

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Subárea Ecología y Evolución

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

PEDECIBA

**Avances en el estudio de los tucu-tucus
(*Ctenomys* –*Ctenomyidae*) en Uruguay:
filogeografía y transcriptómica**

Lic. Nicolás Boullosa

Directores: Dra. Ivanna Tomasco, Dr. Matías Feijoo

Mayo, 2019.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
agradecimientos	5
Resumen	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	
El género <i>Ctenomys</i>	7
<i>Ctenomys</i> en Uruguay	9
Organización de la tesis	12
CAPÍTULO 1	13
Título y resumen	14
Introducción	15
Objetivo	16
Materiales y Métodos	17
Muestras y sitios de muestreo	17
Generación y análisis de secuencias	17
Análisis Morfométrico	21
Resultados	26
Discusión	39
Conclusiones	42
Perspectivas	43

Bibliografía	44
CAPÍTULO 2	51
Título y resumen	52
Introducción	53
Materiales y Métodos	57
Elección de las muestras	57
Laboratorio.....	58
Análisis.....	58
Resultados	61
Discusión	63
Bibliografía	66

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a quienes me acompañaron en la realización de esta tesis, entre ellos:

A Ivanna Tomasco por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto y por permitir que me involucrara al punto de sentirlo como propio, y por apostar en todo momento a mi desarrollo personal y profesional

A Matías Feijoo por la dedicación y el compromiso asumido en todas las etapas de este proceso, por acompañar en este trabajo desde su inicio.

A Alejandro D'Anatro por su colaboración en el estudio de morfometría geométrica.

A Facundo Giorello por su colaboración en el análisis general de los transcriptomas.

A Enrique Lessa por el apoyo y los consejos y por estar siempre dispuesto a escuchar y discutir.

Así mismo agradezco a los miembros del tribunal; Mariana Cosse, Andres Iriarte y Marcelo Loureiro por aceptar ser parte del mismo y por los valiosos aportes en la evaluación de esta tesis, así como a PEDECIBA, CSIC y ANII por la financiación de este trabajo y de otras actividades relacionadas con mi formación.

RESUMEN

Los tucu-tucos (género *Ctenomys*) son roedores subterráneos endémicos de América del Sur. *Ctenomys pearsoni* y *Ctenomys torquatus* son dos de las tres especies de tucu-tucos presentes en Uruguay. Hasta ahora, la distribución considerada para la especie *C. pearsoni* en Uruguay está restringida a la costa Rioplatense y Atlántica, mientras que se asume que *C. torquatus* se distribuye en todo el resto del país. En este trabajo se muestrearon ejemplares de 11 nuevas localidades de tucu-tucos distribuidas en diferentes puntos del país, y se analizó la diversidad genética y morfológica entre los individuos colectados. Mediante la secuenciación de aproximadamente 400pb del D-Loop del ADN mitocondrial, se encontraron 9 haplotipos nuevos para *C. pearsoni* y 5 para *C. torquatus*. Las poblaciones al norte del Río Negro, Cerro Largo y Treinta y Tres pertenecieron a *C. torquatus*, mientras que las poblaciones ubicadas en los departamentos de Colonia, Durazno, Florida y Lavalleja pertenecieron a *C. pearsoni*. Existen 3 agrupaciones en *C. pearsoni* (centro-oeste, centro sur y este), aunque no monofiléticas para un marcador mitocondrial (D-Loop). Estas, se corresponden también con los grupos establecidos por morfometría geométrica de los cráneos. También se armaron de novo 8 transcriptomas y se aplicó el estadístico D de Patterson para poner a prueba la hipótesis de hibridación entre estas dos especies. De los 3.93×10^6 reads obtenidos en promedio para cada transcriptoma, se ensamblaron 91317 contigs en promedio y se anotó un promedio de 11416 genes por transcriptoma, de los cuales 1524 estuvieron presente en todas las muestras de *Ctenomys*. La filogenia obtenida muestra que las poblaciones de minas tienen mayor afinidad con *C. pearsoni* que con *C. torquatus*. Los valores del estadístico D en promedio entre todas las combinaciones probadas fueron de 0,07, lo cual rechaza la hipótesis de introgresión. Solamente un 10% de los marcadores fueron incongruentes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Ctenomys*

El género *Ctenomys* está formado por roedores subterráneos vulgarmente conocidos como tucu-tucus, se distribuyen desde el centro de Perú y el sureste de Brasil hasta el extremo sur de Argentina. Ocupan una gran variedad de hábitats que van desde las dunas del Atlántico hasta los valles andinos, a unos 5.000 m sobre el nivel del mar (Bidau 2015). La diversidad actual incluye 70 especies nominales (Reig et al. 1990, Bidau 2015) que diversificaron en los últimos 3,5 millones de años (Verzi 2002, Verzi et al. 2013) en una “cladogénesis explosiva”, posiblemente mediada por cambios cromosómicos (e.g.: Reig et al 1990, ver también Tomasco y Lessa 2007). Este género ha sido considerado uno de los linajes de mamíferos de especiación más rápida (Cook et al. 2000) y es uno de los géneros con mayor número de especies de la radiación de los mamíferos (Reig et al. 1990, Parada et al. 2011, Bidau 2015). Esto se debe en parte a que una radiación reciente afectó la evolución del género (Lessa y Cook, 1998) hace no más de 3 millones de años durante el Plioceno tardío (Verzi 2002, Verzi et al. 2013) y por aspectos de su historia de vida como presentar una distribución en parches aislados y de baja densidad y ser organismos de baja vagilidad (Nevo 1979, Lacey et al. 1997).

El género presenta extremada variación cariotípica tanto intra como interespecífica (Ortells 1995), con número diploide que varía desde $2n = 10$ en *C. steinbachi* a $2n = 70$ en *C. dorbignyi* y *C. pearsoni* (Reig et al. 1992), exhibiendo uno de los mayores grados de variación cromosómica reportado para un género de mamíferos (ej.: Cook et al. 1990). Para algunos autores esta variación es uno de los mejores argumentos para explicar la especiación rápida mediada por cambios cromosómicos (Bidau et al. 1996, Contreras y Bidau 1999, Massarini et al. 1991, entre otros). Sin embargo, y a pesar de que se ha avanzado

en el conocimiento de la variación genética y cromosómica, poco se sabe sobre los mecanismos de diferenciación del género (Lessa 2000).

La similitud morfológica y fisiológica de estos roedores es asombrosa debido a presiones selectivas impuestas por el modo particular de vida, siendo uno de los mejores ejemplos de convergencia adaptativa (Nevo 2007). A diferencia de otros roedores subterráneos, el género *Ctenomys* ha adquirido estos hábitos recientemente, y las relaciones filogenéticas con sus parientes, mayormente fosoriales, están claramente establecidas (Opazo 2005, Upham y Patterson 2012), por lo que constituyen un modelo de estudio excepcional sobre la acción de la selección natural a diferentes niveles (e.g.: Nevo et al. 1999, Tomasco et al. 2017). Además, el género ha sido propuesto como modelo de interés en la literatura sobre especiación (Mirol et al. 2010, Fernandez et al. 2012). Incluso como modelo de especiación cromosómica o mediada por procesos cromosómicos (Bidau 1996). Al ser un grupo tan numeroso de especies, que han invadido varios ambientes, se han estudiado como modelo de evolución del comportamiento social (hay especies sociales, solitarias y formas intermedias) (Lacey et al. 2000, Tassino et al. 2011) y otras características de su historia de vida (Estevan et al. 2016). También por tratarse de especies endémicas de Sudamérica, los patrones filogeográficos comparados, podrían dar cuenta de la historia del continente.

