

Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Sección Evolución

¿Es *Ctenomys rionegrensis* una especie
estrictamente solitaria?

Evaluación de las relaciones de parentesco de
individuos procedentes de capturas múltiples

Lucía Sánchez Di Maggio

Tutora: Ivanna Tomasco

Informe de Pasantía, mayo 2009. Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Opción Genética y Evolución

INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Objetivo.....	9
Materiales y métodos.....	10
Resultados.....	15
Discusión.....	25
Bibliografía.....	30
Anexo: tabla 1.....	33
Anexo: tabla 2.....	34
Anexo: tabla 3.....	35

RESUMEN

Salvo excepciones, las especies del género *Ctenomys* son consideradas solitarias, por lo que si se encontrara más de un ejemplar por cueva fuera de la temporada de apareamiento, estos deberían ser los adultos macho y hembra, madres con sus crías o hermanos. Sin embargo, para la especie *C. rionegrensis* se han capturado varios individuos en la misma cueva. Con el objetivo de evaluar la forma de compartir cuevas en esta especie se genotiparon 12 microsátélites en 24 individuos procedentes de 8 cuevas donde se registraron capturas múltiples entre Octubre y Noviembre de 1999 en el departamento de Río Negro, Uruguay. Los parámetros descriptivos y el índice de relacionamiento (R) fueron calculados utilizando el software *Cervus 3.0* y *Kingroup v2*. El número de alelos por locus y el PIC (Polimorphic Information Content) varió desde 1 hasta 5 y desde 0,154 a 0,71, respectivamente, además la probabilidad de exclusión acumulada para todos los loci se ubicó por encima de 99%. El análisis de exclusión, teniendo en cuenta sexo, edad y fecha de captura confirmó que individuos de tres de las ocho cuevas no están emparentados y de esta forma podemos excluir la situación esperada para especies solitarias. También se encontró que individuos encontrados en diferentes cuevas poseen algún grado de parentesco. Estos resultados, en conjunto con la información demográfica, sugieren que los individuos pertenecientes a la especie *C. rionegrensis* poseen algún grado de comportamiento social no esperado para especies solitarias. También es posible que el incremento de la movilidad durante ciertos periodos de tiempo los haga capaces de compartir cuevas.

1. INTRODUCCION

1.1- Aspectos Generales del Género *Ctenomys*.

El extenso grupo de roedores histricognatos de vida subterránea reunidos en el género *Ctenomys* (“tuco-tucos”) se distribuyen de forma irregular desde el centro-este de Perú y sudeste de Brasil hasta Tierra del Fuego entre los 17° y 54° de latitud sur. Aunque la mayor densidad de especies se encuentra entre los 25°- 35° latitud sur y decrece abruptamente hacia el sur y norte. Ocupan un gran rango de ambientes que se extienden desde el nivel del mar hasta los 4000 metros de altura (Lacey et al., 2000; Reig et al., 1990.). Se los puede encontrar en praderas, desiertos, dunas, y bosques tropicales, probablemente debido a las condiciones de temperatura y humedad estables que proporciona la vida subterránea en cuevas (Altuna, 1991).

Los roedores son uno de los tres órdenes de mamíferos subterráneos junto a marsupiales e insectívoros que obtuvieron esta forma de vida de manera independiente. El ecotopo subterráneo se caracteriza por la ausencia de luz, bajos niveles de oxígeno y altos niveles de dióxido de carbono, entre otras características que determinan que las especies que adoptan este modo de vida compartan adaptaciones morfológicas y fisiológicas (Lacey, 2000; Lessa, 1990; Nevo, 1999). En la gran mayoría de las especies del género *Ctenomys* las bocas de las cuevas permanecen cerradas por tapones que permiten mantener un microclima además de dar protección frente a depredadores.

La rápida y explosiva cladogénesis ocurrida dentro de este género durante el Pleistoceno medio (período más antiguo del Cuaternario, está comprendido entre los 1,8-1,6 millones y los 10.000 años antes del presente) originó la más amplia diversidad específica alcanzada entre los roedores de vida subterránea (Reig et al., 1990). Según estudios paleontológicos publicados en 2002 por Verzi ningún otro género de la familia Ctenomyidae sufrió cladogénesis explosiva en ese período.

En la actualidad el número de especies vivientes reconocidas dentro del género es controvertido. Cabrera (1961) redujo su número a 27 especies y 52 subespecies mientras que Giménez et al. (1999) reconocen más de 60 especies. Según Reig et al.

(1990) la revisión del material conocido sobre el género junto con el concepto de especie (Mayr, 1963) permitió reconocer 56 especies vivientes y 13 subespecies.

Estudios posteriores usando marcadores moleculares han arrojado luz sobre el tema, (D'Elía et al., 1998 y Lessa & Cook, 1998 -alozimas, citocromo b-; Slamovits et al. 2001 -ADN satélite-; Castillo et al., 2005 -intrones-; Parada 2007 –citocromo b y muestreo denso de individuos). Pero el tema está lejos de ser resuelto, ya que no ha sido posible dilucidar las relaciones basales entre grupos de especies dentro del género, lo que apoya la hipótesis de la reciente radiación explosiva del mismo.

La anatomía interna y externa es asombrosamente similar en las diferentes especies y difieren entre ellas por tamaño, color del pelaje y otras características menores (Reig et al., 1990). A pesar de sus diferencias morfológicas y ecológicas comparten un rasgo que los caracteriza: su dentadura altamente especializada para roer (entre otras).

En Uruguay existen tres especies de *Ctenomys*: *C. torquatus* (Lichtenstein, 1830), *C. rionegrensis* (Langguth y Abella, 1970) y *C. pearsoni* (Lessa y Langguth, 1983). *C. rionegrensis* es particularmente interesante para los estudios que llevan a la diferenciación geográfica, por los motivos que se presentarán a continuación.

1.2- *Ctenomys rionegrensis*

1.2.1- Distribución geográfica.

La distribución geográfica de *C. rionegrensis* comprende una pequeña área, aproximadamente 3.000 Km², del sur oeste del departamento de Río Negro, Uruguay. Su hábitat está caracterizado por dunas de arena y existen tres poblaciones aisladas en Argentina (D'Elía et al., 1999).

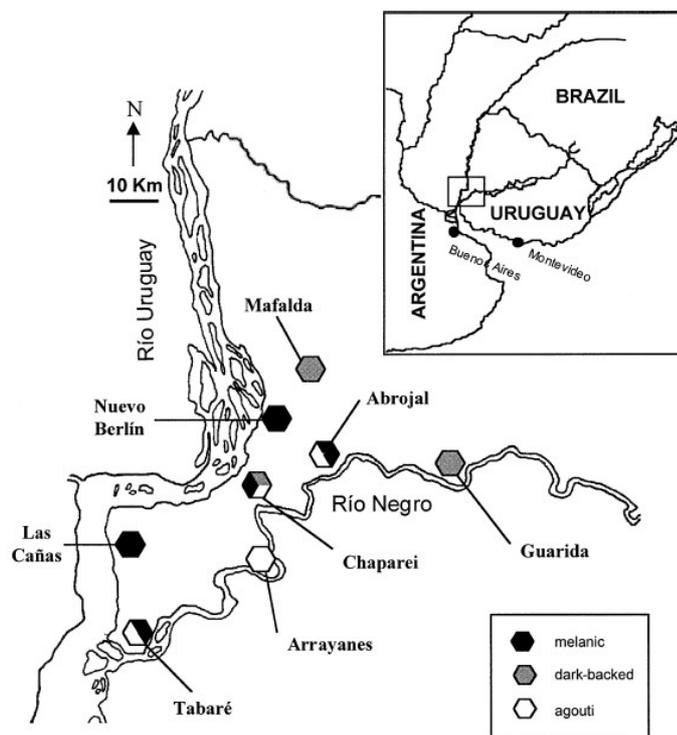


Figura 1. Mapa mostrando la distribución geográfica de la especie en el departamento de Río Negro, Uruguay así como también los tipos de pelaje presentes en cada población: Melánico (negro), Dorso-oscuro (gris) y Agutí (blanco).

