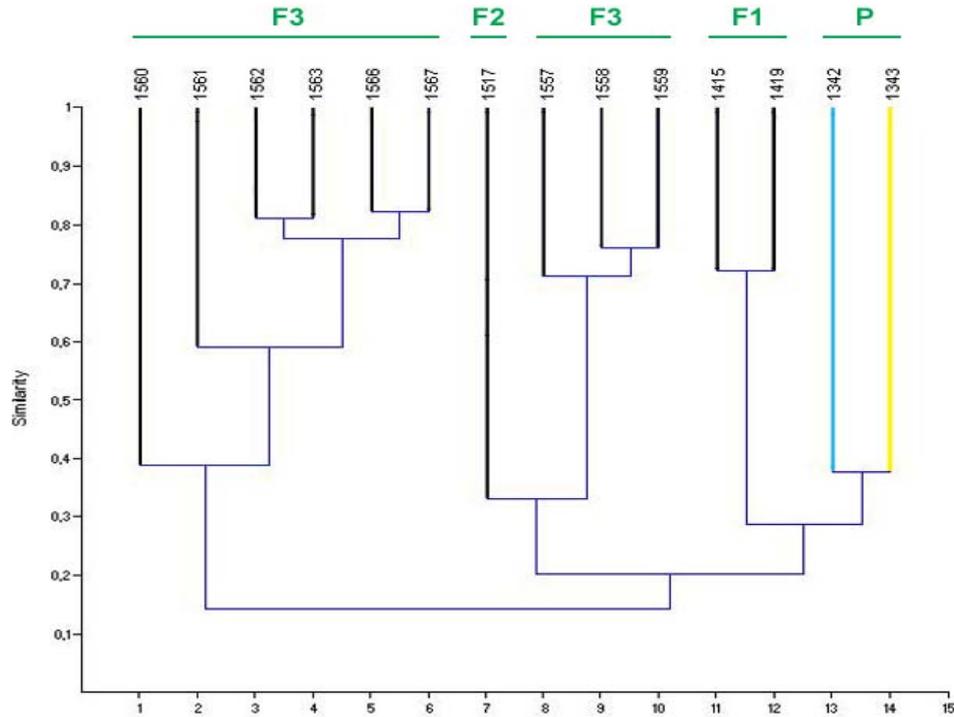


Figura 10. Análisis de clusters para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (C 22-D12', análisis II) utilizando el índice de similitud de Dice. En celeste individuos de *A. reicherti*, amarillo *A. charrua* y negro híbridos. Se señalan los parentales (P) y las respectivas F1, F2 y F3.

Grupos de Ligamiento.

Análisis I. De los cruzamientos de ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9) y los 2 híbridos resultantes se obtuvo un total de 232 marcadores constituyendo 29 grupos de ligamiento (GL) y un conjunto de 14 marcadores no ligados (fig. 11). Los GL con mayor número de marcadores fueron los GL 2, 4 y 11 formados por 20 marcadores cada uno de ellos, mientras que el menor número de marcadores fue de 2 para los GL 19, 20, 25, 26 y 27. Para este cruzamiento no fue posible estimar la distancia total de mapa debido al bajo número de descendencia híbrida. Los grupos obtenidos están formados por marcadores de una u otra especie o por marcadores presentes en las dos especies pero no se observan mosaicos de ambos genomas en ninguno de los grupos de ligamiento, sugiriendo posibles mecanismos que impiden la recombinación entre estos taxones.

GL 1	GL 2	GL 3	GL 5	GL 7	GL 10
OPA19.1849 OPA18.1150 OPA18.742 OPA15.1020 OPA15.926 OPA14.2036 OPA14.1970 OPA14.815 OPA14.705 OPA10.544 OPA15.862	OPA19.2020 OPA19.1005 OPA19.980 OPA19.742 OPA19.717 OPA19.396 OPA18.1415 OPA18.967 OPA18.887 OPA18.605 OPA18.467 OPA18.375 OPA18.361 OPA14.1883 OPA14.1636 OPA14.1203 OPA14.877 OPA10.1015 OPA10.180 OPA18.793	OPA19.992 OPA19.490 OPA18.893 OPA14.945 OPA14.736 OPA14.918 OPA15.595	OPA19.893 OPA19.843 OPA19.482 OPA19.323 OPA18.868 OPA18.818 OPA15.1327 OPA15.910 OPA15.893 OPA15.579 OPA15.556 OPA15.337 OPA14.515 OPA10.744 OPA15.390 OPA18.755	OPA19.918 OPA18.1665 OPA18.1370 OPA18.1020 OPA18.942 OPA18.880 OPA18.323 OPA15.736 OPA15.446 OPA10.885 OPA18.385 OPA19.451	OPA19.272 OPA19.261 OPA19.223 OPA18.498 OPA18.306 OPA15.1636 OPA15.1003 OPA15.515 OPA14.520 OPA10.578 OPA15.987 OPA19.1194
GL 13		GL 4		GL 8	GL 11
OPA19.1548 OPA18.1283 OPA18.555 OPA15.704 OPA14.893 OPA10.506 OPA10.893 OPA18.918		OPA18.1455 OPA18.1106 OPA18.1015 OPA18.950 OPA18.704 OPA18.339 OPA15.799 OPA15.641 OPA15.506 OPA15.495 OPA15.384 OPA15.372 OPA15.324 OPA15.311 OPA15.270 OPA15.234 OPA14.438 OPA10.420 OPA15.177 OPA18.930	GL 6	OPA18.772 OPA18.508 OPA15.277 OPA14.1070 OPA14.451 OPA10.320 OPA14.986 OPA19.780	OPA18.1590 OPA18.1005 OPA18.825 OPA18.692 OPA18.514 OPA18.502 OPA18.379 OPA18.344 OPA18.312 OPA18.259 OPA15.1584 OPA15.971 OPA15.695 OPA15.500 OPA10.960 OPA10.780 OPA10.485 OPA10.460 OPA18.370 OPA19.512
GL 14	GL 15			GL 9	
OPA19.642 OPA19.374 OPA14.550 OPA10.340 OPA10.1040 OPA19.605	OPA15.1170 OPA14.955 OPA18.667		GL 19	OPA19.1865 OPA19.1010 OPA19.793 OPA19.280 OPA18.685 OPA18.392 OPA15.317 OPA10.722 OPA10.490 OPA15.1224 OPA19.1415	
GL 16	GL 17				
OPA14.1018 OPA14.940 OPA14.924 OPA14.490 OPA10.1630 OPA14.407	OPA19.868 OPA14.510 OPA10.698 OPA14.861		GL 21		
	GL 18		OPA14.720 OPA14.783		
	OPA15.512 OPA10.990 OPA18.1547				
	GL 20		GL 22		
	OPA15.413 OPA15.468		OPA19.440 OPA14.1820 OPA18.642		
				GL 23	
				OPA10.650 OPA10.511 OPA19.1062	
GL 24	GL 25	GL 26	GL 27	GL 28	GL 29
OPA15.815 OPA15.768 OPA15.1200	OPA10.948 OPA19.517	OPA15.457 OPA18.957	OPA18.526 OPA18.1080	OPA14.1533 OPA18.396 OPA19.1689	OPA15.479 OPA10.767 OPA18.1636