Si bien la anatomía de las especies actuales de *Ctenomys* es muy homogénea a pesar de su diversidad (Sanchez 2012), se ha propuesto que distintos factores ambientales podrían generar diferencias adaptativas entre poblaciones o entre especies (Busch et al. 2000). Esta radiación ha sido estudiada también en términos filogenéticos usando genes mitocondriales y secuencias de intrones nucleares, pero ha sido difícil de resolver (e.g.: Castillo et al. 2005, D'Elía et al. 1999, Parada et al. 2011, Slamovits et al., 2001). Otro aspecto, planteado más recientemente, es que la hibridación, ya sea entre razas cromosómicas como entre especies, podría ser un proceso ubicuo en el género a pesar de las diferencias cromosómicas (Gava y Freitas, 2004, 2003, Fernández et al. 2012, Lopes et al. 2013, Mirol et al. 2010). La reconstrucción de la historia filogenética del género ha sido compleja. Por un lado, la rápida especiación

podría determinar un reparto incompleto de linajes, mientras que eventos recurrentes de introgresión no facilitarían la diferenciación (revisado en Mallet et al. 2016). Otra opción podría ser una mala asignación de estatus específico para algunas especies del género. La pregunta clave es cuáles han sido los mecanismos que han promovido esta diversificación y les han permitido a los tucu-tucus ocupar los ambientes más diversos. Si bien ha habido un progreso considerable en el conocimiento de la variación genética y cromosómica, poco se sabe aún sobre esos mecanismos.

Si bien es un sistema sumamente rico como modelo de estudio, tiene la limitante de la falta de información sobre las especies presentes y su distribución. Muchas especies se conocen únicamente en sus localidades tipo y alrededores (Bidau 2015), y nunca han sido estudiadas desde su descripción. Incluso para muchas especies ha resultado extremadamente difícil su categorización debido al desconocimiento del estado poblacional (IUCN, 2017).

***Ctenomys* en Uruguay**

En Uruguay han sido descritas 3 especies de tucu-tucu. *Ctenomys torquatus* (Lichtenstein 1830) es una especie del grupo *torquatus* (Parada et al. 2011), con la distribución más amplia conocida entre las especies del género, presente en el centro y norte de Uruguay y el sur de Brasil (Freitas y Lessa 1984; Fernandes et al. 2009). Presenta una diversidad cariotípica moderada ($2n = 40, 44$ y 46 , revisado en Fernandes et al. 2009) y en Uruguay sólo se ha reportado el cariomorfo $2n = 44$ (Kiblisky et al. 1977). Posteriormente fue descrita *Ctenomys rionegrensis* (Langguth y Abella 1970), una especie perteneciente al grupo *mendocinus* (Parada et al. 2011) con una distribución limitada en el departamento de Río Negro (D'Elfa et al. 1999). Presenta al menos 5 poblaciones cuyo número diploide es $2n = 48$, sin polimorfismos cromosómicos intraespecíficos. Es una especie compartida con Argentina, ya que en ese país existen algunos registros sugeridos de la especie en la provincia de Entre Ríos (Bidau 2018, Carmarán 2018). Las poblaciones uruguayas de esta especie han sido extensamente estudiadas desde el punto de vista filogeográfico, con

alozimas, citocromo b y marcadores nucleares, pero no se ha incluido en la comparación las poblaciones argentinas (e.g. Wlasiuk et al. 2003). Existen algunas especies argentinas con gran afinidad morfológica (*C. yolandae* Contreras y Berry 1984, *C. bonettoi* Contreras y Berry 1982 y *C. bergi* Thomas 1902), citogenética (Ortells et al. 1990) y molecular (Tomasco comp. pers.), pero que nunca se han comparado directamente. *C. rionegrensis* se considera en la lista roja de la IUCN (IUCN red list), por presentar distribución restringida.

La última especie en ser descrita en nuestro país fue *Ctenomys pearsoni* (Lessa y Langguth 1983), que dentro del género es la especie más variable cariotípicamente (Reig et al., 1990) y que pertenece también al grupo torquatus (Parada et al. 2011). A lo largo de su estrecha distribución en el sur de Uruguay, muestra un marcado patrón de variación cromosómica que va desde $2n = 56$ a $2n = 70$. Los patrones de bandeo C y G indican la existencia de siete cariomorfos; tres de los cuales comparten el mismo $2n = 70$ pero que difieren en el número de brazos cromosómicos, los otros presentan $2n = 56, 58, 64$ y 66 . Es por este motivo, que *C. pearsoni* es la especie más variable en número diploide reportada en el género, lo que se conocía como “complejo pearsoni” (Altuna y Lessa 1985, Tomasco y Lessa 2007). Los cariomorfos, si bien se reemplazan entre sí a lo largo de la costa sur de Uruguay, no están ordenados clinalmente (Villar et al. 2014). También se ha reportado variación cromosómica intrapoblacional en la especie (Kiblicky et al. 1977, Novello y Lessa 1986, Novello et al. 1990, 1996, Villar 2000, Novello y Altuna, 2002). Incluso se ha reportado una variación extrema de cariotipo en el sureste de la costa uruguaya, departamento de Maldonado. Entre dos formas estables, una con $2n = 62$ y $FN = 78$, y otra con $2n = 64$ y $FN = 78$, existe una población intermedia con individuos que presentan cariotipos en mosaico $2n = 62/63$ y $2n = 63/64$, ambos con $FN = 78$. Estos individuos solo se encontraron en el área de contacto entre las poblaciones estables (Parededa y Novello 2012).

Por otro lado, Fernandes y colaboradores (2012) plantean que, en Minas, Departamento de Lavalleja, se encuentra la localidad de procedencia de *C. brasiliensis* (Blainville 1826) la especie tipo del género. Históricamente se ha considerado que el ejemplar con el que fue descrito el género, que se encuentra

en el Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, fue colectado en Minas Gerais (Brasil). Fernandes y colaboradores (2012) realizaron una comparación mediante morfometría geométrica del cráneo de espécimen tipo de *C. brasiliensis* con los de otras especies del género. Sus resultados indican, que la forma del cráneo de *C. brasiliensis* se encuentra estrechamente relacionada a *C. torquatus* y *C. pearsoni*, no pudiéndose precisar a cuál de estas especies está particularmente asociada ya que se solapan en la mayor parte de sus caracteres morfológicos. Los autores asumen que la denominación es incorrecta y plantean que “la localidad de las Minas”, la cual hace referencia la etiqueta del ejemplar colectado en 1826, sea la actual capital del departamento de Lavalleja. *C. brasiliensis* haría referencia al país de procedencia en el momento de su descripción en el año 1826, no al país de procedencia actual. Por otro lado, Kiblsky et al. (1977) reportó poblaciones de Lavalleja con $2n = 64$, lo que también se encontró para una población del departamento de Maldonado del complejo *pearsoni* (Villar 2000). Pero, esencialmente, las poblaciones minuanas no han sido estudiadas en profundidad hasta el momento, es necesario relevar que especie está presente en esa región del país (i.e.: *C. pearsoni* vs *C. torquatus*), y una vez hecho esto, hacer las comparaciones correspondientes con los ejemplares de *C. brasiliensis* depositados en el Muséum National d'Histoire Naturelle de París.

El estado de conocimiento general de los tucu-tucus en Uruguay podría considerarse como el más extenso en relación a lo que sucede en el resto del género, donde muchas especies se conocen muy limitadamente, solo por su descripción original de hace más de un siglo y por su localidad tipo. Sin embargo, los límites entre las diferentes especies no están definidos, para ninguna de las tres (o tal vez cuatro) especies presentes en Uruguay. Tal es el caso de los límites geográficos entre dos especies afines como *C. torquatus* y *C. pearsoni*, y donde entra en controversia la sinonimia con *C. brasiliensis* antes mencionado, así como la distribución limitada de *C. rionegrensis* y su afinidad con otras especies próximas. Más en general, es necesario conocer las poblaciones de tucu-tucus presentes en la mayor parte del país, ya que salvo las poblaciones conocidas de *C. pearsoni* sobre la costa, o las de *C. rionegrensis* en el depto. de Río Negro, existen escasos muestreos y caracterización de poblaciones.