A pesar de su acotado rango de distribución geográfica *C. rionegrensis* posee un marcado polimorfismo cromático: melánico, agutí y dorso-oscuro (Figura 2). Se han encontrado tanto poblaciones con un sólo tipo de pelaje como polimórficas con dos o tres tipos de pelaje. Los individuos melánicos son uniformemente negros, mientras que los agutí son claros y pueden presentar áreas oscuras en la cabeza (Langguth y Abella, 1970) (Figura 2). Los especímenes cuyo pelaje es dorso-oscuro se caracterizan por una ancha banda de color marrón grisáceo en la zona medio-dorsal que se extiende desde el hocico hasta la base de la cola. En general existe una estrategia antidepredadora donde se aprecia cierta correspondencia entre el color del pelaje y del sustrato. Pero los individuos con pelaje melánico contrastan claramente con los suelos arenosos que predominan en el área de distribución de la especie. Una hipótesis que pretende explicar el origen y mantenimiento de los individuos melánicos se basa en la capacidad que tiene la deriva genética para fijar alelos neutros en poblaciones pequeñas y aisladas. Estudios previos realizados con alozimas por D'Elía et al. (1998) no lograron un grado de resolución como sucedió con otros marcadores tales como microsatélites y el gen del citocromo b (Wlasiuk et al., 2003). Estos últimos trabajos mostraron niveles inferiores de deriva genética y flujo génico que las indicadas para alozimas lo que sugiere que las

poblaciones estarían fuertemente estructuradas aunque y no se descartaría la influencia de la deriva genética en la fijación del pelaje melánico en algunas poblaciones a pesar de su gran contraste con el medio ambiente.

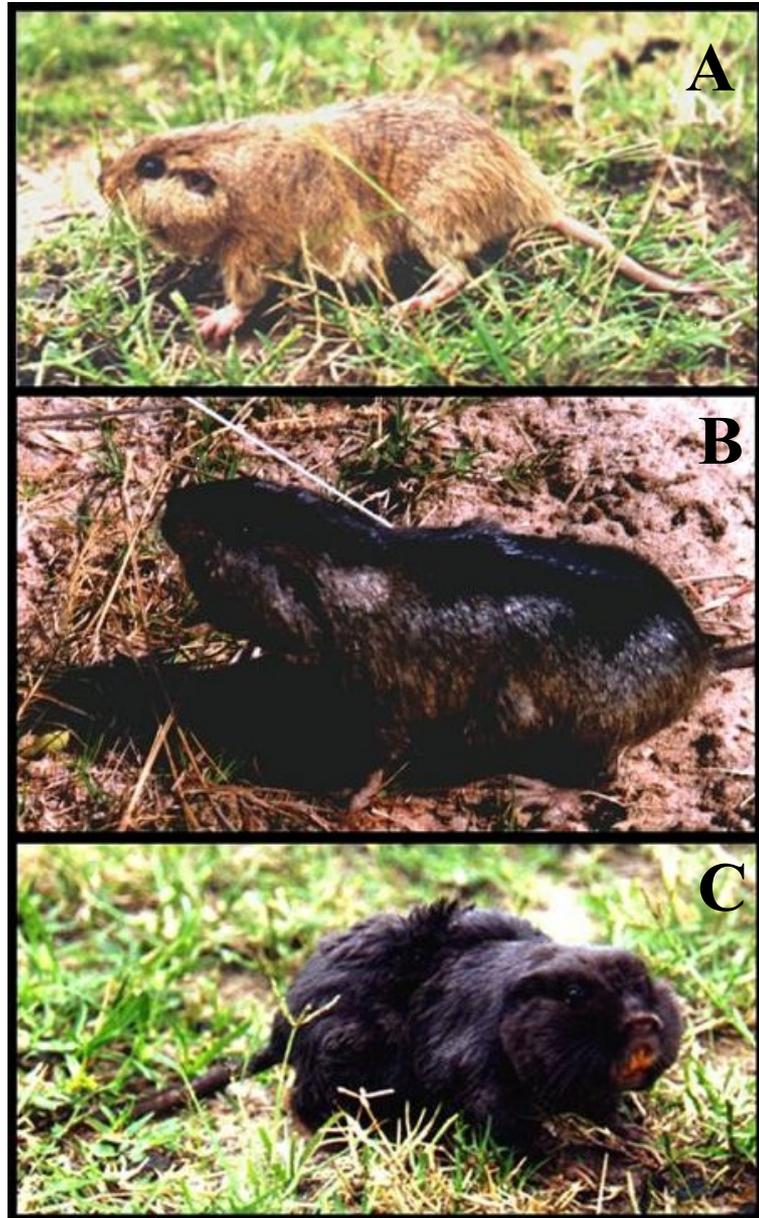


Figura 2. Fotografías de ejemplares de *C. rionegrensis* mostrando los diferentes pelajes. A-Agutí. B- Dorso-oscuro C- Melánico.

1.2.2- Cariotipo

Estudios de cariotipo (Kiblsky et al., 1977) mostraron que esta especie posee un número cromosómico $2n = 50$, 14 pares son acrocéntricos donde uno de ellos presenta una constricción secundaria; 6 pares poseen centrómero subterminal y cuatro pares de submetacéntricos. El par sexual está compuesto por un cromosoma X submetacéntrico grande y un cromosoma Y acrocéntrico pequeño.

1.2.4- Hipótesis de Trabajo / Antecedentes

En general, las especies del género *Ctenomys* son consideradas estrictamente solitarias, a excepción de *C. sociabilis*. Sin embargo, en *C. rionegrensis*: 1) el hecho de capturar varios ejemplares en una misma boca de cueva (llamado de aquí en más “capturas múltiples”) de juveniles y adultos, 2) las áreas de actividad solapadas entre diferentes individuos de una misma población y 3) la alta tolerancia a la presencia de otros individuos de la misma especie, sugieren que la especie exhibe un patrón de uso del espacio diferente al de los tucu-tucus solitarios o territoriales. Esto sumado a los datos obtenidos en el campo por E. Lessa y colaboradores (1999), usados también en este trabajo, así como análisis de parentesco usando microsatélites (Parada, 2003; Márquez, 2006) donde se reportaron adultos y juveniles con algún grado de parentesco compartiendo cuevas. Esto llevo la atención hacia la estructura social de esta especie planteando la posibilidad de que no sean estrictamente solitarios.

2- OBJETIVOS:

2.1- Objetivo General:

Contribuir al conocimiento de la especie *C. rionegrensis*, en particular su estructura social mediante el análisis de microsatélites en ejemplares obtenidos en capturas múltiples.

2.2- Objetivos Específicos:

- 1- Extracción de ADN de muestras de individuos procedentes de capturas múltiples.
- 2- Optimización de condiciones de amplificación para un conjunto de microsatélites marcados con fluorocromos
- 3- Análisis de un conjunto de microsatélites detectados como polimórficos mediante PCR y electroforesis.
- 4- Determinar los parámetros descriptivos y poblacionales mediante los programas informáticos apropiados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Elección de individuos utilizados

Se analizaron 24 individuos pertenecientes a capturas múltiples de la especie *Ctenomys rionegrensis* de la población La Tabaré (33°21'41'' S, 58°18'57'' W) departamento de Río Negro, Uruguay. Los individuos tomados de la colección del Laboratorio de Evolución y pertenecientes al período de colecta de Octubre y Noviembre de 1999. Los ejemplares seleccionados presentaban números de catálogo entre EV1131 y EV1216 (Tabla I).

Tabla I. Número de catálogo y detalles de fecha y cueva de captura, edad, sexo y pelaje de los ejemplares utilizados,...

Cueva	Individuo	Captura	Edad	Sexo	Pelaje
1	EV 1170	26-Oct	A	♀	Melánico
	EV 1171	26-Oct	J	♀	Melánico
	EV 1188	29-Oct	A	♂	Agutí
	EV 1209	04-Nov	A	♂	Melánico
2	EV 1172	26-Oct	A	♀	Agutí
	EV 1173	26-Oct	J	♀	Agutí
	EV 1175	26-Oct	J	♀	Melánico
	EV 1181	27-Oct	J	♂	Agutí
3	EV 1194	29-Oct	A	♀	Melánico
	EV 1197	29-Oct	J	♀	Agutí
4	EV 1131	10-Oct	A	♂	Agutí
	EV 1148	10-Oct	A	♀	Melánico
5	EV 1151	14-Oct	A	♀	Agutí
	EV 1152	14-Oct	J	♀	Agutí
6	EV 1155	14-Oct	A	♂	Agutí
	EV 1164	14-Oct	J	♀	Agutí
	EV 1165	14-Oct	J	♂	Agutí
7	EV 1183	28-Oct	A	♀	Agutí
	EV 1193	29-Oct	A	♂	Melánico
	EV 1212	04-Nov	J	♂	Agutí
8	EV 1213	05-Nov	A	♂	Melánico
	EV 1214	05-Nov	J	♂	Agutí
	EV 1215	05-Nov	J	♂	Agutí
	EV 1216	05-Nov	J	♂	Agutí

3.2- Trabajo de Laboratorio

3.2.1- Extracción de ADN

Como punto de partida se utilizaron muestras de hígado conservadas en etanol 95% pertenecientes a la colección del Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República. La extracción de ADN total se realizó mediante un protocolo estándar empleando SDS, digestión por proteinasa K y precipitación de proteínas con NaCl y precipitación de ADN con isopropanol (Miller et al., 1988).