Figura 11. Grupos de ligamiento obtenidos con el programa Map Manager QTX para los cruzamientos ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9). Marcadores pertenecientes a *A. viarius* son mostrados en verde (■) y los pertenecientes a *A. charrua* en amarillo (■)

Análisis II. Luego de genotipar la descendencia híbrida para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (C22-D12') se pudo determinar la procedencia parental de 138 marcadores de un total de 258. A partir del análisis de estos 138 marcadores y una progenie total de 12 individuos se obtuvieron 10 grupos de ligamiento y 28 marcadores no ligados (fig. 12). El mayor número de marcadores en un GL fue de 47 para el GL 3 mientras que los GL 7, 8, 9 y 10 solamente tuvieron 2 marcadores cada uno. En este caso dentro de los grupos formados, un GL está constituido únicamente por marcadores del genoma de *A. charrua*, cinco GL únicamente integrados por marcadores del genoma de *A. reicherti* y los restantes GL están constituidos por mosaicos de ambos genomas. También se indicó la distribución de los marcadores específicos encontrados en los diferentes grupos de ligamiento (fig. 12). Se

señalaron 6 de los 10 marcadores hallados (ver tabla 4) ya que los 4 restantes forman parte del grupo de marcadores no ligados.

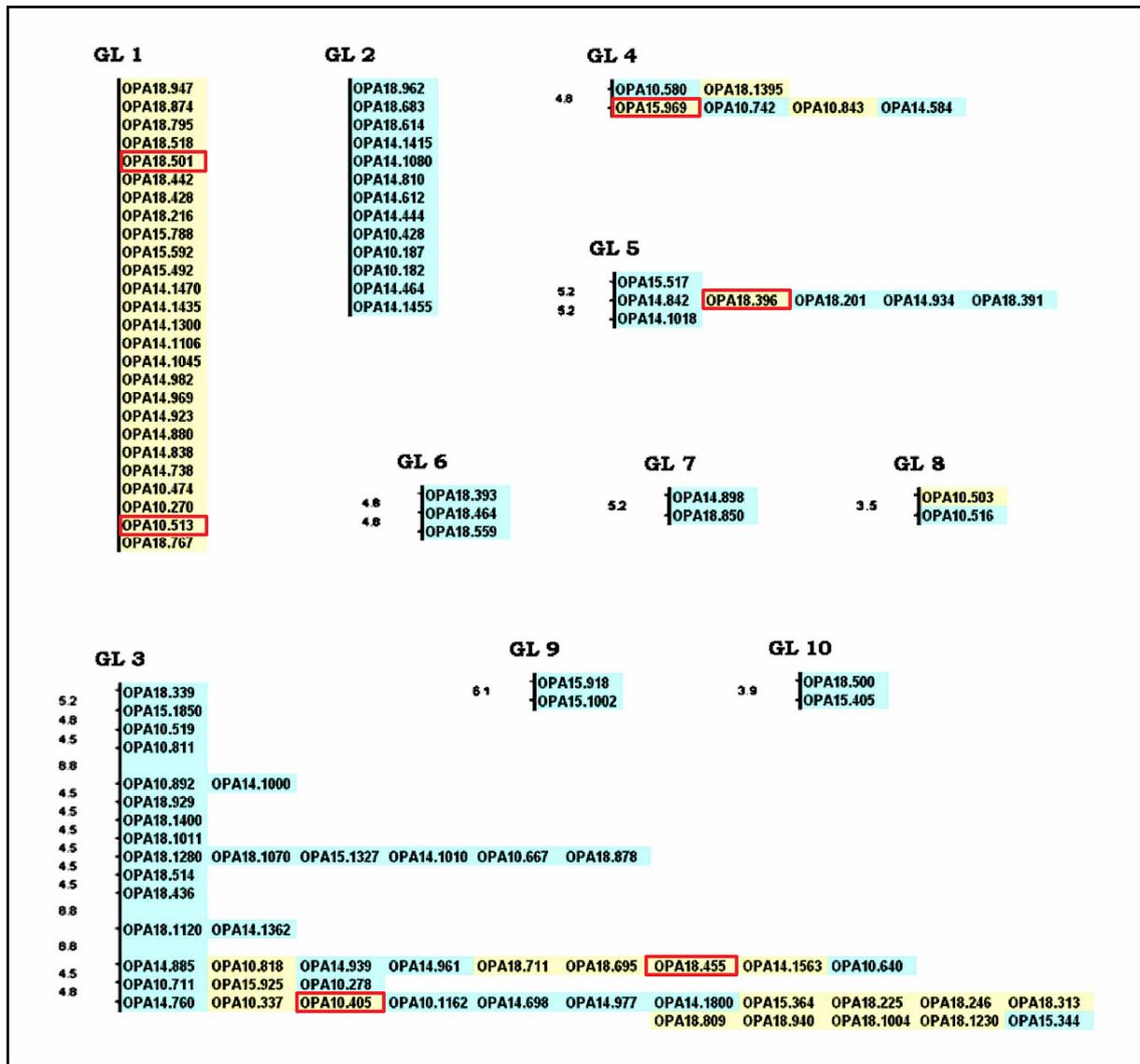


Figura 12. Grupos de ligamiento obtenidos con el programa Map Manager QTX para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (C22-D12⁺). Marcadores pertenecientes a *A. charrua* son mostrados en amarillo (■) y los pertenecientes a *A. reicherti* en celeste (■). Los recuadros rojos muestran los marcadores específicos encontrados y su distribución en los diferentes GL.

Análisis IIIa. De la progenie total en el cruzamiento de ♀ *híbridas* (1415 y 1419) x ♂ *A. reicherti* y ♀ *híbridas* (1415 y 1419) x ♂ *A. charrua*, se obtuvo un total de 197 marcadores constituyendo 15 grupos de ligamiento y 23 marcadores no ligados (fig.13). El mayor número de marcadores en un GL fue de 89 para el GL 2 mientras que los GL 5 y 9 solamente tuvieron 2 marcadores cada uno. En este caso dentro de los grupos formados, dos GL están constituidos únicamente por marcadores del genoma de *A. charrua*, nueve GL únicamente

integrados por marcadores del genoma de *A. reicherti* y 4 GL están constituidos por mosaicos de ambos genomas.