En esta tesis, se abordará en forma parcial el problema, intentando estimar los límites de distribución geográfica de las especies *C. pearsoni* y *C. torquatus* (capítulo 1) y aportando los primeros datos transcriptómicos para resolver un posible caso de introgresión entre ambas especies (capítulo 2). En el primer capítulo se acompaña un estudio filogeográfico para *C. pearsoni*, donde se analiza la variación genética y morfológica de la especie en su nueva distribución.

Los resultados aportados por esta tesis, trascienden los objetivos de la misma, ya que contribuye en la transición al uso de datos multilocus en la mastozoología de Sudamérica aportando transcriptomas disponibles. Con esa información a disposición, se pueden desarrollar otro tipo de trabajos, por ejemplo, de captura de exones, así como poder evaluar cientos o miles de marcadores genéticos de forma directa, y responder diversas preguntas de tipo evolutivo, sistemático y filogeográfico.

Organización de la tesis.

Esta tesis está organizada en dos capítulos. Cada uno de ellos pretende ser un futuro trabajo a ser publicado en revistas científicas arbitradas, una regional y otra internacional. El primero, haciendo uso del muestreo intensivo que se realizó en dos especies de *Ctenomys* presentes en Uruguay, se establecen los límites geográficos de ambas, y se estudia la variación geográfica de una de ellas a nivel genético y morfológico. El segundo, evalúa la posibilidad de introgresión entre ambas especies, mediante el uso de transcriptomas de pocos ejemplares de cada una (8 en total). Ambos estudios son complementarios, y aportan información a la sistemática de estos roedores, tan interesantes desde el punto de vista evolutivo. En esta introducción general, se detallan aspectos importantes para entender el contexto en que se realizan ambos estudios, y la importancia del trabajo en su conjunto.

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GEOGRÁFICA EN EL TUCU-TUCU *Ctenomys pearsoni* (RODETIA, CTENOMYDAE) EN URUGUAY

Resumen

Ctenomys pearsoni y *C. torquatus* son dos de las tres especies de tucu-tucus presentes en Uruguay. La primera es compartida con Argentina y la segunda con Brasil. Hasta ahora, la distribución considerada para la especie *C. pearsoni* en Uruguay está restringida a la costa Rioplatense y Atlántica, mientras que se asume que *C. torquatus* se distribuye en todo el resto del país (a excepción de un área restringida del departamento de Río Negro donde habita *C. rionegrensis*), aunque no ha sido relevada exhaustivamente, particularmente en la zona centro del país. En este trabajo se muestrearon ejemplares de 7 nuevas localidades de tucu-tucus distribuidas en diferentes puntos del país, y se analizó la diversidad genética y morfológica entre los individuos colectados, comparándola con la información previa disponible. Mediante la secuenciación de aproximadamente 400pb de la Región Control (también llamada D-loop) del ADN mitocondrial de 4 ejemplares por población, se encontraron 9 haplotipos nuevos para *C. pearsoni* y 5 para *C. torquatus*. Las poblaciones al norte del Río Negro, dos del departamento de Cerro Largo (al este del país, limítrofe con Brasil) y una de Treinta y Tres pertenecieron a *C. torquatus*, mientras que el resto de las poblaciones ubicadas en los departamentos de Colonia, Durazno, Florida y Lavalleja pertenecieron a *C. pearsoni*. Los análisis filogeográficos mediante diferentes métodos del conjunto de poblaciones pertenecientes a *C. pearsoni* muestran 3 grandes agrupaciones en esta especie (centro-oeste, centro sur y este), aunque no monofiléticas para un marcador mitocondrial (D-Loop). Estas agrupaciones, se corresponden también con los grupos establecidos por morfometría geométrica de los cráneos. En conclusión: i) se amplía la distribución reconocida para *C. pearsoni* y ii) se describe la variación geográfica en *C. pearsoni*, identificándose tres grandes grupos en Uruguay apoyada por datos genéticos y morfológicos.

Introducción

El género *Ctenomys* está formado por roedores subterráneos conocidos como tucu-tucus. Es uno de los géneros con mayor número de especies de la radiación de los mamíferos, habiendo actualmente 70 especies nominales (Bidau 2015). Por sus características de historia de vida, constituye un modelo sumamente interesante para estudios de evolución adaptativa, especiación rápida, y cambios cromosómicos (Reig & Kiblicky 1969, Bidau 1996). En Uruguay han sido descritas 3 especies de tucu-tucu: *C. torquatus* (Lichtenstein 1830), *C. rionegrensis* (Langguth y Abella 1970), y *C. pearsoni* (Lessa y Langguth 1983), en ese orden cronológico.

Ctenomys pearsoni se distribuye en Uruguay a lo largo de toda la costa del Río de la Plata (Figura 1), entre los departamentos de Colonia y Rocha (Bidau et al. 2008). La localidad tipo de la especie se conoce con el nombre de Limetas, la cual se encuentra sobre el Arroyo Limetas, unos 25 Km al sureste de Carmelo, departamento de Colonia. Generalmente ocupa suelos arenosos, aunque también se lo puede encontrar en tierra negra, como sucede en la localidad de Limetas. Habita en forma permanente en sistemas de galerías subterráneas, que permanecen cerrados por tapones de material removido del suelo (Altuna 1983). La distribución considerada de *C. torquatus* es todo el resto del territorio a excepción de una pequeña porción del departamento de Río Negro donde está *C. rionegrensis* (Bidau 2018). La distribución de *C. rionegrensis* se limita a un área de aproximadamente 60 x 50 km al suroeste del departamento de Río Negro (e.g.: Wlasiuk et al. 2003), aunque se conocen algunas poblaciones en Entre Ríos (Argentina) (Bidau 2018, Carmarán 2018).

Por otro lado, se ha planteado que en Minas, Departamento de Lavalleja, se encuentra la localidad de procedencia de *C. brasiliensis* (Blainville 1826) la especie tipo del género *Ctenomys*. (Fernandes et al. 2012). Una comparación de la morfología del cráneo del holotipo de *C. brasiliensis* con muestras de otros tucu-tucus de la región sugieren que esta especie presenta morfología dentro del rango de variación de *C. pearsoni* o *C. torquatus*, por lo que no pueden distinguir entre ambas y reconocen que se necesitan más estudios para resolverlo. Este último planteo ha dejado en evidencia la falta de estudio de estas especies de

roedores, lo que no es ajeno a la región. Esto se debe a que son animales difíciles de observar en el campo, por sus hábitos subterráneos, y muy similares morfológicamente entre ellos, lo que impide su identificación rápida. En particular, son difusos los límites de las distribuciones geográficas de las especies uruguayas *C. torquatus* y *C. pearsoni*, establecer sus límites, tendría consecuencias en la sistemática del género. La Región de Control presenta una tasa de sustitución elevada dentro del genoma de mitocondrial, por lo que resulta un buen marcador para estudios que incluyen variación intraespecífica o variación entre especies estrechamente emparentadas. Si bien también existen otros marcadores con características similares, existe un trabajo en esta misma especie donde se reportaron 21 haplotipos de esta región de ADN (Tomasco y Lessa 2007), que se utilizaron en este estudio de diferenciación geográfica de la especie *Ctenomys pearsoni*.

El objetivo de este estudio fue muestrear y relevar poblaciones desconocidas de tucu-tucus en la zona centro del país y asignarlas a alguna de las dos especies mencionadas para confirmar o ajustar las distribuciones de *C. torquatus* y *C. pearsoni*. Por otro lado, y debido a que como resultado del objetivo anterior ampliamos la distribución de *C. pearsoni* por lo menos al doble de tamaño, evaluamos la variación geográfica de *C. pearsoni* a nivel del genoma mitocondrial y de la morfología del cráneo analizando conjuntamente ejemplares presentes en colecciones y los nuevos obtenidos en este estudio.