3.2.2 – Amplificación de Fragmentos de ADN

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante la técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”, Saiki et al., 1988). A partir de diluciones 1:100 de las extracciones de ADN totales, en agua libre de RNAsas y DNAsas. Se analizaron un total de 11 microsatélites (Recuadro A) (Soc 2, 3, 5, 6, 7, 8 y Hai 3, 4, 9, 11, 12) que fueron utilizados previamente por Eileen Lacey en trabajos publicados en 1999 y 2001 (Tabla II).

Tabla II. Detalle de los primers de microsatélite usados así como también sus repetidos y el fluorocromo correspondiente.

Microsatélite	Repetidos	Fluorocromo
Soc2	CA	Fam
Soc3	CA	Fam
Soc5	CA	Tet
Soc6	CA	Hex
Soc7	CA	Hex
Soc8	CA	Fam
Hai3	CA	Fam
Hai4	CA	Fam
Hai9	CA	Fam
Hai11	CA	Tet
Hai12	ATT	Tet

La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 8µl por reacción, conteniendo 0,08µl de Taq polimerasa (Biotools, 5 U/µl), 0,16µl de cada oligonucleótido (10 µM), 0,16µl de dNTPs (10 mM cada uno), 0,80µl de Buffer 10X y 2,6µl de agua destilada.

Las condiciones de ciclado se optimizaron en un termociclador (PXE0.2, Thermo) a partir de los ciclados obtenidos previamente para otras especies de tuco-tucos: *C. haigi* y *C. sociabilis* (Lacey et al., 1999 y Lacey, 2001)

La verificación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en minigeles de poliacrilamida 5% a 150V durante 30 minutos en solución de TBE 1X. El método de tinción argéntica es una variante del publicado por Sanguinetti et al., 1994. Luego los productos que presentaban banda correspondiente con el tamaño esperado para cada microsatélite y no mostraron bandas secundarias se seleccionaron para su tipificación automática.

3.2.3 Análisis de Fragmentos

Luego de pruebas piloto que lo mostraron necesario, se efectuaron diluciones de los productos de PCR seleccionados para su tipificación automática en relación a la intensidad de la banda visualizada en el gel. La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo. Los resultados fueron analizados con el programa Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Este programa permite separar fragmentos de ADN según el fluorocromo unido covalentemente a uno de los primers así como también calcular el tamaño exacto de cada fragmento.

Recuadro A. Herramientas para el análisis molecular

Marcadores Moleculares

Con el nombre de marcadores moleculares se engloban una serie de técnicas de gran desarrollo en los últimos veinte años que permiten conocer la información genética que portan los organismos. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar la presencia de polimorfismos en la secuencia de ADN entre dos o más individuos, ya sea que estas modifiquen o no su fenotipo.

Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población y que el modo de herencia puede predecirse según las leyes de Mendel. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable.

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isozimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre especies emparentadas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta según: tejido, etapa del desarrollo o medio ambiente donde se exprese. Los avances en la tecnología del ADN recombinante y la amplificación por PCR han permitido el desarrollo de marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades. El número de técnicas descritas es cada vez más numeroso: RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) que consiste en digestión del ADN con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa, RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se amplifica ADN con primers elegidos al azar, los Minisatélites son secuencias de entre 15-35 pares de bases repetidos, los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) es la variación en una sola base de la secuencia de ADN que debe darse en al menos un 1% de la población y los Microsatélites son secuencias que contienen de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tandem.

Las características que debe poseer un marcador para ser considerado ideal deben ser: presentar polimorfismo elevado o variable dentro y entre especies, presentar modo de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), ser insensible a los efectos del ambiente, presentar co-dominancia, ser de rápida identificación y simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo.

Los Microsatélites o STR (Short tandem repeat)- Son regiones hipervariables del genoma constituidas por repeticiones en tandem de unos pocos pares de bases, 1 a 6 nucleótidos (Hancock, 1999) flanqueadas por secuencias de copia única. Los microsatélite más comunes son los di y los trinucleótidos.

La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 ó 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite. Estos marcadores son co-dominantes, genoma-específicos y altamente polimórficos en comparación con otros marcadores moleculares basados en ADN como los RFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPDs (DNA polimórfico amplificado al azar). Por otra parte su implementación en un laboratorio requiere de mayor infraestructura y presupuesto que los RAPDs.

3.3 Análisis de los resultados

Se utilizaron dos paquetes informáticos desarrollados para estudios de parentesco: *Kingroup v2* (Konovalov et al, 2004) y *Cervus 3.0* (Kalinowski et al. 2007).

El software *Cervus* está diseñado para marcadores codominantes. Calcula las frecuencias alélicas, el contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de exclusión de uno de los padres o de ambos (significa la probabilidad de que un adulto elegido al azar sea excluido como parental utilizando solamente genotipos).

Kingroup por otro lado calcula el promedio de relación genética (R) entre individuos o grupo de individuos definidos por variables demográficas. El valor de R entre individuos que comparten ambos parentales (hermanos completos) debe ser como mínimo $R = 0,5$, los medio-hermanos que sólo comparten el 25% de su genoma su R debe ser como mínimo 0,25.

La asignación de paternidad fue dada por exclusión, observando incompatibilidades entre los tamaños de alelos de los posibles padres, madre y crías, para lo cual se estableció el poder de la prueba de parentesco por medio de la probabilidad de exclusión individual y acumulada descrita por Jamieson y Taylor (1997).

RESULTADOS

De 12 microsátélites ensayados, tres fueron descartados para el análisis; Soc1 debido a que no se pudo completar la tipificación de los 24 individuos y Soc5 y Hai11⁽¹⁾ por su carácter monomórfico. Del total de 24 individuos tipificados tan sólo en 3 de ellos no fue posible identificar el genotipo (ver Anexo: Tabla 1)

4.1- Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación fueron diferentes para cada microsátélite. Para Soc1, Soc2, Soc3, Soc5, Soc6, Hai4, Hai9, Hai11 y Hai12 fueron: desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguidos por 34 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, temperatura de asociación (T_a) por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos) terminando con la extensión final a 72°C por 5 minutos (ver tabla III para ver las T_a). Para Hai3 las condiciones óptimas de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguidos por 34 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, asociación a 53°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos) terminando con la extensión final a 72°C por 5 minutos. Para Soc7 y Soc8 las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C seguidos por 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, asociación a 49°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos) y 23 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, asociación a 48°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos) terminando con la extensión final a 72°C por 5 minutos.

¹ El microsátélite Hai11 fue monomórfico a excepción del individuo EV1193 en donde el tamaño de la secuencia fue de 154 (Anexo: Tabla 1).

Tabla III. Temperaturas de asociación (T_a) para los locus que comparten ciclado.

Locus	T_a (°C)
Soc1	64
Soc2	58
Soc3	59
Soc5	62
Soc6	62
Hai4	58
Hai9	62
Hai11	58
Hai12	60

4.2- Frecuencias génicas

El tamaño relativo de los alelos encontrados para cada locus y sus correspondientes frecuencias en la muestra de 24 individuos procedentes de capturas múltiples, se muestran en la tabla IV. El rango de tamaños para todos los loci varió desde 114 hasta 288 pares de bases. El máximo número de alelos encontrados por locus fue 5 y uno de ellos fue monomórfico. Para Soc5 se encontró un único alelo; 2 alelos para Soc8, Hai3 y Hai11; Soc2, Soc6 y Hai12 presentaron 3 alelos; 4 alelos para Soc3, Soc7, Hai9 y para Hai4 existen 5 alelos. Soc5 será descartado para el resto de los análisis debido a su carácter monomórfico.