Figura 13. Grupos de ligamiento obtenidos con el programa Map Manager QTX para los cruzamientos ♂ *A. reicherti* x ♀ híbrida x ♂ *A. charrua*. Marcadores pertenecientes a *A. charrua* son mostrados en amarillo (■) y los pertenecientes a *A. reicherti* en celeste (■)

Análisis IIIb. Por último teniendo en cuenta los datos obtenidos por Rovira (pers. com.) y contando por lo tanto con la totalidad de la descendencia híbrida (22 individuos) se obtuvieron un total de 197 marcadores distribuidos en 17 GL (10 constituidos únicamente por marcadores del genoma de *A. charrua* y 7 por marcadores del genoma de *A. reicherti*) (fig. 14.). El GL 4 fue el que presentó un mayor número de marcadores (17) mientras que los GL 7, 13 y 17 solamente estuvieron constituidos por 2 marcadores cada uno. En este análisis fue posible también determinar la distancia de mapa total estimada en 707,5 cM (tabla 7)

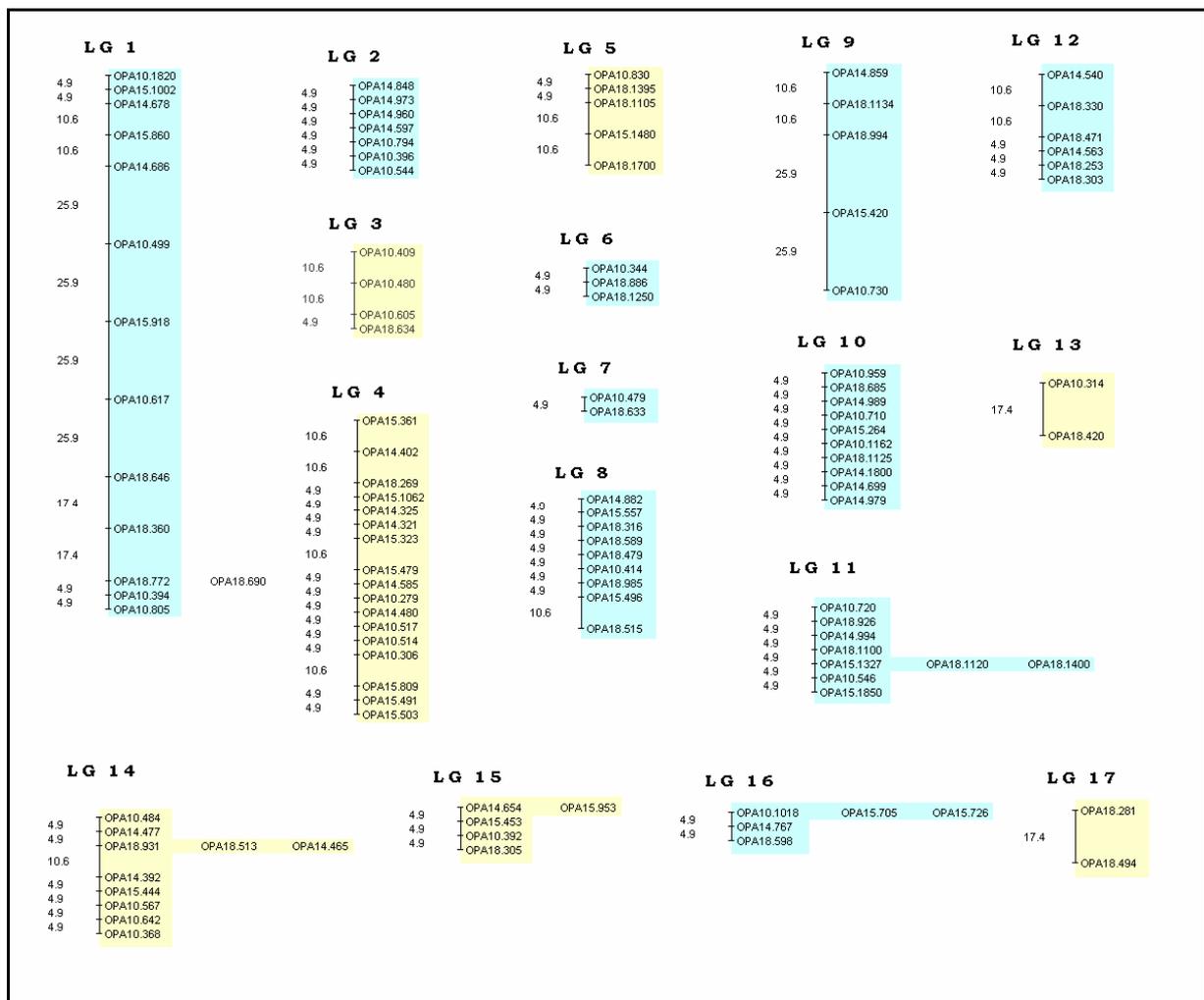


Figura 14. Grupos de ligamiento de híbridos de laboratorio del cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (C22) y sus sucesivas retrocruzadas. Las distancias de mapa fueron marcadas en centimorgans. Marcadores pertenecientes a *A. charrua* son mostrados en amarillo (■) y los pertenecientes a *A. reicherti* en celeste (■)

DISCUSIÓN

Diseño de cruzamientos.

En primer lugar, hay que destacar el hecho de haber logrado continuar con el diseño de cruzamientos planteado, obteniendo y manteniendo un número significativo de descendientes híbridos en las diferentes etapas de cruzamientos. La puesta a punto de las condiciones en que se mantuvieron los individuos y llevaron a cabo los cruzamientos, tales como, temperatura, oxigenación, calidad y cantidad del alimento, relación macho/hembra en las peceras de reproducción, tiempo necesario para la fecundación de los huevos, almacenamiento de las turbas, etc., redundó en el éxito del diseño experimental planteado. Tanto las retrocruzas de los descendientes híbridos con sus respectivos parentales como los cruzamientos intracharco produjeron progenies viables. De todas formas, en la F3 se observa una disminución en el número de individuos obtenidos y un mayor número de ejemplares con deficiencias en su desarrollo (por ejemplo, individuos rampantes) lo que tornó difícil continuar con los cruzamientos más allá de esta generación.

Amplificación del ADN mediante la técnica de RAPD.

Los oligos utilizados en este trabajo mostraron ser muy útiles a la hora de amplificar loci en especies del género *Austrolebias*, como ya se había planteado por García *et al.* (2004). El promedio de loci amplificados para el cruzamiento ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (46,4 loci/oligo) fue sensiblemente menor al obtenido para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* (64.5 loci/oligo). Para ambos cruzamientos el OPA18 fue el cebador con el que se obtuvo más loci amplificados, mientras que el OPA10 fue el que originó menor número para el primer cruzamiento y el OPA15 para el segundo.

El índice de polimorfismo obtenido para el cruzamiento ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (IP=0,57) también fue menor a los obtenidos para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* en los dos análisis realizados (IP=0,70; IP=0,81) (ver tabla 5). También se observan diferencias en cuanto al nivel de polimorfismo que expresan los diferentes cebadores en cada uno de los cruzamientos. Para el cruzamiento ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9) el OPA14 fue ampliamente el más polimórfico mientras que el OPA18 fue el que tuvo menor IP (pese a ser el oligo que amplificó mayor número de loci en este cruzamiento) (tabla 5). Contrariamente, tanto para el diseño correspondiente al cruzamiento C22-D12' (análisis II) como para el diseño completo del cruzamiento C22 (análisis IIIb) correspondiente al

cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti*, el oligo que mostró un índice de polimorfismo mayor fue el OPA18 y el de menor índice fue el OPA 14 (tabla 5). A partir de estos resultados, queda de manifiesto una relación desigual en los índices de polimorfismo que presentan cada uno de los oligos utilizados en función al tipo de cruzamiento analizado, sugiriendo una composición genómica diferente en las especies implicadas.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que la técnica de RAPD es muy útil a la hora de seleccionar un marcador molecular para realizar un mapeo genómico debido a la gran cantidad de loci polimórficos que facilita en un período relativamente corto de tiempo. Asimismo, mediante el testeo de la reproducibilidad de las bandas en diferentes ensayos y descartando aquellos loci que no presentan un tipo de herencia Mendeliana, se evitan posibles inconsistencias en el análisis de los datos. La comparación entre los loci amplificados y el número de loci polimórficos para cada uno de los oligos, es muy importante en el momento de seleccionar los cebadores a utilizar para la generación de marcadores moleculares.