Materiales y métodos

Muestras y sitios de muestreo

Los muestreos se llevaron a cabo en 7 localidades previamente no muestreadas (Estanzuela, Villa Serrana, Cerro Pelado, Salto del Penitente, Carmelo, Durazno y Cerro Colorado ver tabla 1. y Figura 1.) utilizando trampas Oneida Victor No. 0. Todos los procedimientos que involucran animales vivos siguieron los lineamientos establecidos por American Society of Mammalogists para el uso de mamíferos silvestres en investigación (Sikes et al. 2016) y fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A., Uruguay). Las pieles, esqueletos y muestras de hígado conservadas en etanol 95%, fueron preparados y depositados en el Laboratorio de Evolución (Facultad de Ciencias, UdelaR), con número de voucher de EV1895 a EV2017. También se incluyeron en los análisis esqueletos y tejidos conservados en etanol 95% de la colección del Laboratorio Evolución de la Facultad de Ciencias (UdelaR). En la tabla 1 y la Figura 1 se resume el conjunto de poblaciones evaluadas en este estudio, discriminado entre las nuevas para este estudio y las presentes en colecciones.

Generación y análisis de secuencias

La extracción total de ADN se realizó a partir de hígado conservado en etanol 95%, según protocolo modificado de Miller et al. (1997) La digestión del tejido se realizó mediante SDS (buffer de lisis) y proteinasa K, seguido de precipitación salina de proteínas y precipitación del ADN con isopropanol. Un fragmento de aproximadamente 470 pares de bases (pb) de la Región de Control del ADN mitocondrial se amplificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki et al. 1988) utilizando los cebadores TucoPro (5'-TTC TAA TTA AAC TAT TTC TTG-3', Tomasco y Lessa 2007) y TDKD (5' - CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG - 3', Kocher et al., 1989).

Tabla 1. Sitios de muestreo de este estudio. En negrita se muestran las localidades muestreadas por primera vez en este estudio.

Localidades	Coordenadas geográficas	Número de individuos utilizados	
		Molecular	Morfometría
Penino	-34.7621, -56.4278	7	2
Arazatí	-34.5593, -56.9974	8	-
Limetas	-34.1599, -58.0927	14	4
Carrasco	-34.8813, -56.0329	12	7
Parque Roosevelt	-34.8555, -56.0438	10	9
Lagomar	-34.8458, -55.9705	-	2
Autódromo	-34.4166, -56.4333	-	2
Solis	-34.7905, -55.3922	11	8
Chihuahua	-34.9455, -54.9463	9	-
Valizas	-34,3381, -53,8014	12	4
Laguna Negra	-34.0067, -53.5934	1	-
Cuchilla alta	-34.7941, -55.5118	9	3
Laguna de Rocha	-34.6817, -54.2829	3	-
Relincho	-34.3347, -56.9669	-	3
Playa Pascual	-34.7537, -56.4446	-	1
Las Flores	-34.8164, -55.3285	-	1
Bella Vista	-34.8009, -55.3764	-	3
José Ignacio	-34.8337, -54.6368	14	3
Estanzuela	-34.3725, -57.7176	4	4
Villa Serrana	-34.3216, -54.9885	3	3
Cerro Pelado	-34.2600, -55.1216	4	2
Salto del Penitente	-34.3688, -55.4312	4	3
Carmelo	-33.9467, -58.3352	3	3
Durazno	-33.3616, -56.5131	5	2
Cerro Colorado	-33.8812, -55.5452	4	2

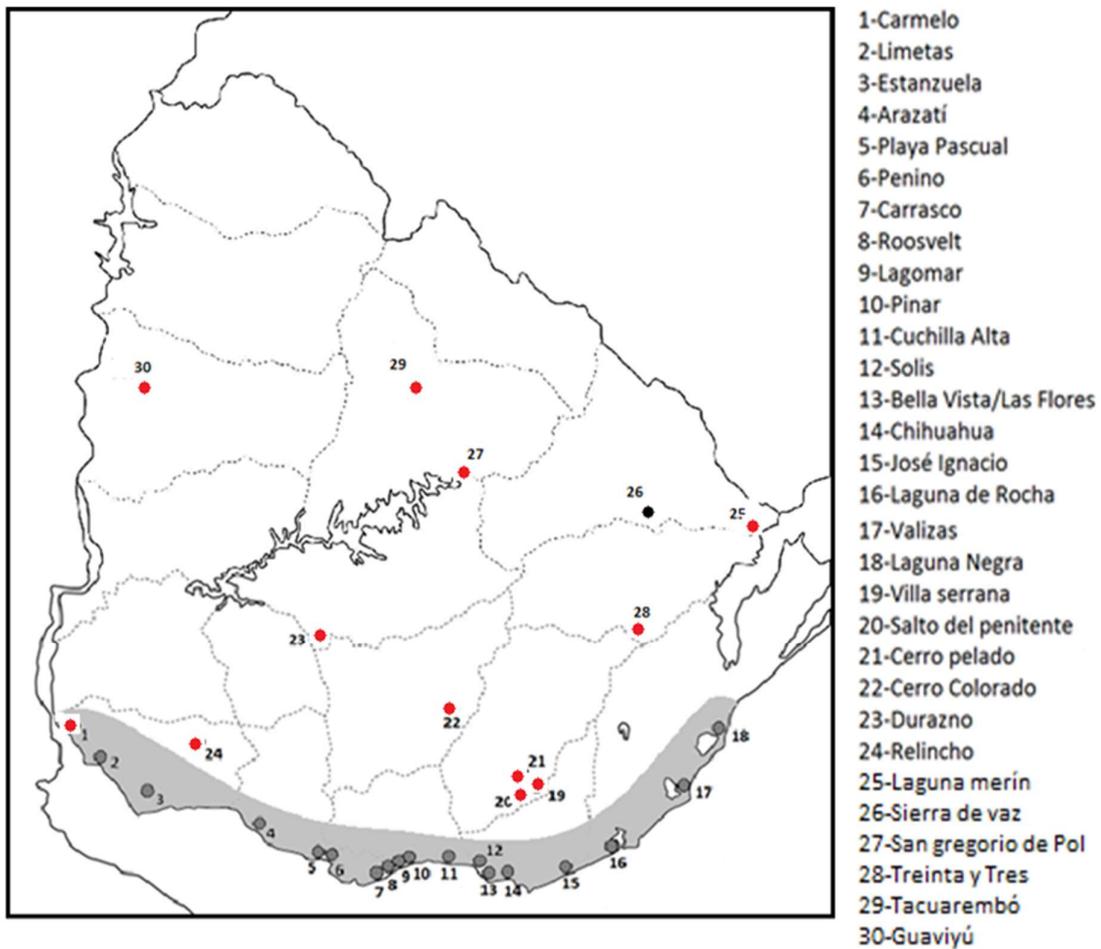


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Ctenomys* muestreadas. Las poblaciones representadas por puntos rojos (números 1 y de la 19 al 24) son las muestreadas por primera vez en este estudio. En gris se muestra la distribución conocida hasta el momento de la especie *C. pearsoni*.

La amplificación de ADN total se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l con los siguientes constituyentes: 12,5 μ l de ADN (dilución 1 en 100 de la extracción de ADN total), 1X de buffer de enzima ADN polimerasa Taq, 200 μ M de cada dNTP, 200 μ M de cada cebador, 1 unidad de ADN Polimerasa (0.2 μ L de 5U/ μ L) y 3,5 mM de MgCl₂. Las condiciones de ciclado se optimizaron en un termociclador PxE 0.2 (Thermo) mediante una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de asociación a 47°C y 30 segundos de extensión a 72°C, y

una extensión final de 5 minutos a 72°C. En cada reacción se realizaron controles negativos reemplazando el volumen de dilución de ADN con agua destilada. Los productos de PCR obtenidos se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 20 minutos a 150 V en TBE 1X y se visualizaron con una tinción posterior con bromuro de etidio y luz UV, usando un marcador de peso molecular sintético (100pb Fermentas). Los productos que no mostraron bandas secundarias y que fueron de intensidad similar al fragmento de 500 pb del standard de peso molecular, se seleccionaron para su secuenciación. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen inc. (<http://www.macrogen.com>) para ser purificados y secuenciados a partir del cebador TUCO PRO. Los cromatogramas se editaron usando Proseq (Filatov 2009) y las secuencias reportadas en este trabajo se depositaron en GenBank con los números de acceso XXXX a XXXX.