Tabla IV. Frecuencias génicas para la muestras de 24 individuos para cada alelo de cada locus.

Locus	Alelo	Frecuencia	Heterocigotas	Homocigotas
Soc2	150	0,2292	7	2
	152	0,3958	11	4
	154	0,3750	8	5
Soc3	129	0,0208	1	0
	131	0,2917	14	0
	133	0,0833	4	0
Soc5	135	0,6042	17	6
	261	1,0000	0	24
Soc6	222	0,5217	12	6
	228	0,3913	10	4
	230	0,0870	4	0
Soc7	180	0,0217	1	0
	280	0,1522	3	2
	286	0,6739	11	10
	288	0,1522	7	0
Soc8	154	0,2083	8	1
	156	0,7917	8	15
Hai3	163	0,4792	15	4
	165	0,5208	15	5
Hai4	167	0,2083	10	0
	171	0,1667	6	1
	177	0,1875	7	1
	179	0,0625	3	0
	181	0,3750	12	3
Hai9	228	0,1875	7	1
	232	0,0625	1	1
	234	0,7292	9	13
	238	0,0208	1	0
Hai11	146	0,9583	0	23
	154	0,0417	0	1
Hai12	112	0,0217	1	0
	114	0,0652	3	0
	122	0,9130	4	19

4.3 – Variabilidad genética

En este estudio, el nivel de variabilidad de los loci estudiados de la población se dividen en loci con variabilidad baja ($He < 0,500$) (Soc7, Soc8, Hai9, Hai11 y Hai12) y loci con variabilidad alta ($He > 0,500$) (Soc2, Soc3, Soc6, Hai3 y Hai4). El contenido de información polimórfica (PIC), la heterocigocidad esperada (He) y heterocigocidad observada (Ho) se detallan en la tabla V.

En cuanto a la heterocigocidad esperada (H_e) el promedio fue de 0,419 con el valor superior en el locus Hai4 con 0,765 y el valor más bajo en Hai11 con 0,082. La heterocigocidad observada (H_o) promedio fue de 0,421 con el valor más alto en Hai4 con 0,792 y Hai11 con valor 0.

Considerando que un valor de PIC superior a 0,50 indica que un marcador es muy informativo (Botstein et al., 1980), podemos decir que sólo 2 de los microsatélites (Soc2 y Hai4) son muy informativos a la hora de detectar variabilidad genética, mientras que microsatélites con valor de PIC entre 0,25 y 0,50 son medianamente informativos (Soc3, Soc6, Soc7, Soc8, Hai3 y Hai9). Los valores de PIC de los microsatélites restantes (Hai12) están por debajo de 0,16 resultando poco o nada informativos.

Tabla V. Para cada locus estudiado se detalla el contenido de información polimórfica (PIC), heterocigocidad esperada (H_e), heterocigocidad observada (H_o), probabilidad de exclusión cuando se desconocen ambos parentales (NE-1P), probabilidad de exclusión cuando se conoce un parental (NE-2P)

Locus	H_o	H_e	PIC
Soc2	0,542	0,664	0,575
Soc3	0,750	0,554	0,474
Soc6	0,565	0,580	0,477
Soc7	0,478	0,510	0,455
Soc8	0,333	0,337	0,275
Hai3	0,625	0,510	0,375
Hai4	0,792	0,765	0,710
Hai9	0,375	0,438	0,387
Hai12	0,174	0,165	0,154

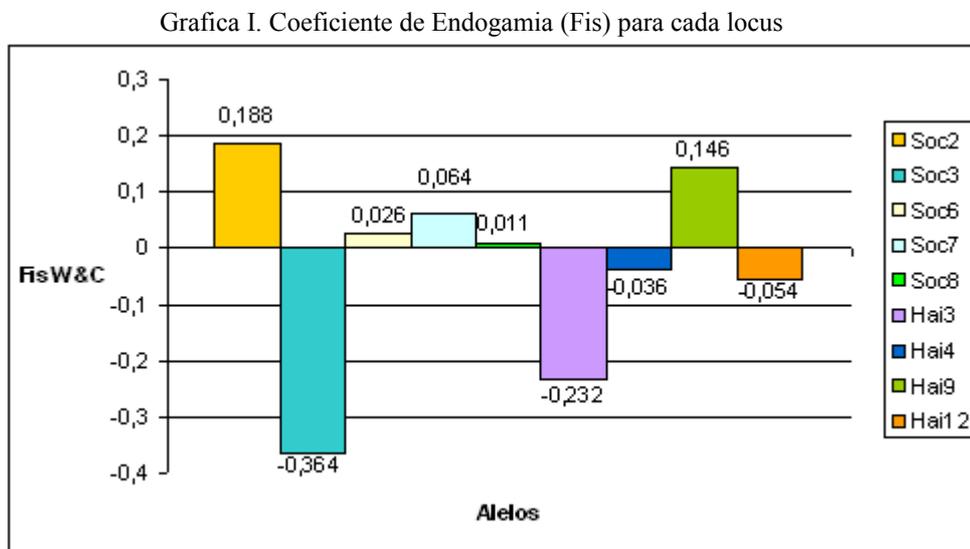
Tabla VI. Para cada locus se detallan: la probabilidad de exclusión cuando se desconocen ambos parentales (NE-2P), probabilidad de exclusión cuando se conoce un parental (NE-1P) y la probabilidad de exclusión acumulada del sistema incluyendo los loci anteriores y ese en cuestión.

Locus	NE-1P	Global	Locus	NE-2P	Global
Hai4	0,656	0,656	Hai4	0,476	0,476
Soc2	0,789	0,927	Soc2	0,644	0,813
Soc6	0,839	0,966	Soc3	0,717	0,899
Soc3	0,849	0,976	Soc6	0,723	0,922
Soc7	0,871	0,981	Soc7	0,723	0,923
Hai3	0,875	0,984	Hai9	0,775	0,938
Hai9	0,906	0,988	Hai3	0,813	0,958
Soc8	0,946	0,995	Soc8	0,862	0,974
Hai12	0,987	0,999	Hai12	0,920	0,989

La probabilidad de exclusión del conjunto de loci se define como la probabilidad de excluir de la paternidad a un individuo no relacionado de la población a través del

estudio de diversos marcadores genéticos (Chakraborty et al., 1988). Fue calculada mediante el software *Cervus* (Kalinowski et al., 2007). Cuando observamos la probabilidad de exclusión individual para cada locus vemos que estos valores se ubican entre el 65% y 98% cuando se desconoce uno de los parentales y entre 47% y 98% cuando se desconocen ambos parentales (ver Tabla VI). Mientras que la probabilidad de exclusión global cuando se conoce un solo parental varió desde 65% para un solo loci y 99% para el conjunto de locus y la probabilidad de exclusión cuando se desconocen ambos parentales varió desde 47% para un solo loci y 98% para el conjunto de locus.

4.4- Coeficiente de endogamia (Fis)



El índice de fijación o coeficiente de endogamia (Fis) representa la desviación de los genotipos del equilibrio Hardy-Weinberg dentro de una población, puede tener valores que van desde -1 (exceso de heterocigotos) hasta 1 (exceso de homocigotos) (Awise, 1994). El valor de Fis para todos los loci fue de -0,251 indicando un exceso de heterocigotos, el valor más alto se obtuvo en el Soc2 (0,188) y el más bajo fue para Soc3 (-0,364).

4.5- Coeficientes de Parentesco.

En las siguientes tablas se detallan los coeficientes de parentesco (R) entre individuos obtenidos de capturas múltiples mediante el software *Kingroup v2* (Konovalov et al., 2004). Este es una medida de la fracción de alelos compartidos idénticos por descendencia (Boulin, 2003). Las expectativas teóricas entre hermanos completos o padre-hijo son de $R \geq 0,5$, y para medio-hermanos, nietos o sobrinos $0,5 > R \geq 0,25$. Los restantes datos (sexo, edad, fecha de captura) se encuentran en el Anexo: Tabla 1. Sólo en las cuevas 2 y 7 se observan $R \geq 0,5$ entre los individuos EV1173 - EV1181 para la cueva 2 y entre EV1183 - EV1212 y EV1183 - EV 1193 para la cueva 7. El dato curioso que surgió de este análisis es que los coeficientes de parentesco entre individuos de diferentes cuevas en general son superiores ($R \geq 0,5$) a los encontrados en individuos de la misma cueva (ver Anexo: Tabla 2)

Tabla VII. Individuos por cuevas. En negrita se muestran los valores superiores a 0,5.