Análisis de clusters.

Para los dos cruzamientos analizados, el agrupamiento en clusters responde primariamente a las relaciones de parentesco entre los individuos:

1. En los cruzamientos ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9), los dos híbridos muestran una mayor similitud con el parental ♂ *A. viarius* correspondiente en comparación a su parental ♀ *A. charrua* (fig. 9). En efecto, las dos ♀ *A. charrua* quedan por afuera del cluster que unen a cada uno de los ♂ *A. viarius* con sus respectivos descendientes, mostrando una mayor similitud entre ellas que con el resto de los individuos. Estos agrupamientos estarían indicando que los dos híbridos heredaron un mayor número de marcadores moleculares pertenecientes a su parental ♂ *A. viarius*. Lamentablemente, la escasa progenie obtenida y la inviabilidad del cruzamiento recíproco nos impide inferir si este tipo de herencia esta relacionada con una mayor introgresión del genoma de *A. viarius*, del parental macho o de una combinación de ambos sucesos, en la descendencia híbrida.

2. Los clusters obtenidos para el cruzamiento ♂ *A. charrua* x ♀ *A. reicherti* señalan una marcada asociación de los individuos según su parentesco, donde en cada generación los hermanos totales se encuentran fuertemente agrupados entre sí (fig. 10). Los híbridos se agrupan cronológicamente en generaciones que se van haciendo divergentes, separándose de los genomas parentales. El resto de los agrupamientos presentan valores de similitud poco significativos.

Grupos de Ligamiento.

Acorde a los diferentes diseños de cruzamientos y enfoques planteados para sus análisis se construyeron un total de 4 mapas de ligamiento preliminares mediante la técnica de RAPD (figs. 11, 12, 13 y 14).

1) Para el cruzamiento ♂ *A. viarius* x ♀ *A. charrua* (C8 y C9), el número de grupos de ligamiento obtenido (29 GL) fue mayor al esperado según el número haploide de la especie ($n=24$). Esto se puede deber a un bajo número de marcadores moleculares que no permiten asociar determinados GL entre ellos y por ello se muestran como GL separados. Otra causa de esta discordancia, y seguramente con mayor influencia en el resultado, sea la escasa progenie obtenida en estos cruzamientos impidiendo así una correcta representación de las posibles clases recombinantes. El mapa obtenido para este cruzamiento se encuentra compuesto únicamente por GL correspondientes al genoma de *A. viarius*, *A. charrua* o GL con marcadores que se encontraban en ambas especies, pero no se obtuvieron GL que presentaran mosaicos de marcadores de ambas especies. Por lo tanto, preliminarmente podemos apreciar una ausencia de recombinación de los genomas parentales en la descendencia híbrida.

2) En los 3 mapas obtenidos para los diferentes análisis del cruzamiento C22 (figs. 12, 13 y 14) se obtuvo un número de GL menor al esperado, ya que el número haploide de ambas especies es $n=24$. En estos análisis podemos apreciar que a medida que se incrementa el número de descendientes y/o de marcadores nos acercamos al número deseado de GL. En los mapas de ligamiento construidos tanto para el cruzamiento C22-D12' (♀ *híbridas* x ♂ *A. reicherti*, fig. 12) como para cuando agregamos el recíproco interespecífico (♀ *híbridas* x ♂ *A. charrua*, análisis IIIa, fig. 13), constatamos la presencia de GL formados por mosaicos de los genomas de las especies parentales, lo que estaría evidenciando la presencia de eventos de recombinación entre ambos genomas en la progenie híbrida. Estos marcadores en algunos casos se encuentran asociados entre sí formando bloques que son transmitidos intactos a los híbridos permaneciendo exentos de procesos de recombinación. Este tipo de herencia de marcadores en eventos de hibridación ya había sido detectada con anterioridad por Rieseberg *et al.* (1995) y Ungerer *et al.* (1998) en especies de girasoles del género *Helianthus*.

Sin embargo, cuando tenemos en cuenta la totalidad de los individuos del C22 (análisis IIIb, fig. 14) y por lo tanto un mayor número de individuos analizados con un mayor número de marcadores, no obtenemos GL recombinantes. Asimismo, a partir del análisis de la progenie de los cruzamientos de los machos híbridos (1414 y 1418) con hembras *A. reicherti*

y *A. charrua*, se obtuvieron GL formados por uno u otro de los genomas parentales y no se apreciaron GL con marcadores de ambos genomas (Rovira com. pers.).

Estos resultados sugieren que más allá del número de progenie y de marcadores analizados, el hecho de no obtener grupos de ligamiento recombinantes está relacionado con otros mecanismos que estarían impidiendo los eventos de recombinación en la descendencia híbrida actuando como posibles mecanismos de aislamiento reproductivo. La presencia de reordenamientos cromosómicos, posibles eventos de introgresión por hibridación y diferencias sexo específico en la recombinación podrían tener relación con estos mecanismos.

Reordenamientos cromosómicos.

Los bloques no recombinantes correspondientes a cada uno de las especies parentales en la descendencia híbrida pueden estar asociados a reordenamientos cromosómicos que impidan la recombinación entre los genomas de *A. charrua* y *A. reicherti*.

Los rearrreglos cromosómicos son de suma importancia en eventos de especiación debido a que en ocasiones pueden causar disrupciones en la meiosis de los híbridos, causando esterilidad (Noor *et al.*, 2001a). En un análisis meiótico de híbridos de laboratorio entre especies del complejo *Austrolebias adloffii* (a partir de cruzamientos de *A. adloffii* x *A. charrua*) García *et al.* (2002b) encuentran diferencias en el número y localización de los quiasmas en la progenie híbrida con respecto a los parentales. Los híbridos interespecíficos y su progenie mostraron una reducida frecuencia y una restringida distribución de los quiasmas. Asimismo, estos individuos presentaron baja viabilidad y una esterilidad parcial, dada por deficiencias en el normal desarrollo de las gónadas.

Rieseberg (2001) sugiere que los rearrreglos cromosómicos (como por ejemplo, inversiones pericéntricas) pueden reducir el flujo génico facilitando los eventos de especiación simpátrica y parapátrica, más por una supresión de la recombinación que actuando directamente sobre el *fitness* de los individuos. Por otro lado, en estudios de hibridación entre especies de *Drosophila* Noor *et al.* (2001) proponen que este efecto puede ser el resultado de la asimetría de incompatibilidades génicas que causan disfunciones en el híbrido más que por una sumatoria de efectos genéticos menores.