Para el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, se añadieron los 21 haplotipos previamente reportados con los números de acceso AY755438.1 a AY755458.1 de la Región Control de *C. pearsoni*.

Se realizaron dos análisis consecutivos. Un primer análisis con todos los haplotipos encontrados más los reportados en genbank, utilizando a *C. rionegrensis* como grupo externo. Una vez identificadas las muestras que pertenecían a *C. torquatus* y a *C. pearsoni* la mayoría, se decidió hacer un análisis más detallado de este último grupo. En este caso, dos haplotipos de *C. torquatus* (XXXXX) se incluyeron como grupo externo para la reconstrucción filogenética (Parada et al 2011, Caraballo et al 2016).

Las secuencias se alinearon utilizando el programa MEGAX (Kumar et al., 2018) mediante CLUSTAL con opciones predeterminadas y las relaciones filogenéticas entre haplotipos se reconstruyeron usando dos métodos de reconstrucción del mismo programa. Por un lado, máxima verosimilitud usando el modelo de Tamura 3 parámetros con distribución gama de la tasa de sustituciones entre sitios por ser este modelo de sustitución el que presentó el menor valor de BIC (Bayesian Information Criterion), por lo que era el modelo que mejor se ajustaba a los datos para esa cantidad de parámetros, se realizó con el programa MEGAX (Kumar et al., 2018). Como opción de inferencia de

árboles se escogió Nearest-Neighbor-Interchange. Por otra parte, se realizó la reconstrucción por el método de máxima parsimonia realizando una búsqueda heurística con la opción “Min-Mini Heuristic”. El apoyo estadístico de los nodos se evaluó, en ambos casos, con 1000 seudoréplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

Los haplotipos obtenidos y los previamente reportados se incluyeron también en una red de haplotipos construida por el método de “Median-joining” (Bandelt et al. 1999) mediante la utilización del software NETWORK 5.0.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>).

Para evaluar la huella de diferentes eventos demográficos se aplicó el test D de Tajima (Tajima 1989). Este estadístico toma como insumos dos parámetros de variación nucleotídica del set de datos. Por un lado, el parámetro π que es el número promedio de diferencias entre pares de individuos de la población y por otro Θ que es una estimación de π basada en el número de sitios variables. La prueba de neutralidad D de Tajima es una normalización de la diferencia de los dos parámetros arriba descritos y en condiciones de neutralidad y tamaño poblacional constante ambos parámetros toman el mismo valor y la diferencia es cero. Sin embargo, frente a cambios en el tamaño poblacional o si el locus es sometido a selección, ambos estimadores responden de manera diferente y el valor de D será distinto de cero. Por ejemplo, un valor negativo del estadístico D de Tajima significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación a lo esperado, lo que indica una expansión del tamaño de la población (por ejemplo, después de un cuello de botella o un barrido selectivo) y/o acción de la selección purificadora. Un valor positivo del estadístico D de Tajima significa bajos niveles de polimorfismos de baja y alta frecuencia, lo que podría indicar una disminución en el tamaño de la población o acción de la selección balanceadora. En este trabajo la neutralidad es uno de los supuestos de los análisis realizados y de ello depende, además, las predicciones de las hipótesis. Estas pruebas fueron realizadas en MEGAX (Kumar et al., 2018).

Para analizar estructuración poblacional, se confeccionaron tres grupos de poblaciones que se corresponden con las presentes en Región Centro-Oeste (Penino, Arazatí, Limetas, Estanzuela, Carmelo y Durazno), Centro-Sur (Solís,

Cuchilla Alta, Parque Roosevelt y Carrasco) y Este (Laguna de Rocha, Valizas, Chihuahua, Salto del Penitente, Cerro Pelado, Villa Serrana y José Ignacio) de la distribución de la especie. Se calcularon los índices de fijación (Fst) promedio globales para cada grupo en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier 2010) y se realizó un AMOVA entre grupos, entre poblaciones de un mismo grupo y dentro de las poblaciones utilizando como método de inferencia de distancias Tamura y Ney, este análisis también se realizó en el programa Arlequin 3.5

Análisis Morfométrico

Se analizaron los cráneos de un total de 68 especímenes, clasificados como adultos mediante el examen de las suturas entre los huesos basioccipitales y basiesfenoides (Anderson et al., 1987). En la Tabla 1 se muestran cuantos individuos fueron analizados por localidad y cuáles son los ejemplares obtenidos de la colección el laboratorio de Evolución y cuales obtenidos de las nuevas localidades.

Fueron elegidos dieciocho marcos anatómicos (“landmarks”) del cráneo de *C. pearsoni*, asumidos como homólogos, entre todos los especímenes analizados (Figura 2). Punto 1 - intersección entre el premaxilar y extremo posterior del incisivo, 2 - extremo anterior de la sutura entre los nasales, 3 - sutura entre el premaxilar y el maxilar en el contorno externo del cráneo, 4 - sutura entre el premaxilar y el maxilar en el contorno del cráneo, 5 - sutura entre nasales y frontales, 6 - sutura entre el nasal, frontal y premaxilar, 7 - sutura entre puente anterorbital de maxilar y el frontal, 8 - extremo superior de la sutura entre el maxilar y el yugal en el arco cigomático, 9 - punta del proceso superior del yugal, 10 - sutura entre el frontal y el escamosal, 11 - sutura entre el frontal, parietal y el escamosal, 12 - sutura entre los frontales y parietales, 13 - extremo posterior de la sutura entre parietales e interparietal, 14 - extremidad posterior de la cresta parietal 15 - punto posterior del cóndilo occipital, 16 - extremo posterior del exoccipital, 17 - sutura entre el proceso mastoideo del escamosal, el timpánico y el proceso posttimpánico del mastoideo y 18 - punta del proceso posterior del yugal.

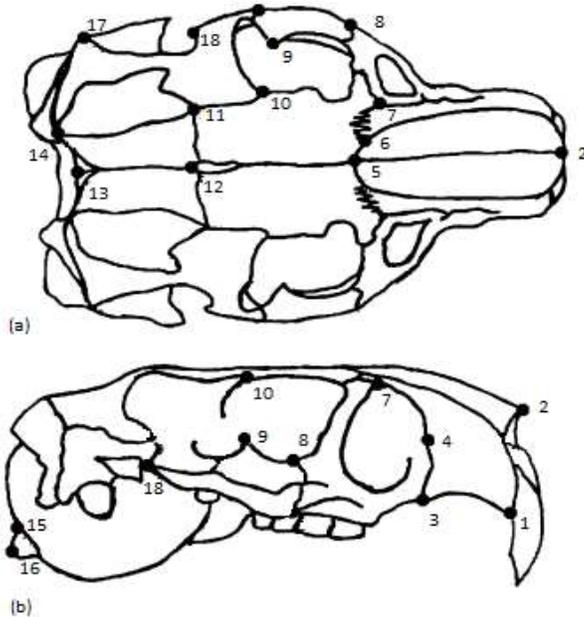


Figura 2. Puntos de referencia morfológicos definidos para las vistas dorsal (a) y lateral (b) del cráneo de *Ctenomys pearsoni*. El cráneo representado es meramente ilustrativo. Modificado de D'Anatro & Lessa (2006).

Cada cráneo fue sujetado a una superficie de poliestireno para obtener las coordenadas en tres dimensiones mediante un MicroScribe® G2X. Las coordenadas x, y, z de cada marco anatómico se enviaron a un archivo de Excel y luego fueron transformadas en un archivo TPS. Las configuraciones de marcos anatómicos así obtenidas se re-escalaron y superpusieron una a la otra de modo de minimizar la desviación entre las distintas configuraciones de marcos anatómicos utilizando el método Procrustes.