Cueva	Individuo	EV1170	EV1171	EV1188	EV1209
1	EV1170	*			
	EV1171	0.313	*		
	EV1188	-0,001	0,343	*	
	EV1209	-0,178	-0,15	0,172	*
2	Individuo	EV1181	EV1175	EV1173	EV1172
	EV1181	*			
	EV1175	-0,177	*		
	EV1173	0.519	-0.283	*	
	EV1172	0.272	-0.018	0.211	*
3	Individuo	EV1197	EV1194		
	EV1197	*			
	EV1194	0.262	*		
4	Individuo	EV1148	EV1131		
	EV1148	*			
	EV1131	0.098	*		
5	Individuo	EV1152	EV1151		
	EV1152	*			
	EV1151	0.207	*		
6	Individuo	EV1165	EV1164	EV1155	
	EV1165	*			
	EV1164	0.33	*		
	EV1155	-0,055	0.288	*	
7	Individuo	EV1212	EV1193	EV1183	
	EV1212	*			
	EV1193	0,006	*		
	EV1183	0.635	0.571	*	
8	Individuo	EV1216	EV1215	EV1214	EV1213
	EV1216	*			
	EV1215	0.427	*		
	EV1214	0.299	0.03	*	
	EV1213	0.469	0.31	0.415	*

Con el mismo software pueden realizarse pruebas de máxima verosimilitud entre pares de individuos, para evaluar si la diferencia entre los valores de R hallados difieren significativamente de otros valores. Para esto usamos dos relaciones hipotéticas de parentesco, siendo la hipótesis nula que los individuos encontrados en una misma cueva son parientes y la hipótesis alternativa que no lo estuvieran. (Anexo: Tabla 3).

La cueva 1 esta compuesta por cuatro individuos, tres adultos (EV1170, EV1188 y EV1209) y un juvenil (EV1171). Se encontraron dos relaciones de parentesco directas (madre o padre con hijo) adulto-juvenil significativas ambas con R entre 0,25 y 0,5 (tabla VII). Ambas relaciones involucran al juvenil pero con diferentes adultos, un macho y una hembra con valores similares de R (0,313 y 0,343). Estos dos valores no difieren significativamente de $R = 0,5$, mientras que el resto dentro de la cueva sí, confirmando la relaciones de parentesco.

Dentro de la cueva 2 se encontraron cuatro individuos, un adulto hembra (EV1172) y tres juveniles (EV1181, EV1175 Y EV1173). Los juveniles EV1181 y EV1173 poseen el parentesco más alto ($R=0,519$) y podrían ser catalogados como hermanos completos. A su vez ambos tienen parentesco con la hembra adulta ($R = 0,272$ y $R = 0,211$, respectivamente) por lo que su relación con ella sería de tío-sobrino o abuelo-nieto, si bien en uno de los casos el valor no difiere significativamente de $R=0,5$, por lo que estadísticamente no se podría descartar a esta hembra como madre de uno de ellos.

En la cueva 3 encontramos dos individuos, un juvenil (EV1197) y un adulto hembra (EV1194) con una relación de parentesco $R = 0,262$. Su relación podría ser tío-sobrino o abuelo-nieto, pero este valor de R no difiere significativamente de $R=0,5$, por lo que estadísticamente no se podría descartar una relación más directa entre ellos.

Para las cuevas 4, 5 y 6 no se encontraron relaciones de parentesco significativas, los R se ubicaron entre 0.098 y 0,33.

Dentro de la cueva 7 se encontraron tres individuos, un juvenil (EV1212) y dos adultos (EV1193 y EV1183). Según los coeficientes de parentesco, los dos adultos (un macho y una hembra) podrían ser hermanos completos ($R = 0,571$) mientras que la hembra adulta también podría ser la madre del juvenil ($R = 0,635$).

Por último la cueva 8 está compuesta por cuatro individuos, tres juveniles (EV1216, EV1215 y EV1214) y un adulto hembra (EV1213). Entre los juveniles y el adulto hembra los R estaban entre 0,31 y 0,46 pudiendo tener una relación tío-sobrino entre ellos. Por otra parte dos de los juveniles (EV1216 y EV1215) poseen alto parentesco entre ellos (0,427). Los juveniles EV1216 y EV1214 tienen un parentesco de $R = 0,299$ por lo que su relación podría ser de medio-hermanos o primos.

También se encontraron relaciones de parentesco que no difieren significativamente de $R = 0,5$ entre individuos encontrados en diferentes cuevas (ver Anexo: Tabla 3). Algunas de estas cuevas se encuentran a una distancia mayor de la que regularmente se mueve esta especie. Existen algunos casos curiosos por ejemplo EV1197 (perteneciente a la cueva 3) que posee relaciones de parentesco significativas con tres individuos de la cueva 2 (EV1181, EV1175 y EV1173). Otro caso sería el de EV1164 quien también posee relaciones de parentesco significativas con tres individuos de la cueva 2 (EV1181, EV1173 y EV1172).

4.6- Observación de Genotipos.

La asignación de parentales también puede realizarse observando directamente los genotipos, en este caso el juvenil debe poseer en cada locus, un alelo que concuerde con uno de los alelos del mismo locus de cada uno de sus padres.

Para la cueva 2 (ver Anexo: Tabla 1) donde sólo se encontró un adulto y varios juveniles se asumió que el adulto es uno de los parentales y así determinar los posibles genotipos del parental ausente (Tabla VIII). Esto también se hizo en las cuevas 3 y 5 aunque sólo contaran con un adulto y un juvenil. En las cuevas 6 y 8 se presenta el mismo caso (1 adulto y 2 ó 3 juveniles) pero al observar el locus Soc6 y Hai9 para la cueva 6 determinamos que el macho adulto (EV1155) no puede ser el padre de ninguno de los juveniles (EV1165 y EV1164) debido a que el adulto es homocigota para ambos locus (alelos 222 para Soc6 y 228 para Hai9) pero los juveniles presentan otros alelos en esos locus. Lo mismo ocurre para la cueva 8 en el locus Hai3 donde se descarta que el adulto sea el parental de dos de los juveniles (Tabla VIII). Para la cueva 5, el adulto difiere del juvenil en un locus (Hai4) por lo que se los descarta como parientes.

Tabla VIII. Se muestran los genotipos posibles del parental ausente para las cuevas 2 y 3. Para las cuevas 5, 6 y 8 en negrita se muestran los alelos que excluyen al adulto encontrado en la cueva como parental de todos o de alguno de los juveniles.

Cueva	Individuo	Sexo	Edad	Soc2	Soc3	Soc6	soc7	Soc8	Hai3	Hai4	Hai9	Hai12
2	EV1181	♂	J	150-154	131-135	222-222	286-288	156-156	165-165	167-181	228-234	-
	EV1175	♀	J	152-154	131-135	222-228	286-288	154-156	163-165	171-181	234-234	122-122
	EV1173	♀	J	150-152	133-135	222-222	286-288	156-156	163-165	167-181	228-234	122-122
	EV1172	♀	A	152-154	131-135	222-228	286-286	156-156	163-165	167-181	228-234	122-122
	Posible genotipo parental	♂		150-152 150-154	133-135 131-133	222-222 228-228 222-228	288-288 286-288	154-156	165-165 163-165	171-181 167-171	234-234 228-234	122-122
3	EV1197	♀	J	150-152	131-135	222-228	286-288	156-156	165-165	171-181	228-234	122-122
	EV1194	♀	A	150-150	131-135	228-228	286-288	154-156	163-165	171-177	228-234	122-122
	Posible genotipo parental	♂		150-150 150-152	131-131 135-135	222-222 222-228	286-286 288-288	156-156 154-156	165-165 163-165	171-181 181-181	234-234 228-228 228-234	122-122
					131-135		286-288					
5	EV1152	♀	J	154-154	133-135	222-228	280-286	156-156	163-165	171-171	234-234	114-122
	EV1151	♀	A	154-154	131-135	222-222	286-286	156-156	165-165	177-181	234-234	122-122
6	EV1165	♂	J	154-154	131-135	228-228	286-286	156-156	163-165	167-181	234-234	122-122
	EV1164	♀	J	152-154	135-135	222-222	286-286	156-156	163-165	167-181	234-234	122-122
	EV1155	♂	A	154-154	135-135	222-222	280-286	156-156	163-165	167-181	228-228	114-122
8	EV1216	♂	J	152-152	131-135	222-228	280-280	154-156	163-163	181-181	234-234	122-122
	EV1215	♂	J	152-154	133-135	228-230	280-280	154-156	163-163	167-181	228-234	112-122
	EV1214	♀	J	154-154	131-135	222-230	280-286	154-156	161-165	181-181	234-234	122-122
	EV1213	♀	A	152-154	133-135	222-230	-	154-156	161-165	177-181	234-234	122-122

Para las cuevas 1 y 7 donde se encontró más de un parental en cada una de ellas se procedió a excluir al adulto macho asumiendo que el adulto hembra era la madre de los juveniles (Tabla IX). En el caso de la cueva 1, ambos machos (EV1188 y EV1209) son descartados como padres siempre que asumamos que la hembra presente en la cueva es la madre del juvenil. Pero si hiciéramos el análisis inverso asumiendo que el padre es el conocido a la que excluiríamos sería a la hembra.