No todos los tipos de rearrreglos cromosómicos suprimen la recombinación, una de los tipos más comunes de rearrreglos, las inversiones paracéntricas, no parecen jugar un rol en la especiación debido a que los híbridos son completamente viables y fértiles (Noor *et al.*, 2001).

Especiación.

La arquitectura genética de una especie provee la materia prima para testear teorías de especiación, ofrece la oportunidad de reconstruir los cambios genéticos que acompañan o facilitan la especiación (Bradshaw *et al.*, 1995, 1998) y proporciona un marco de trabajo para la interpretación de patrones de introgresión en zonas híbridas naturales (Barton & Hewitt, 1985). Adicionalmente, esperamos que las diferentes formas y tiempos de especiación estén relacionadas con diferentes arquitecturas genéticas, quizás interviniendo en las frecuencias de los procesos de especiación en la naturaleza y en la velocidad con que estos ocurren. Posiblemente, algunos eventos de introgresión sucedan en la formación inicial de las especies híbridas debido a que los híbridos de retrocruzamientos son más fértiles y fácilmente producidos que otras clases genotípicas híbridas (Heiser *et al.*, 1969).

Diferentes eventos de hibridación han sido testeados en especies de girasoles salvajes (*Helianthus* sp.) donde incluso se ha propuesto el origen de una nueva especie homoploide vía hibridación entre especies parentales cromosómica o genéticamente divergentes (Rieseberg *et al.*, 1995; Ungerer *et al.*, 1998). El aislamiento reproductivo de estas especies híbridas parece haber acompañado la estabilización del genoma debido al agrupamiento de factores cromosómicos y genéticos que inducen la esterilidad, el cual se ve facilitado por una rápida evolución cariotípica. Brown *et al.* (2004) también plantean dicho proceso de especiación en *Drosophila* destacando la aparición de rearrreglos cromosómicos en las especies híbridas que facilitan el aislamiento reproductivo.

García *et al.* (2004) proponen que el complejo *A. adloffii* puede haber surgido como consecuencia de un evento antiguo de hibridación seguido por su posterior divergencia y plantean la hipótesis de posibles introgresiones por hibridación entre taxones hermanos del complejo *A. adloffii* y/o la posible ocurrencia de eventos simultáneos de rápida especiación que llevaron a la diferenciación de estas especies (García, 2006). En este marco de especiación rápida, el grado de homología genómica para la recombinación que presenten las diferentes especies va a estar dado por el grado de divergencia entre ellas. De este modo, la escasa divergencia genética encontrada entre *A. reicherti* y *A. charrua* (11%) (García, 1996) explica la existencia de eventos de recombinación en los híbridos producidos, mientras que una mayor divergencia entre estas especies con respecto a *A. viarius* refuerza los mecanismos de aislamiento postcigótico impidiendo los eventos de recombinación.

Para Ungerer *et al.* (1998) la especiación rápida podría ser la regla más que la excepción para las especies recombinantes. Sin embargo, la especiación por recombinación representa solamente una de las varias vías conocidas de especiación rápida. Otras

posibilidades incluyen, aloploidía, cambios en los sistemas de apareamiento, fijación de rearrreglos cromosómicos, rápida adaptación a nuevos hábitats. El análisis de los bloques no recombinantes de las especies parentales en zonas híbridas naturales nos puede permitir estimar el tiempo de especiación, datar eventos de contacto secundario, y estimar el número de genes afectando la viabilidad de los híbridos.

Diferencias sexo específico en la recombinación.

Según Haldane (1922) y Huxley (1928), cuando en la descendencia de dos especies diferentes un sexo es raro, ausente o estéril, ese sexo es el heterogamético. En nuestro trabajo si bien no podemos apreciar una diferencia significativa en el número total de machos y hembras obtenido, se aprecia un mayor número de machos en la F2, sobre todo cuando el parental híbrido también es macho (fig. 7).

Por otro lado, cuando analizamos el cruzamiento correspondiente al C22-D12' (♀ híbrida x *A. reicherti*), donde se obtuvo un ♂ híbrido en la F2 (1517), podemos observar que se obtuvo una progenie significativamente mayor en número, en comparación al resto de los cruzamientos realizados. Por el contrario cuando esta ♀ híbrida se cruza con un macho *A. charrua* (originando una ♀ híbrida (1490) la progenie obtenida es sensiblemente menor. A su vez, se detectó que la fecundidad de los machos de la F2 es mayor especialmente cuando dichos machos se cruzan con ♀ *A. reicherti* que cuando se cruzan con ♀ *A. charrua*. Asimismo, en cruzamientos interespecíficos con individuos del complejo *A. adloffii*, realizados con anterioridad (García *et al.*, 2002) se detectó la ausencia de ♀ híbridas. A partir de estos datos podríamos formular la hipótesis de que los ♂ híbridos tienen un mayor éxito en la reproducción en comparación a las ♀ híbridas, y que por lo tanto las hembras podrían ser candidatas a representar el sexo heterogamético en estos taxa.

Como explicamos anteriormente, se conocen varias especies de peces en donde se han podido determinar diferencias en las tasas de recombinación sexo-específica (trucha “arcoiris” (Sakamoto *et al.*, 2000), zebrafish (Knapik *et al.*, 1998), catfish (Waldbieser *et al.*, 2001) donde usualmente en el sexo heterogamético la recombinación se ve reducida (Haldane, 1922). En este trabajo, la construcción de grupos de ligamiento para el cruzamiento C22-D12' (♀ híbrida x ♂ *A. reicherti*) a partir del ♂ híbrido de la F2 (1517) evidenció la existencia de eventos de recombinación en los híbridos obtenidos. Asimismo, dado que estos ♂ híbridos surgen del cruzamiento de ♀ híbrida x ♂ *A. reicherti* y que la retrocruza con una ♀ *A. reicherti* (1503) es la que origina una descendencia notoriamente mayor, podemos plantear la

hipótesis de que estos machos “guardan” la capacidad de recombinación y que se ve favorecida al retrocruzarse con ♀ de la misma especie parental (en este caso *A. reicherti*).

Aislamiento reproductivo.

Nuestros datos evidencian procesos que podrían representar mecanismos de aislamiento reproductivo postcigóticos entre especies del complejo *A. adloffii*. Desde que las especies de este complejo difieren en la estructura cariotípica, debido a la existencia de reordenamientos cromosómicos, como inversiones pericéntricas (García, 2006), estos rearrreglos cromosómicos podrían proteger ciertas regiones del genoma de eventos de recombinación permitiendo la transmisión de bloques de marcadores moleculares de ambas especies en los genomas híbridos. No obstante, un bajo grado de divergencia genética entre los diferentes taxones podría estar facilitando la aparición de eventos de recombinación meiótica.

Perspectivas.