La variación entre muestras se expresa como una comparación de una muestra dada con la configuración consenso. A los individuos superpuestos se los descompone en elementos ortogonales denominados "Principal Warps". Los individuos superpuestos son proyectados en estos "Principal Warps" para describir sus desviaciones de la configuración consenso. Estas proyecciones, denominadas "Partial Warps", describen las diferencias de forma que existen entre los especímenes estudiados y serán utilizadas en los análisis posteriores.

Para analizar la posible diferenciación entre los individuos colectados en distintas localidades y discriminar entre clases por forma se realizaron dos análisis, se utilizó el Análisis de Variables Canónicas (AVC) y el análisis de la Función Discriminante. Una función discriminante indica el grado de pertenencia de un objeto a una clase, la clasificación de este objeto se realiza en aquella clase en la que pertenece en mayor grado. Encuentra los ejes que optimizan las diferencias entre grupos en relación con la variación dentro del grupo y se utiliza como una herramienta de clasificación (Zelditch et al 2012). La función discriminante maximiza la separación de grupo para trazar sus diferencias y predecir la afiliación de grupo (clasificación). La clasificación de un individuo (a través del eje discriminante) se realiza mediante funciones que se calcularon en muestras que incluyeron ese mismo individuo. Entonces, es inevitable un grado de sobreajuste lo cual conduce a una sobrestimación de la efectividad del análisis de discriminante. Para superar este problema, se puede usar un procedimiento de validación cruzada (Viscosi & Cardini 2011). Este procedimiento deja una muestra a la vez que no se usa para construir la función discriminante y luego prueba la tasa de asignación correcta de la muestra. Tanto el AVC como el análisis discriminante utilizan como insumos los "Partial Warps" para discriminar entre diferentes grupos geográficos y entre poblaciones. Se calcularon las distancias de Mahalanobis entre pares de grupos. Las distancias de Mahalanobis muestran cuán lejos están las formas de un grupo de la media del otro grupo. Para calcular la distancia de Mahalanobis se requieren dos insumos. Por un lado, la matriz de covarianza que contiene en su diagonal la varianza de las variables aleatorias que la componen y fuera de la diagonal tiene las covarianzas de las variables aleatorias. El otro insumo es la distancia de cada individuo al centroide.

Para determinar si existe una diferencia significativa en las distancias de Mahalanobis entre grupos, o lo que es lo mismo, comprobar si hay evidencia en contra de la hipótesis nula de que la diferencia observada es debida, únicamente, a la asignación aleatoria de los individuos a los grupos, se realizó un test de permutaciones para el estudio de diferencias entre pares de grupos. Se realizaron un total de 10000 permutaciones de individuos entre grupos.

Se utilizó el tamaño de centroide como una medida robusta del tamaño general del cráneo (Monteiro y dos Reis 2000). Se realizó una regresión simple entre la variable “logaritmo del tamaño del centroide” con cada una de las dos principales variantes canónicas para evidenciar si existe correlación o si el tamaño del cráneo es independiente de los ejes del análisis de discriminantes. Todos los análisis mencionados se realizaron utilizando el software MorphoJ 1.06d (Klingenberg 2011).

Para evidenciar un posible correlato entre la variación genética y la variación morfológica se realizó un test de Mantel en el software XLSTAT (ADDINSOFT). Como medida de variación genética se tomó la matriz de valores de F_{st} entre grupos de poblaciones (regiones Centro-Oeste, Centro-Sur y Este) y como medida de variación morfológica se tomó la matriz de distancias de Mahalanobis entre los mismos 3 grupos de poblaciones

Resultados

Análisis de secuencia

Se analizó un total de 141 secuencias de 419 pb de la primera región hipervariable de la región de control del ADN mitocondrial, adyacente a Pro-ARNt. La composición de bases (27.3 T, 24.3 C, 33.5 A, 14.9 G) y el sesgo de transición observado (relación transición:transversión observada 3.63) no difirieron del patrón encontrado en el ADN mitocondrial de *Ctenomys* (D'Elía 1996; Tomasco y Lessa 2007) y los mamíferos en general (Rosenberg 2003).

De los 44 sitios variables presentes en las secuencias, 33 fueron informativos para el criterio de Máxima Parsimonia. Fueron identificados 30 haplotipos diferentes compuestos por 21 haplotipos reportados previamente en Tomasco y Lessa (2007) y 9 nuevos reportados por este estudio. La cantidad de individuos que presentaron cada haplotipo, así como las localidades en que cada haplotipo fue encontrado, se presentan en la Tabla 2. La frecuencia de los haplotipos de *C. pearsoni* fue variable, entre 1 a 22 copias; 10 haplotipos fueron compartidos entre poblaciones y 20 fueron exclusivos (Tabla 2). La población más variable fue Solís, con 5 haplotipos, 3 de los cuales se compartieron con otras poblaciones. Solo 1 población (Cuchilla Alta) resultó ser monomórfica, pero su único haplotipo se compartió con Solís.

El número promedio de diferencias nucleotídicas fue de 7.40. Los valores de diversidad nucleotídica Θ_w y π fueron 0.0191 y 0.0176, respectivamente y la prueba de neutralidad de Tajima tuvo un valor de -0.231 no significativa ($P > 0.10$), por lo que no habría un exceso de polimorfismos de baja frecuencia con respecto a lo esperado o un evento reciente de expansión del tamaño de la población.

Tabla 2. Se muestra la cantidad de individuos que presentaron cada haplotipo, así como las localidades en que cada haplotipo fue encontrado. JI (José Ignacio), LR (Laguna de Rocha), VS (Villa Serrana), SP (Salto del Penitente), CP (Cerro Pelado), PE (Penino), VA (Valizas), SO (Solís), CH (chihuahua), LN (Laguna negra), CU (Cuchilla Alta), PR (Parque Roosevelt), CA (Carrasco), AR (Arazatí), LI (Limetas), ES (Estanzuela), CR (Carmelo), DU (Durazno), CC (Cerro Colorado). En negritas se resaltan los haplotipos nuevos reportados en este estudio. Con asteriscos (*) se muestran las localidades nuevas reportadas en este estudio

Haplotipo	individuo	Localidades			Haplotipos	Individuos	Localidades			
H1	22	12JI	1LR	1VS*	4SP*	4CP*	H16	6	5 PE	1 CA
H2	3	2 LR	1 PE				H17	2	1 PE	1 CA
H3	4	4 VA					H18	1	1 LI	
H4	8	8 VA					H19	1	1 AR	
H5	1	1 JI					H20	13	13 LI	
H6	2	1 SO	1 JI				H21	5	4 CH	1 SO
H7	4	4 CH					H22	3	3 ES*	
H8	1	1 LN					H23	1	1 ES*	
H9	11	9 CU	2 SO				H24	2	2 VS*	
H10	2	1 CH	1 PR				H25	2	2 CR*	
H11	6	6 SO					H26	1	1 CR*	
H12	1	1 CA					H27	4	4 DU*	
H13	4	2 PR	2 CA				H28	1	1 DU*	
H14	19	11 CA	7 PR	1 SO			H29	2	2 CC*	
H15	7	7 AR					H30	2	2 CC*	

La reconstrucción filogenética con todos los haplotipos mostró que la mayoría de las poblaciones pertenecían a *C. pearsoni*, mientras que 6 poblaciones (Treinta y Tres, Guaviyú, San Gregorio de Polanco, Laguna Merín Tacuarembó y Sierra de Vaz) pertenecían a *C. torquatus*. (Fig. 3i y 3ii)