En el caso de la cueva 7, observamos que tres loci (Soc8, Hai4 y Hai9) excluyen de la paternidad al macho adulto (EV1193).

Tabla IX. Para las cuevas 1 y 7 se muestran en negrita los alelos que excluyen al adulto macho encontrado en la cueva como parental del juvenil.

Cueva	Individuo	Sexo	Edad	Soc2	Soc3	Soc6	soc7	Soc8	Hai3	Hai4	Hai9	Hai12
1	EV1170	♀	A	152-152	131-135	222-228	286-286	-	163-163	167-177	234-234	122-122
	EV1171	♀	J	150-152	131-135	222-228	286-288	156-156	163-165	167-179	234-234	114-122
	EV1188	♂	A	150-152	135-135	222-222	286-288	156-156	165-165	171-179	234-234	122-122
	EV1209	♂	A	150-150	131-135	222-230	286-286	156-154	165-165	167-177	228-234	122-122
7	EV1212	♂	J	152-152	135-135	228-228	286-286	154-156	163-165	181-181	234-238	122-122
	EV1193	♂	A	150-152	135-135	222-228	280-286	156-156	163-165	177-177	232-232	122-122
	EV1183	♀	A	152-152	135-135	-	286-286	156-156	163-165	177-181	232-234	122-122

La cueva 4 es en la única de las estudiadas que no se encontraron juveniles, igualmente se quiso determinar si los dos adultos encontrados en la misma estaban relacionados. Para esto se compararon los alelos de los distintos loci, y se encontró que no compartían alelos en el locus Soc8 donde EV1148 es homocigoto para el alelo 156 y EV1131 también es homocigoto pero para el alelo 154 (Tabla X).

Tabla X. Genotipos de los individuos encontrados en la cueva 7. En negrita se muestran los alelos que no comparten.

Individuo	Sexo	Edad	Soc2	Soc3	Soc6	soc7	Soc8	Hai3	Hai4	Hai9	Hai12
EV1148	♀	A	150-154	129-131	222-228	286-286	156-156	163-165	171-177	234-234	122-122
EV1131	♂	A	152-154	131-135	228-228	286-286	154-154	163-165	171-179	234-234	122-122

DISCUSIÓN

La disponibilidad de información sobre microsatélites en el genero *Ctenomys*, por ejemplo los estudios realizados por E. Lacey en *C. haigi* y *C. sociabilis* donde utilizaron los mismos microsatélites para detectar dinámica poblacional, propiedades moleculares y variación interespecífica en poblaciones de estas especies. Los microsatélites que resultaron polimórficos en estos trabajos (Soc5, Soc6, Soc7, Hai4 y Ha11 para *C. sociabilis* y todos para *C. haigi*) en algunos casos no concuerdan con los encontrados polimórficos en el presente trabajo. Para la realización de este trabajo se seleccionaron 12 microsatélites específicos y polimórficos para esta especie. Se encontró que 9 de los 12 microsatélites resultaron polimórficos para *Ctenomys rionegrensis*, con número de alelos desde 5 para Hai4 y 2 para Soc8 y Hai3. Dentro de los loci polimórficos se detectaron 33 alelos diferentes en los 24 individuos analizados procedentes de capturas múltiples. Esto corresponde a un promedio de 3 alelos por locus.

5.1- Diversidad genética

La asignación correcta de los parentales depende del nivel de variación genética de los loci estudiados en la población de estudio, lo que determina la probabilidad de exclusión (que un adulto escogido al azar sea excluido como parental de un descendiente). La probabilidad de exclusión aumenta con el número de loci utilizados, el número de alelos por locus y la distribución de las frecuencias alélicas de los loci (Chakraborty, Meagher y Smous, 1988). Esto puede verse comparando las pasantías anteriores realizadas en el laboratorio (Parada, 2003 y Márquez, 2005) donde genotiparon sólo 5 microsatélites en 42 individuos algunos de los cuales no procedía de capturas múltiples. La probabilidad de exclusión promedio acumulada para todos los loci en estos trabajos fue de 0,84 mientras que en el estudio en curso (usando 9 microsatélites) fue de 0,99.

Los valores de variabilidad planteados como necesarios para los estudios de parentesco son $H_e > 0,700$ (Blouin et al., 1996). La media de la heterocigocidad esperada para este trabajo es de 0,418, indicando un bajo nivel de diversidad genética.

5.2- Relaciones de Parentesco entre individuos capturados en la misma cueva.

En la cueva 1 se encontraron dos relaciones de parentesco directas (madre o padre con hijo) significativas con R entre 0,25 y 0,5 (tabla VII). Ambas relaciones involucran al juvenil pero con diferentes adultos, un macho y una hembra con valores similares de R (0,313 y 0,343). Estos dos valores no difieren significativamente de $R = 0,5$, mientras que el resto dentro de la cueva sí, confirmando la ausencia de relaciones de parentesco entre el resto de los individuos. Revisando los genotipos (tabla IX) vemos que por separado ambos adultos podrían ser los padres del juvenil, pero si nos detenemos en las fechas de capturas la hembra adulta y el juvenil fueron capturados el mismo día (26/11/1999) y el macho adulto tres días después (29/11/1999). Así aunque no se podría descartar al macho adulto como parental, la diferencia en el día de captura hace que sea posible que este haya invadido la cueva luego de la remoción de la hembra adulta, y es posible que no estuvieran compartiendo la misma.

Dentro de la cueva 2, a pesar de que las comparaciones de genotipos muestran que la hembra adulta podría ser la madre de los tres juveniles los coeficientes R muestran que tan sólo tiene relación de parentesco directa con dos de ellos. Los juveniles EV1181 y EV1173 poseen el parentesco más alto ($R=0,519$) y podrían ser catalogados como hermanos completos a pesar de que difieren en un día su fecha de captura. A su vez ambos tienen parentesco con la hembra adulta ($R = 0,272$ y $R = 0,211$, respectivamente) por lo que su relación con ella sería de tío-sobrino o abuelo-nieto, si bien en uno de los casos el valor no difiere significativamente de $R=0,5$, por lo que estadísticamente no se podría descartar a esta hembra como madre de uno de ellos.

En la cueva 3 encontramos dos individuos, un juvenil y un adulto hembra con una relación de parentesco $R = 0,262$ capturados el mismo día (29/10/1999). Además, comparten alelos en todos los loci estudiados. Según el coeficiente de relacionamiento R , su relación podría ser tío-sobrino o abuelo-nieto, pero este valor de R no difiere significativamente de $R=0,5$, por lo que estadísticamente no se podría descartar una relación más directa entre ellos (madre-hijo).

Dentro de la cueva 4 encontramos dos individuos adultos capturados el mismo día (10/10/1999) sin relación de parentesco aparente entre ellos. Igualmente si examinamos los genotipos no comparten alelos para Soc8.

La cueva 5 esta compuesta por dos individuos, un juvenil y un adulto hembra. Su coeficiente de parentesco es bajo ($R = 0,207$) distinto significativamente de 0,5, y difieren en los alelos para Hai4, por lo que se descarta una relación de parentesco directa, madre-hijo.