Con el fin de obtener un mapa genético de alta densidad sería importante aumentar el número de individuos de nuestro análisis (ajustando el diseño experimental especialmente en las etapas de eclosión y cría) y el número de marcadores RAPDs, con el fin de “saturar” el genoma y poder llegar al número esperado de grupos de ligamiento según el número haploide ($n=24$) de las especies en estudio. A su vez, un diseño experimental más ajustado a dicho objetivo nos permitiría tener una representación mayor de las posibles clases recombinantes.

La implementación de otros tipos de abordajes, como el análisis de procesos meióticos y la detección de complejos sinaptonémicos en híbridos interespecíficos podrían clarificar los procesos que conllevan a la imposición de barreras de aislamiento reproductivo postcigótico.

En particular, la gran variabilidad cromosómica que presenta *A. charrua*, con 4 citotipos diferentes (fig. 5), lo convierte en un taxón muy interesante a la hora de realizar estudios citogenéticos y moleculares con el fin de testear posibles mecanismos de aislamiento postcigótico.

Finalmente, un muestreo exhaustivo buscando posibles zonas de contacto entre especies del complejo *A. adloffii* donde se puedan encontrar híbridos naturales sería de gran importancia a la hora de testear posible flujo génico y contactos secundarios entre las diferentes especies.

REFERENCIAS

- Arezo, M. J., L. Pereiro & N. Berois, 2005.** Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology* 66, 1357-1370.
- Ahl, E., 1922.** Die gattung *Cynolebias* Steindachner. *Blätter für Aquarien und Terrarienkunde* 33: 1-5.
- Barton, N. H. & G. M. Hewitt, 1985.** Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113–148.
- Beeman, R.W. & S. J. Brown, 1999.** RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics* 153: 333–338.
- Bradshaw, H. D. Jr., S. M. Wilbert, K. G. Otto & D. W. Schemske, 1995.** Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* 376: 762-765.
- Bradshaw, H. D. Jr., K. G. Otto, E. Frewen-Barbara, K. McKayJohn & D. W. Schemske, 1998.** Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (*Mimulus*). *Genetics* 149: 367–382.
- Brooks, D. R. & D. A. McLennan, 1991.** Phylogeny, ecology, and behavior. A research program in comparative biology. *Chicago: University of Chicago Press.*
- Brown, K. M., L. M. Burk, L. M. Henagan & M. A. F. Noor, 2004.** A Test of the Chromosomal Rearrangement Model of Speciation in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 58: 1856-1860.
- Butruille, D. V., R. P. Guries & T. C. Osborn, 1999.** Linkage Analysis of Molecular Markers and Quantitative Trait Loci in Populations of Inbred Backcross Lines of *Brassica napus* L. *Genetics* 153: 949-964.

- Costa, W. J. E. M., 2006.** The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213: 1-162.
- Costa, W. E. J. M. & M. M. Cheffe, 2001.** Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna Dos Patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (Ahl) (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, Ser Zoologia* 14(2): 179-200.
- Coyne, J. A. & H. A. Orr, 2004.** Speciation. *Sinauer Associates, Inc. Publishers.* Sunderland, Massachusetts. U.S.A.
- Danzmann, R. G. & K. Gharbi, 2001.** Gene mapping in fishes: a means to an end. *Genetica* 111: 3-23.
- Dib, C., S. Faure, C. Fizames, S. Samson, N. Drouot et al., 1996.** A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152–154.
- Dietrich, W. F., J. Miller, R. Steen, M. A. Merchant, D. Damron- Boles et al., 1996.** A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380: 149–152.
- Dobzhansky, T., 1937a.** Genetic nature of species differences. *Am Nat* 71: 404-420.
- Echt, C.S. & C. D. Nelson, 1997.** Linkage mapping and genome length in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Theor. Appl. Gene.t* 94: 0131–0137.
- Felsenstein, J., 1981.** Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of animals? *Evolution* 35: 124–138.
- Ferguson, M. M. & R. G. Danzmann, 1998.** The role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1553-1563.
- Garcia, G., 1996.** Reconstrucción de las relaciones filogenéticas y de los eventos de cladogénesis en el género *Cynolebias* Steindachner 1876, en base a datos cromosómicos y

de ADN mitocondrial. Tesis de Doctorado. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.

García, G., 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *JZS* 44: 75-87.

García, G., G. Wlasiuk & E. P. Lessa, 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 129: 93-110.

García, G., A. I. Lalanne, G. Aguirre & M. Cappetta, 2001. Chromosome evolution in annual killifishes genus *Austrolebias* and mitochondrial phylogenetic analysis. *Chromosome Research* 9: 93-100.

García, G., F. Alvarez-Valin & N. Gomez, 2002a. Mitochondrial genes: Signals and noise in phylogenetic reconstruction within killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 49-59.

García, G., A. Pereira, I. Carrera & A. Márquez, 2002b. Genetic relationships in a complex of *Austrolebias* species (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from eastern Uruguay and Southern Brazil. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 13: 1-11.

García, G., S. Claramunt & A. I. Lalanne, 2004. Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes* 70: 247-256.

Haldane, J. B. S., 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12: 101-109.

Hammer, Ø. & D. A. T. Harper, 2004. PAST – Palaeontological STatistics, version 1.24. Available at <http://folk.uio.no/ohammer/past>.

- Heiser, C. B., 1947.** Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Evolution* 1: 249–262.
- Heiser, C. B., D. M. Smith, S. B. Clevenger & W. C. Martin, 1969.** The North American sunflowers (*Helianthus*). *Mem. Torrey Bot. Club* 22: 1–213.
- Huxley, J., 1928.** Sexual difference of linkage in *Gammarus chevreuxi*. *J. Genet.* 20: 145-156.
- Johnson, S. L., C. N. Midson, E. W. Ballinger & J. H. Postlethwait, 1994.** Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish. *Genomics* 19: 152–156.
- Kazianis, S., D. C. Morizot, B. B. McEntire, R. S. Nairn & R. L. Borowsky, 1996.** Genetic mapping in *Xiphophorus* hybrid fish: assignment of 43 AP-PCR/RAPD and isozyme markers to multipoint linkage groups. *Genome Res.* 6: 280–289.
- King, M., 1993.** Species evolution: the role of chromosome change. *Cambridge Univ. Press.* Cambridge, U.K.
- Khoo, G., M. H. Lim, H. Suresh, D. K. Y. Gan, K. F. Lim, F. Chen, W. K. Chan, T. M. Lim & V. P. E. Phang, 2003.** Genetic Linkage Maps of the Guppy (*Poecilia reticulata*): Assignment of RAPD Markers to Multipoint Linkage Groups. *Marine Biotechnology* 5: 279-293.
- Knapik, E. W., A. Goodman, O. S. Atkinson, C. T. Roberts, M Shiozawa *et al.*, 1996.** A reference cross DNA panel for zebrafish (*Danio rerio*) anchored with simple sequence length polymorphisms. *Development* 123: 451–460.
- Knapik, E. W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado *et al.*, 1998.** A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nat. Genet.* 18: 338-343.