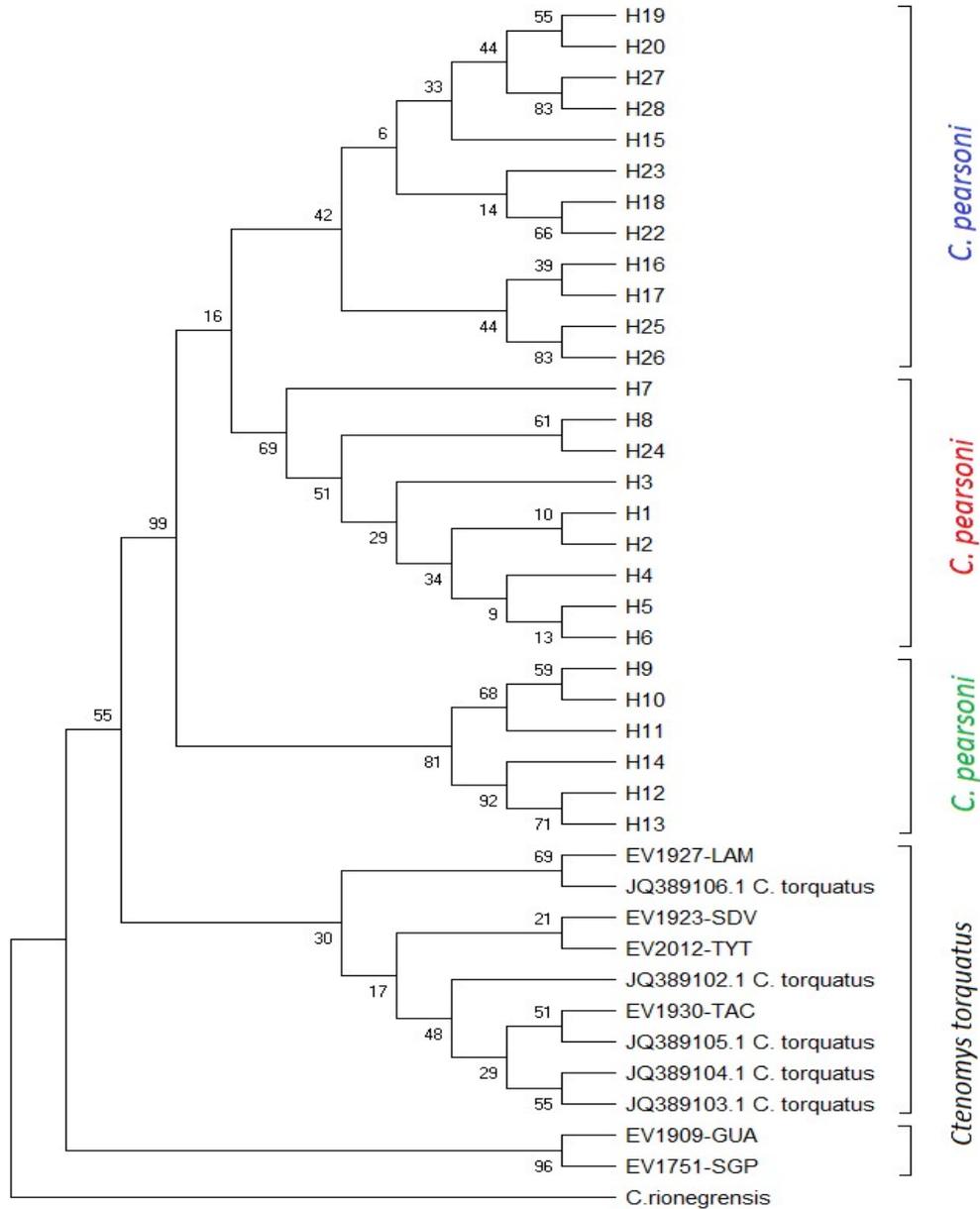


Figura 3i. Filogenia por máxima verosimilitud con todas las poblaciones de *Ctenomys* conocidas en Uruguay. H** son haplotipos conocidos de *C. pearsoni*. JQ38910*.1 son secuencias conocidas de *C. torquatus* presentes en genbank. LAM (Laguna Merín), SGP (San Gregorio de Polanco), SDV (Sierra de Vaz), TYT (Treinta y Tres), TAC (Tacuarembó) y GUA (Guaviyú).

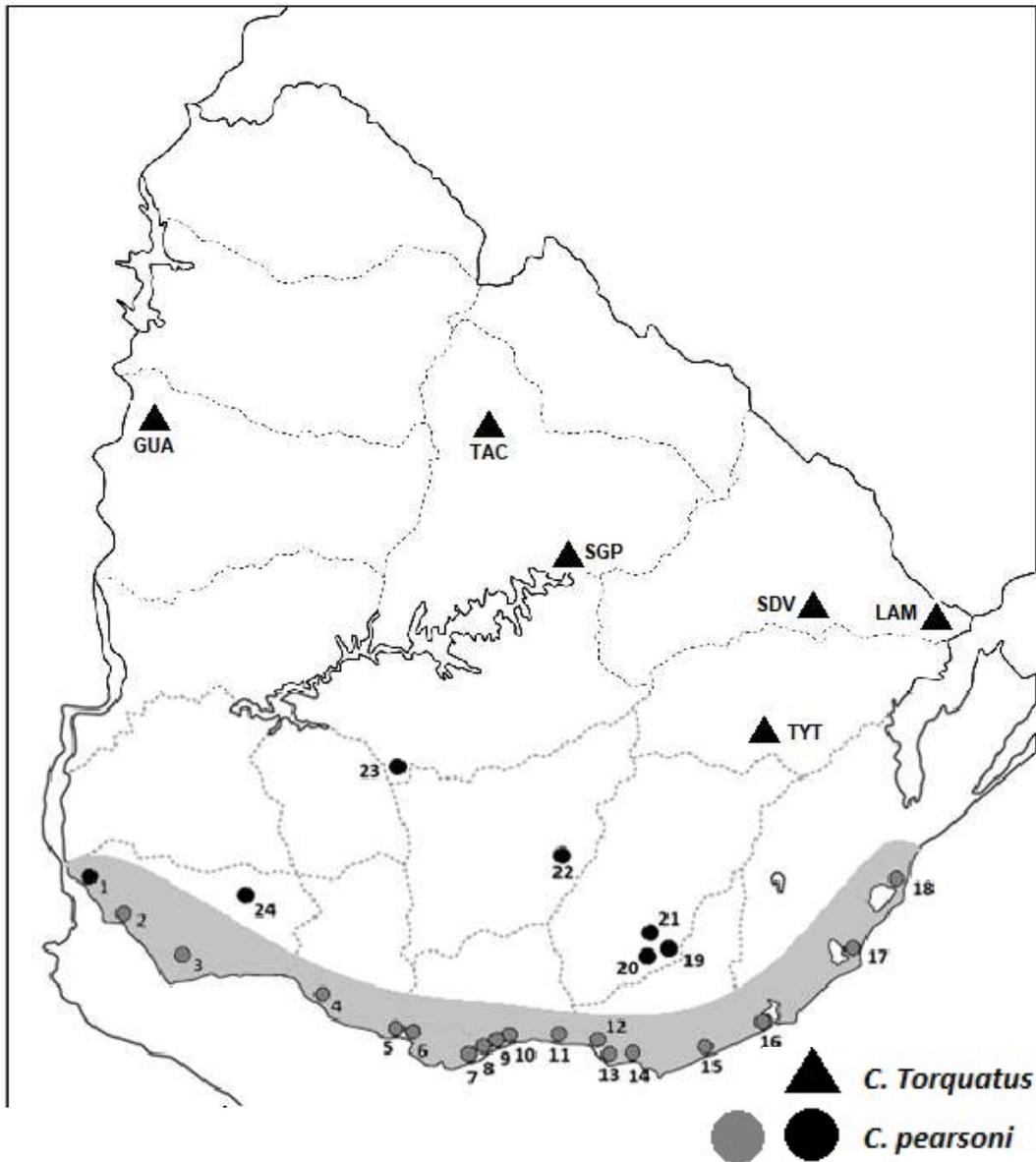


Figura 3ii. Poblaciones pertenecientes a *C. torquatus* (triángulos) y *C. Pearsoni* (círculos), estas últimas discriminadas entre las poblaciones conocidas previamente (gris) y las nuevas reportadas en este estudio (Negro).