En la cueva 6 encontramos tres individuos, dos juveniles y un adulto hembra capturados el mismo día (14/10/1999). Los coeficientes de parentesco son bajos para todos los individuos indicando que no tendrían parentesco entre ellos. A su vez, no comparten alelos en todos los loci: la hembra adulta (EV1155) difiere en los alelos para Hai9 con el juvenil EV1164 y con los alelos para Hai9 y Soc6 con el juvenil EV1165.

Dentro de la cueva 7 se encontraron tres individuos, un juvenil y dos adultos. Capturados en diferentes días, el juvenil el 14/11/1999 y los adultos uno el 29/10/1999 y el otro el 28/10/1999. Según los coeficientes de parentesco, los dos adultos (un macho y una hembra) podrían ser hermanos completos ($R = 0,571$) mientras que la hembra adulta también podría ser la madre del juvenil ($R = 0,635$). Esto también está apoyado por los genotipos donde la hembra adulta comparte alelos en todos los locus con el juvenil y con el macho adulto, pero estos entre sí difieren en alelos para tres locus (Soc8, Hai4 y Hai9).

Por último, la cueva 8 está compuesta por cuatro individuos, tres juveniles y un adulto hembra todos capturados el mismo día (5/11/1999). Entre los juveniles y el adulto hembra los R estaban entre 0,31 y 0,46 pudiendo tener una relación tío-sobrino entre ellos. Por otra parte dos de los juveniles (EV1216 y EV1215) poseen parentesco alto y no significativamente diferente de 0,5 entre ellos (0,427), además de que comparten alelos para todos los locus, su relación podría ser de hermanos completos. Los juveniles EV1216 y EV1214 tienen un parentesco de $R = 0,299$ y difieren en los alelos del loci Hai3 por lo que su relación podría ser de medio-hermanos o primos.

Como se deduce del análisis anterior, por las características de los marcadores estudiados y del sistema de estudio, los coeficientes de relacionamiento sólo muestran la complejidad del sistema y no permiten sacar mayores conclusiones. Sin embargo, el

estudio de exclusión caso a caso parece ser más productivo, y permitiría descartar la hipótesis de que individuos provenientes de capturas múltiples están, en todos los casos, directamente relacionados.

5.3- Relaciones de parentesco entre individuos capturados en diferentes cuevas.

En algunos casos se observó que los coeficientes de parentesco (Anexo: Tabla 2) no difieren significativamente de $R = 0,5$ y son superiores a los encontrados entre individuos de la misma cueva. Cabe resaltar que algunas de estas cuevas se encuentran a una distancia superior entre ellas de la que regularmente se desplaza esta especie, teniendo en cuenta que el terreno ocupado por esta especie en el departamento de Río Negro es uniforme.

Dentro de las relaciones intercuevas hay algunas que llaman la atención. El primer caso involucra a las cuevas 1 y 2 distanciadas entre sí por 6 m. Entre ellas existen cuatro relaciones, en general de un juvenil con un adulto capturados en días consecutivos con R que no difieren significativamente de 0,5, Esto podría significar que los individuos adultos estaban fuera de su cueva y al percibir disturbios en el ambiente (los investigadores) se adentraron en la cueva más cercana. Otra explicación podría ser que ambas bocas pertenecieran a una misma cueva.

Además, tenemos el caso de la cueva 8, donde un solo individuo hembra adulto (EV1214) tiene relación de parentesco significativa entre cuevas la tiene con un juvenil de la cueva 5 (EV1151). Ubicadas a 59 m una de la otra, dista por lejos de la distancia relativa que recorren los individuos de esta especie pero cuando observamos las fechas de captura vemos que hay 21 días de diferencia entre las capturas (14/10/1999 y 5/11/1999) en los cuales si pudo desplazarse dicha distancia. En trabajos anteriores (Tassino, 2006) observaron que esta especie de tucu-tucu parece exhibir un rango de desplazamiento mayor, 114 ± 63 m para los machos y 51 ± 76 m en las hembras observados durante un periodo de 6 meses, que el reportado para otras especies (Busch et al, 1989). En el mismo trabajo se plantea la hipótesis de la existencia de corredores dentro del sistema de cuevas por donde los individuos se desplazan grandes distancias

debido a que en 600 horas continuas de observación no encontraron ningún individuo que se aleje mas de 0,5 m de la boca de cueva.

5.4- Conclusiones generales

A pesar de haber usado un número aceptable de microsátélites, esto no alcanzó el nivel de resolución necesario para establecer relaciones de parentesco entre los individuos. A pesar de que la PE general del sistema es alta, posiblemente la situación mejoraría con el uso de microsátélites más polimórficos, en particular con mayores valores de PIC. El presente trabajo fue realizado con un numero bajo de ejemplares (24 individuos) y el no haber incluido en el análisis a los individuos encontrados alrededor de las cuevas de captura múltiple pudo haber dejado a los progenitores reales de los juveniles encontrados en las cuevas fuera de los analizados.

La ocupación grupal de las cuevas podría deberse a la reocupación rápida de las cuevas luego de la remoción de su habitante aunque no puede descartarse la hipótesis de que individuos no emparentados compartan la cueva en simultáneo ya que se visualizaron altos niveles de tolerancia a otros individuos para esta especie, incluso en época reproductiva (Altesor 2006, Obs. Pers). Aunque tampoco puede descartarse una hipótesis donde los individuos de la especie presenten una movilidad alta haciéndolos capaces de compartir cuevas durante ciertos períodos.

Si bien los resultados son preliminares, podrían indicar que los individuos pertenecientes a la especie *C. rionegrensis* no son estrictamente solitarios como se creía hasta el momento. Esto también fue puesto en evidencia en trabajos anteriormente citados (Parada 2003, Márquez 2006 y Tassino 2006), los cuales también proveen evidencia del comportamiento social o semi-social de esta especie.

BIBLIOGRAFIA

- Altuna, C.A. 1991. Microclima de cuevas y comportamiento de homeostasis en *Ctenomys pearsoni* del Uruguay (Rodentia, Octodontidae). Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay, 6: 35-46.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32:314-331.
- Boulin, M.S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kingship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution. 18: 503-511.
- Cabrera, A. 1961. Catalogo de los mamíferos de América del Sur. Revista Museo Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Ciencias Zoológicas, 4:309-732.
- Castillo, A.H., M.N. Cortinas, E.P. Lessa. 2005. Rapid diversification of south american tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. Journal of Mammalogy, 86(1): 171-179
- Contreras, J.R., C.J. Bidau. 1999. Líneas generales del panorama evolutivo de los roedores excavadores sudamericanos del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha: Ctenomyidae). Ciencia Siglo XXI, Buenos Aires, 1:1-23.
- Chakraborty, R., T. Meagher y P. E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. Genetics, 118: 527-536.
- D'Elía G., E.P. Lessa, y J.A. Cook. 1998. Geographic structure, gene flow and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). Zeitschrift für Säugetierkunde, 63: 285-296.
- D'Elía, G., E.P. Lessa, J.A. Cook. 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): Evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. J. Mammal. Evol, 6: 19-38.
- Giménez, M.D., C.J. Bidau, F. Argüelles & J.R. Contreras. 1999. Chromosomal characterization and relationship between two new species of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from northern Córdoba province, Argentina. Zeitschrift für Säugetierkunde, 64: 91-106.

- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. Pp: 1-9. En: Microsatellites Evolution and Applications. DB Goldstein & Schlötterer Eds. Oxford University Press, New York.
- Kalinowski, S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006.
- Kiblicky, P., N. Brum-Zorrilla, G. Perez & F.A. Saez. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana* 2(2): 85-93.
- Konovalov D.A., C. Manning and M.T. Henshaw. 2004. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes*. 4: 779-782.
- Lacey, E.A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86: 628-637.
- Lacey, E.A., J.E. Maldonado, J.P. Clabaugh & M.D. Matocq. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8: 1753-1768.
- Lacey, E.A., J.L. Patton & G.N. Cameron. 2000. Life underground: The biology of subterranean rodents. University of Chicago Press, Chicago.
- Langguth, A. & A. Abella. 1970. Las especies uruguayas del genero *Ctenomys*. *Com. Zool. Mus. Hist. Nat. Montevideo* 10: 1-27.
- Lessa, E.P. 1990. Multidimensional-analysis of geographic genetic-structure. *Systematics Zoology*, 39: 242-252.
- Lessa, E.P. & J.A. Cook. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia:Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 88-99.
- Marquez, A. 2005. Estudio de la Variabilidad genética y las relaciones de parentesco, en una población de tucu-tucu *Ctenomys rionegrensis*. Tesis de pasantía. Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica
- Mayr E. 1963. Population, Species and Evolution. Harvard University Press.
- Miller S.A., D.D Dikes & H.F Polesky. 1988. A Simple Salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nuclei Acids Research* 16: 215.
- Nevo, E. 1999. Mosaic Evolution of Subterranean mammals: Regression, Progression and Global convergence. Oxford University Press, Oxford.
- Parada, A. 2003. Análisis de parentesco dentro de una población de *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae) polimórfica en el color del pelaje,

empleando microsatélites. Tesis de pasantía. Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica

- Parada, A. 2007. Sistemática molecular de *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae): límites y grupos de especies abordados con un muestreo taxonómico y geográfico denso. Tesis de Maestría. Sección Evolución y Sistemática. Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica Oriental del Uruguay.
- Reig, O.A., C. Busch, M.O. Ortells & J.R. Contreras. 1990. An Overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pp71-96. En: Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular levels (Nevo, E. and O.A. Reig, eds). Alan R. Liss, Inc.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Millis & H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sanguinetti C.J., E.D. Neto, A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.
- Slamovits C.H., J.A. Cook, E.P. Lessa and M.S. Rossi. 2001. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia : Octodontidae): a phylogenetic approach. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1708–1719.
- Tassino, B. 2006. Estructura poblacional y biología reproductiva del tucu-tucu de Río Negro (*Ctenomys rionegrensis*): relaciones entre el comportamiento y los procesos evolutivos. Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica Oriental del Uruguay.
- Verzi, D.H. 2002. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología Neotropical*, 9: 309-328.
- Wlasiuk, G., J.C. Garza & E.P. Lessa. 2003. Genetic and Geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57(4): 913-926.

ANEXO: Tabla 1

Se detallan número de catalogo de los individuo, sexo, fecha de captura, edad y los genotipos para los 12 loci de microsatélites.

Individuo	Sexo	Fecha captura	Edad	Soc1	Soc2	Soc3	Soc5	Soc6	soc7	Soc8	Hai3	Hai4	Hai9	Hai1	Hai2
EM1170	♀	26/10/1999	A	276-276	152-152	131-135	261-261	222-228	286-286	156-156	163-163	167-177	234-234	146-146	122-122
EM1171	♀	26/10/1999	J	276-276	150-152	131-135	261-261	222-228	286-288	156-156	163-165	167-179	234-234	146-146	114-122
EM1188	♂	29/10/1999	A	272-276	150-152	135-135	261-261	222-222	286-288	156-156	165-165	171-179	234-234	146-146	122-122
EM1209	♂	04/11/1999	A	276-276	150-150	131-135	261-261	222-230	286-286	156-154	165-165	167-177	228-234	146-146	122-122
EM1181	♂	27/10/1999	J	-	150-154	131-135	261-261	222-222	286-288	156-156	165-165	167-181	228-234	146-146	-
EM1175	♀	26/10/1999	J	-	152-154	131-135	261-261	222-228	286-288	154-156	163-165	171-181	234-234	146-146	122-122
EM1173	♀	26/10/1999	J	-	150-152	133-135	261-261	222-222	286-288	156-156	163-165	167-181	228-234	146-146	122-122
EM1172	♀	26/10/1999	A	276-276	152-154	131-135	261-261	222-228	286-286	156-156	163-165	167-181	228-234	146-146	122-122
EM1197	♀	29/10/1999	J	272-276	150-152	131-135	261-261	222-228	286-288	156-156	165-165	171-181	228-234	146-146	122-122
EM1194	♀	29/10/1999	A	276-276	150-150	131-135	261-261	228-228	286-288	154-156	163-165	171-177	228-234	146-146	122-122
EM1148	♀	10/10/1999	A	-	150-154	129-131	261-261	222-228	286-286	156-156	163-165	171-177	234-234	146-146	122-122
EM1131	♂	10/10/1999	A	-	152-154	131-135	261-261	228-228	286-286	154-154	163-165	171-179	234-234	146-146	122-122
EM1152	♀	14/10/1999	J	-	154-154	133-135	261-261	222-228	280-286	156-156	163-165	171-171	234-234	146-146	114-122
EM1151	♀	14/10/1999	A	-	154-154	131-135	261-261	222-222	286-286	156-156	165-165	177-181	234-234	146-146	122-122
EM1165	♂	14/10/1999	J	-	154-154	131-135	261-261	228-228	286-286	156-156	163-165	167-181	234-234	146-146	122-122
EM1164	♀	14/10/1999	J	-	152-154	135-135	261-261	222-222	286-286	156-156	163-165	167-181	234-234	146-146	122-122
EM1155	♂	14/10/1999	A	-	154-154	135-135	261-261	222-222	280-286	156-156	163-165	167-181	228-288	146-146	114-122
EM1212	♂	04/11/1999	J	272-276	152-152	135-135	261-261	228-228	286-286	154-156	163-165	181-181	234-238	146-146	122-122
EM1193	♂	29/10/1999	A	-	150-152	135-135	261-261	222-228	280-286	156-156	163-165	177-177	232-232	154-154	122-122
EM1183	♀	28/10/1999	A	272-276	152-152	135-135	261-261	-	286-286	156-156	163-165	177-181	232-234	146-146	122-122
EM1216	♂	05/11/1999	J	272-274	152-152	131-135	261-261	222-228	280-280	154-156	163-163	181-181	234-234	146-146	122-122
EM1215	♂	05/11/1999	J	-	152-154	133-135	261-261	228-230	280-280	154-156	163-163	167-181	228-234	146-146	112-122
EM1214	♀	05/11/1999	J	-	154-154	131-135	261-261	222-230	280-286	154-156	161-165	181-181	234-234	146-146	122-122
EM1213	♀	05/11/1999	A	-	152-154	133-135	261-261	222-230	-	154-156	161-165	177-181	234-234	146-146	122-122

ANEXO: Tabla 2

Coefficientes de parentesco (R). En gris claro los $R \geq 0,5$ entre individuos encontrados en la misma cueva. En gris oscuro los $R \geq 0,5$ entre individuos provenientes de diferentes cuevas.

	1170	1171	1188	1209	1181	1175	1173	1172	1197	1194	1148	1131	1152	1151	1165	1164	1155	1212	1193	1183	1216	1215	1214	1213	
1170																									
1171																									
1188																									
1209																									
1181																									
1175																									
1173																									
1172																									
1197																									
1194																									
1148																									
1131																									
1152																									
1151																									
1166																									
1164																									
1155																									
1212																									
1193																									
1183																									
1216																									
1215																									
1214																									
1213																									

ANEXO: Tabla 3

En gris se presentan las relaciones de parentesco entre individuos que no difieren significativamente de $R > 0,5$.

FLAG	1170	1171	1188	1209	1181	1175	1173	1172	1197	1194	1148	1131	1152	1151	1165	1164	1155	1212	1193	1183	1216	1215	1214	1213		
1170																										
1171	NS																									
1188	***	NS																								
1209	***	***	***																							
1181	***	NS	***	NS																						
1175	***	***	NS	***	**																					
1173	**	*	***	*	NS	***																				
1172	NS	**	***	NS	**	*																				
1197	***	***	NS	***	NS	NS	*																			
1194	***	***	***	***	***	***	***	NS																		
1148	***	***	***	*	***	***	***	*	NS																	
1131	***	***	***	***	NS	***	***	***	***	***																
1152	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***															
1151	***	***	***	***	*	***	NS	***	***	NS	***	***														
1165	***	***	***	***	*	***	NS	***	***	***	***	***	***													
1164	NS	**	***	***	*	NS	NS	**	***	***	***	***	NS	***												
1155	***	***	***	***	NS	***	NS	***	***	***	***	***	***	***	***											
1212	***	***	***	***	NS	***	*	**	***	***	***	***	***	***	***											
1193	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***										
1183	NS	***	***	***	**	**	*	**	***	***	***	***	***	***	NS	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
1216	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
1215	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
1214	***	***	***	***	*	***	**	***	***	***	***	***	NS	***	*	***	***	***	***	***	***	***	NS	***	***	***
1213	*	***	***	***	**	*	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	*	NS	NS	NS	NS	***	***