- Kocher, T. D., W. J. Lee, H. Sobolewska, D. Penman & B. McAndrew, 1998.** A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.
- Laayouni, H., M. Santos & A. Fontdevila, 2000.** Toward a physical map of *Drosophila buzzatii*: use of randomly amplified polymorphic DNA polymorphisms and sequence-tagged site landmarks. *Genetics* 156: 1797–1816.
- Lenormand, T., 2003.** The Evolution of Sex Dimorphism in Recombination. *Genetics* 163: 811-822
- Loureiro, M., 2004.** Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Tesis de Doctorado. PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 1996.** External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia* 1996 (4): 1016-1022.
- Loureiro, M. & R. O. de Sá, 2000.** Ornamentación del corion en los huevos de especies de *Austrolebias* y *Simpsonichthys* (Rivulidae: Cynolebiatinae). *FACENA* 16: 85-91.
- Loureiro, M., M. Azpelicueta y G. García, 2004.** *Austrolebias arachan* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a new species of annual fish from northeastern Uruguay. *Revue Suisse de Zoologie* 111: 21-30.
- Loureiro, M. & G. García, 2004.** *Austrolebias reicherti*, a new annual fish species (Rivulidae: Cynolebiatinae) from southern Laguna Merín basin. *Acta Zoológica Lilloana* 48: 13-23
- Manly, K. F. & J. M. Olson, 1999.** Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome* 10: 327-334. Available at <http://mcbio.med.buffalo.edu/map-mgr.html>.

- Marklund, L., M. J. Moller, B. Hoyheim, W. Davies, M. Fredholm *et al.*, 1996.** A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. *Anim. Genet.* 27: 255–269.
- Medrano, J. F., E. Aasen & L. Sharrow, 1990.** DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Michelmore, R. W., I. Paran & R. V. Kesseli, 1991.** Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828–9832.
- Morgan, T. H., 1914.** No crossing over the male *Drosophila* of genes in the second and third pair of chromosomes. *Biol. Bull.* 26: 195–204.
- Morizot, D. C., S. A. Slaughaupt, K. D. Kallaman & A. Chakravarti, 1990.** Genetic linkage map of fishes of the genus *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Genetics* 127: 399-410.
- Naruse, K., S. Fukamachi, H. Mitani, M. Kondo, T. Matsuoka, S. Kondo, N. Hanamura, Y. Morita, K. Hasegawa, R. Nishigaki, A. Shimada, H. Wada, T. Kusakabe, N. Suzuki, M. Kinoshita, A. Kanamori, T. Terado, H. Kimura, M. Nonaka & A. Shima, 2000.** A Detailed Linkage Map of Medaka, *Oryzias latipes*: Comparative Genomics and Genome Evolution. *Genetics* 154: 1773-1784.
- Neff, M. W., K. W. Broman, C. S. Mellersh, K. Ray, G. M. Acland *et al.*, 1999.** A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151: 803–820.
- Nelson, J. S., 1994.** *Fishes of the World. Third Edition.* John Wiley & Sons.
- Noor, M. A. F., K. L. Grams, L. A. Bertucci & J. Reiland, 2001a.** Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12084–12088.

- Ortíz-Barrientos, D., J. Reiland, J. Hey & M. A. F. Noor, 2002.** Recombination and the divergence of hybridizing species. *Genetica* 116: 167–178.
- Postlethwait, J. H., S. L. Johnson, C. N. Midson, W. S. Talbot, M. Gates, E. W. Ballinger, D. Africa, R. Andrews, T. Carl, J. S. Eisen, S. Horne, C. B. Kimmel, M. Hutchinson, M. Johnson & A. Rodriguez, 1994.** A Genetic Linkage Map for the Zebrafish. *Science* 264: 699-703
- Reiter, W. S., J. G. K. Williams, K. A. Feldmann, J. A. Rafalski, S. V. Tingey & P. A. Scolnik, 1992.** Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477–1481.
- Ribeiro, A. C., 2006.** Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4(2): 225-246.
- Rieseberg, L. H., 1996.** Homology among RAPDS fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-105.
- Rieseberg, L. H., 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(7): 351-358.
- Rieseberg, L. H., Ch. Van Fossen & A. M. Desrochers, 1995.** Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature* 375: 313-316.
- Rieseberg, L. H., J. Whitton & K. Gardner, 1999.** Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152: 713–727.
- Sakamoto, T., R. G. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki et al., 2000.** A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* 58: 219–232.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Ed. *Cold Spring Harbor, Laboratory Press*, New York.
- Sanguinetti, C., F. Diaz Neto & A. J. Simson, 1994.** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on acrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.
- Schaefer, S. A., 1998.** Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena Z. M., Lucena, C. A. S., eds.) pp. 375-400. Porto Alegre: Edipucrs.
- Singer, A., H. Perlman, Y. Yan, C. Walker, G. Corley-Smith, B. Brandhorst & J. Postlethwait, 2002.** Sex-Specific Recombination Rates in Zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* 160: 649–657.
- Sprechmann, P., 1980.** Paleoecología, paleogeografía y estratigrafía de la región costera del Uruguay durante el Neogeno y Cuaternario. *Resúmenes Actas I Congreso Latinoamericano de Paleontología* 3: 237-256.
- Trickett, A. J. & R. K. Butlin, 1994.** Recombination suppressors and the evolution of new species. *Heredity* 73: 339–345.
- Ungerer, M. C., S. J. E. Baird, J. Pan & L. H. Rieseberg, 1998.** Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11757-11762.
- Vari, R. P. & L. R. Malabarba, 1998.** Neotropical ichthyology: an overview. *Phylogeny and classification of neotropical fishes* (Malabarba, L. R., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena Z. M., Lucena, C. A. S., eds.) pp. 1-11. Porto Alegre: Edipucrs.
- Vaz-Ferreira, R. & A. R. Melgarejo, 1984.** La distribución de las especies del género *Austrolebias* Steindachner 1876, en el Uruguay, con notas sobre *C. alexandri* Castello y Lopez, 1974. *Bol. Soc. Zool., Uruguay* 2: 41-46.

- Waldbieser, G. C., B. G. Bosworth, D. J. Nonneman & W. R. Wolters, 2001.** A microsatellite based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics* 158: 727–734.
- Wourms, J. P., 1972a.** The developmental biology of the annual fishes. pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal of Experimental Zoology* 182: 169-200.
- Yasukochi, Y., 1998.** A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* 150: 1513–1525.
- Young, W. P., P. A. Wheeler, V. H. Coryell, P. Keim & G. H. Thorgaard, 1998.** A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148: 839-850.
- Zickler, D. & N. Kleckner, 1999.** Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603–754.

ANEXO I - INDIVIDUOS

Tabla 6. Individuos utilizados en el diseño de cruzamientos y posteriormente ingresados al catálogo de Peces de la Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UDELAR. Indet: sexo indeterminado.

Nº de catálogo	Origen	Cruzamiento	Especie	Sexo
1241	charco 3	-	<i>A. viarius</i>	m
1336	charco 3	-	<i>A. viarius</i>	m
1245	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1343	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	m
1425	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1496	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	m
1498	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	m
1511	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	m
1516	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1529	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1533	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1537	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	m
1538	charco 32	-	<i>A. charrua</i>	h
1342	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1487	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1488	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	m
1499	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1503	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1512	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1513	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1546	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1547	charco 56	-	<i>A. reicherti</i>	h
1414	híbrido F1	C 22	híbrido	m
1415	híbrido F1	C 22	híbrido	h
1418	híbrido F1	C 22	híbrido	m
1419	híbrido F1	C 22	híbrido	h
1412	híbrido F1	C 8	híbrido	m
1413	híbrido F1	C 9	híbrido	h
1517	híbrido F2	D 12'	híbrido	m
1526	híbrido F2	D 20	híbrido	m
1493	híbrido F2	D 4	híbrido	m
1494	híbrido F2	D 5	híbrido	m
1490	híbrido F2	D 6	híbrido	h
1492	híbrido F2	D 6	híbrido	h
1569	híbrido F3	E 10	híbrido	indet
1570	híbrido F3	E 15	híbrido	indet
1560	híbrido F3	E 23	híbrido	h
1561	híbrido F3	E 23	híbrido	m
1562	híbrido F3	E 23	híbrido	indet
1563	híbrido F3	E 23	híbrido	indet
1566	híbrido F3	E 23	híbrido	indet
1567	híbrido F3	E 23	híbrido	indet
1571	híbrido F3	E 23	híbrido	indet
1564	híbrido F3	E 27	híbrido	indet
1565	híbrido F3	E 27	híbrido	indet
1557	híbrido F3	E 30	híbrido	h
1558	híbrido F3	E 30	híbrido	h
1559	híbrido F3	E 30	híbrido	indet
1568	híbrido F3	E 4	híbrido	indet

ANEXO II - PROTOCOLOS

Extracción de ADN para PCR sin fenol-cloroformo

Este protocolo puede aplicarse en extracciones de ADN para pequeños valores (aprox. 20 mg) de tejido fresco o congelado (-80°C). Se partirá de trozos de hígado conservados en etanol absoluto.

1. En zona estéril, colocar cada trozo de hígado (aprox. 20 mg) en un tubo eppendorf de 1.5 mL (rotulados por número de individuo).
2. Lavar el tejido 2 veces con 1 mL de *buffer* 1X STE en frío, rápidamente. Sacar el fluido.
3. Agregar 550 uL de *buffer* de lisis e inmediatamente 11 uL de Proteinasa K. Homogeneizar con varilla de vidrio estéril. Mezclar hasta que el tejido esté casi deshecho.
4. Una hora antes de acabar la incubación, colocar, en cada tubo, 5.5 uL de RNAsa A.
5. Incubar en estufa O/N a 55°C (mínimo 3 horas hasta la desintegración del tejido).
6. Incubar 1 h / 55°C.
7. Centrifugar 10 min. / 12.000 rpm, en microcentrífuga a temperatura ambiente (TA).
8. Transferir el sobrenadante (aprox. 550 uL) a otro tubo de 1.5 uL (previamente rotulado) y agregarle 350 uL de NaCl 5M (conc. Final NaCl \approx 2M). Agitar unos segundos y centrifugar 30 min. / 12.000 rpm a TA.
9. Colocar aprox. 400 uL del sobrenadante en un nuevo tubo (2 por muestra, rotulados). Agregar el doble del volumen del sobrenadante (por ej. 800 uL) de EtOH absoluto en frío. Agitar el tubo lentamente, permitiendo que la interfase con el alcohol se vaya mezclando paulatinamente y se pueda visualizar el ADN precipitado (hebra blanca). El ADN precipita en forma de “pellet”, tirar el sobrenadante y dejar escurrir el pellet. Dejar los tubos durante 3-4 días a 4°C.
10. Centrifugar 30 min. / 12.000 rpm a TA.
11. Lavar el pellet 2 veces:
 - 1 mL de EtOH 70 %. Centrifugar 5 min. / 6.000 rpm. Sacar el sobrenadante.
 - 1 mL de EtOH 70 %. Centrifugar 5 min. / 6.000 rpm. Sacar el sobrenadante.Secar el pellet en estufa a 37°C (dejar los tubos con la tapa abierta).
12. Agregar 50 uL de *buffer* 1X TE, resuspender el pellet y poner los tubos en un baño a 65°C / 20 min. Resuspender el pellet con una pipeta. Guardar los tubos a 4°C. Si el ADN no va a ser utilizado a la brevedad, guardarlos por largos períodos a -20°C.

Gel de agarosa 1%

1. Disolver en un matraz agarosa en *buffer* 1X TAE (1g / 100 mL *buffer*). Calentar hasta que la agarosa esté bien disuelta y agregar Bromuro de Etidio (10 mg/mL): 5uL / 100 mL de *buffer*. Verter en el soporte montado (soporte y peine) y dejar solidificar.

2. Se preparan las muestras en un trozo de parafilm, colocando 5 uL de muestra y 2 uL de *Loading buffer* antes de cargar el gel.
3. Realizar la corrida electroforética a 80V. Se deja correr hasta que los colorantes del *Loading buffer* hayan migrado una distancia apropiada.
4. Visualización del gel en transiluminador de luz UV y registro fotográfico.

Gel de acrilamida 6%

Geles de 50 mL

1. Mezclar en una probeta de 100 mL: 50mL de acrilamida 6%, 500 μ L de solución de APS al 10 % y 50 μ L de TEMED. Verter en el soporte montado, colocar el peine y dejar solidificar durante 30 minutos.
2. Se preparan las muestras en un trozo de parafilm, colocando 6,5 μ L de muestra y 2 μ L de *loading buffer* antes de cargar el gel. Preparar una muestra consistente en 2 μ L de *loading buffer* y 2 μ L de marcador de peso molecular 1 kb *ladder*.
3. Realizar la corrida electroforética entre 110-140 V en *buffer* TBE 1X. se deja correr hasta que el primer frente de corrida haya salido del gel (aprox. 6 horas).

Tinción con Nitrato de Plata

1. FIJACIÓN: Despegar el gel de una de las láminas del soporte y sumergirlo en solución fijadora (450 mL de H₂O, 60 mL de alcohol etílico 95 % y 1,250 mL de Ácido acético glacial), despegarlo de la otra lámina del soporte y dejar durante 15 minutos agitando suavemente.
2. TINCIÓN: Retirar la solución fijadora y sumergir el gel en la solución de plata (0,9 g de nitrato de plata en cristales disueltos en 450 mL de H₂O). Agitar con movimientos suaves durante 10 minutos exactos.
3. Retirar la solución de plata y lavar el gel con H₂O rápidamente. Descartar el agua.
4. REVELADO: Verter la solución de revelado (450 mL de H₂O, 1,250 mL de Formaldehído y 13,5 g de NaOH en perlas) agitar suavemente hasta que se vean bien las bandas.
5. Retirar la solución de revelado y volver a sumergir el gel en solución fijadora por 15 minutos. Los geles son empapelados en papel celofán transparente sobre un vidrio y se dejan secar por 2-3 días. Esta forma de conservación facilita la lectura del gel, y permite fotografiarlo y guardarlo como un registro original.