Al analizar las muestras de *C. pearsoni* utilizando a *C. torquatus* como grupo externo, las reconstrucciones filogenéticas tanto por el método de Máxima Parsimonia como por Máximo de Verosimilitud (Fig. 4i y Fig. 4ii, respectivamente), coincidieron casi completamente, en particular se identificaron tres grupos de haplotipos que se repiten en ambas reconstrucciones. En todos los nodos los valores de bootstrap son bajos, tanto en los nodos más terminales

como en aquellos que establecen la relación entre los grandes grupos. Los resultados obtenidos con la red de haplotipos por el método de Median-joining (Fig. 5), concuerdan con los obtenidos en las reconstrucciones filogenéticas. Se identifican los mismos tres grupos de haplotipos, apoyando por una tercera vía de análisis los resultados obtenidos. Las cuales están correlacionados con la ubicación de las poblaciones a las que pertenecen los individuos.

Seis de los nuevos haplotipos pertenecientes a poblaciones de Carmelo (H25 y H26), Durazno (H27 y H28) y la Estanzuela (H22 y H23) se encontraron en la filogenia más cercanamente relacionados con los haplotipos previamente descritos para Limetas, Penino y Arazatí. Todas las localidades previamente mencionadas son próximas entre sí geográficamente y se corresponden con la región Centro-Oeste de la distribución de la especie. La región Centro-Oeste está representada en color azul en la (Fig. 6). Se encontraron dos haplotipos previamente no descritos para la localidad de Cerro Colorado (H29 y H30), estos se encontraron formando un grupo monofilético con los haplotipos de las localidades costeras que están entre Carrasco y Cuchilla Alta, que a su vez son las más próximas geográficamente. Se corresponden con la región Centro-Sur de la distribución de la especie, esta región está representada con color verde en la Figura 6. Por último, se encontró un nuevo haplotipo en individuos de la localidad de Villa Serrana (H24). Otro individuo de esta localidad, junto con todos los individuos de Salto del Penitente y Cerro Pelado, comparten el haplotipo con mayor representación en la población de José Ignacio (H1). Estos dos haplotipos forman un grupo monofilético con haplotipos encontrados en las localidades costeras que van desde Solís hasta Laguna Negra. Una vez más estas localidades son próximas entre sí y se corresponden con la región Este de la distribución de la especie, esta región está representada con color rojo en la Figura 6.

Algunos de los haplotipos presentes en más de una población no pertenecen a pares de localidades señaladas dentro de la misma región, tal es el caso de los haplotipos H6 y H21 que fueron encontrados en individuos de Solís y José Ignacio y en individuos de Solís y Chihuahua respectivamente. No obstante, estas tres poblaciones son muy cercanas entre sí. Lo mismo ocurre

con los haplotipos H16 y H17, si bien estos haplotipos están más emparentados con otros haplotipos de la región Centro-Oeste, se encontró un individuo en Carrasco para cada uno de estos dos haplotipos. Sin embargo, otros 13 individuos en Carrasco presentaron haplotipos más emparentados con aquellos definidos para la región centro-Sur.

Los valores de F_{st} fueron altos para todos los pares de grupos. Entre las regiones Centro-Oeste y Centro-Sur el estadístico tomó un valor de 0.43672, entre las regiones Centro-Oeste y Este de 0.42292 y entre las regiones Centro-Sur y Este de 0.42222. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) indicó que más de la mitad de la variación (un 53 %) está repartida entre los grupos, un 29% entre poblaciones de un mismo grupo, y el 17% restante dentro de las poblaciones.

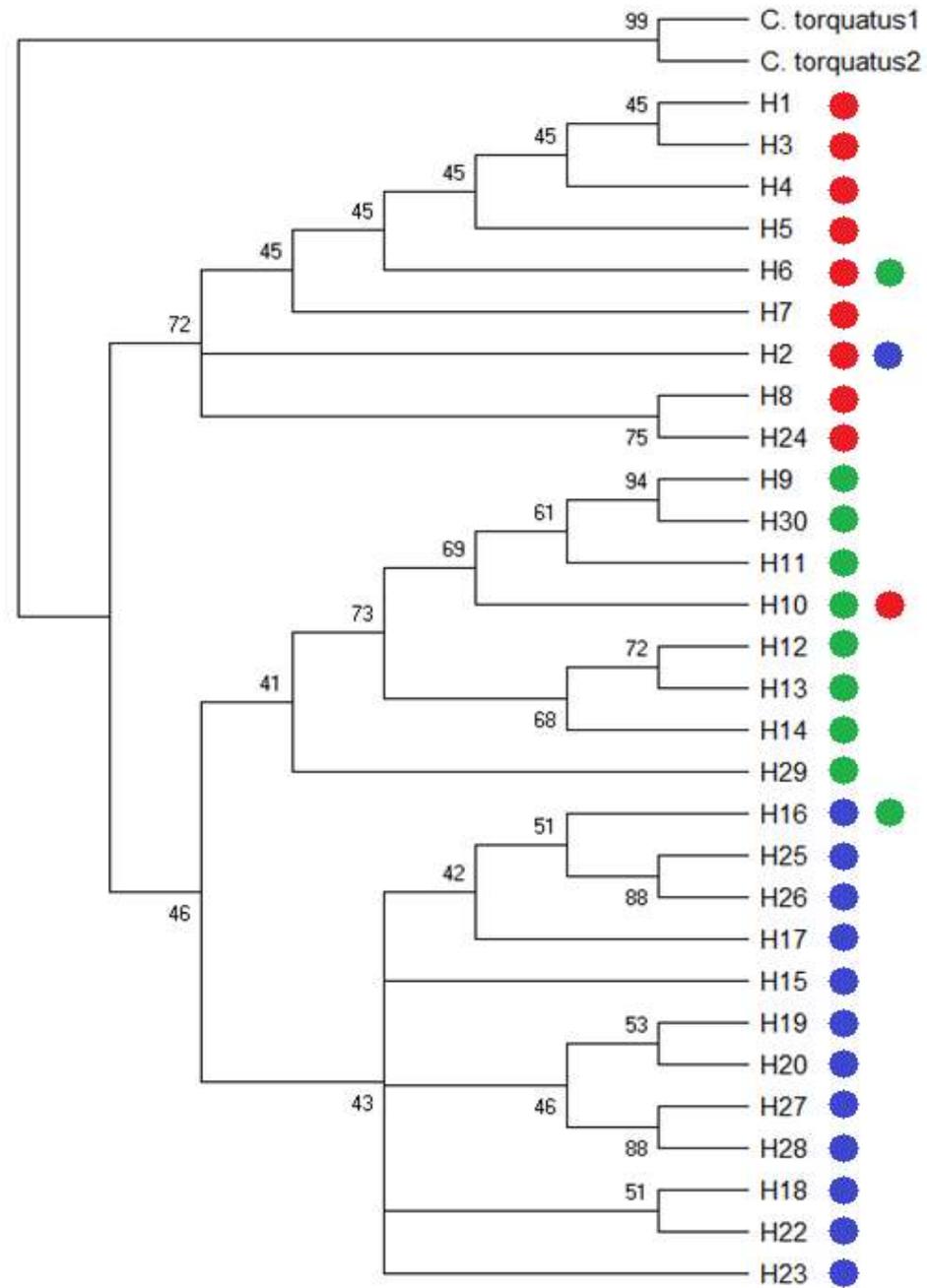


Figura 4i. Análisis filogenético por método de Máxima Parsimonia. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de Máxima Parsimonia. El árbol tuvo un largo de 73 pasos y un Índice de Consistencia de 0.66. El árbol de consenso de bootstrap fue inferido a partir de 5000 réplicas. Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 40% de las réplicas fueron colapsadas. Para cada nodo se muestra el porcentaje de bootstrap. Los colores de los círculos junto a cada haplotipo de *C. pearsoni* indican la región geográfica en donde fueron obtenidos, en color azul individuos de la región Centro-Oeste, en Verde de la región Centro-Sur y en rojo del a región Este.

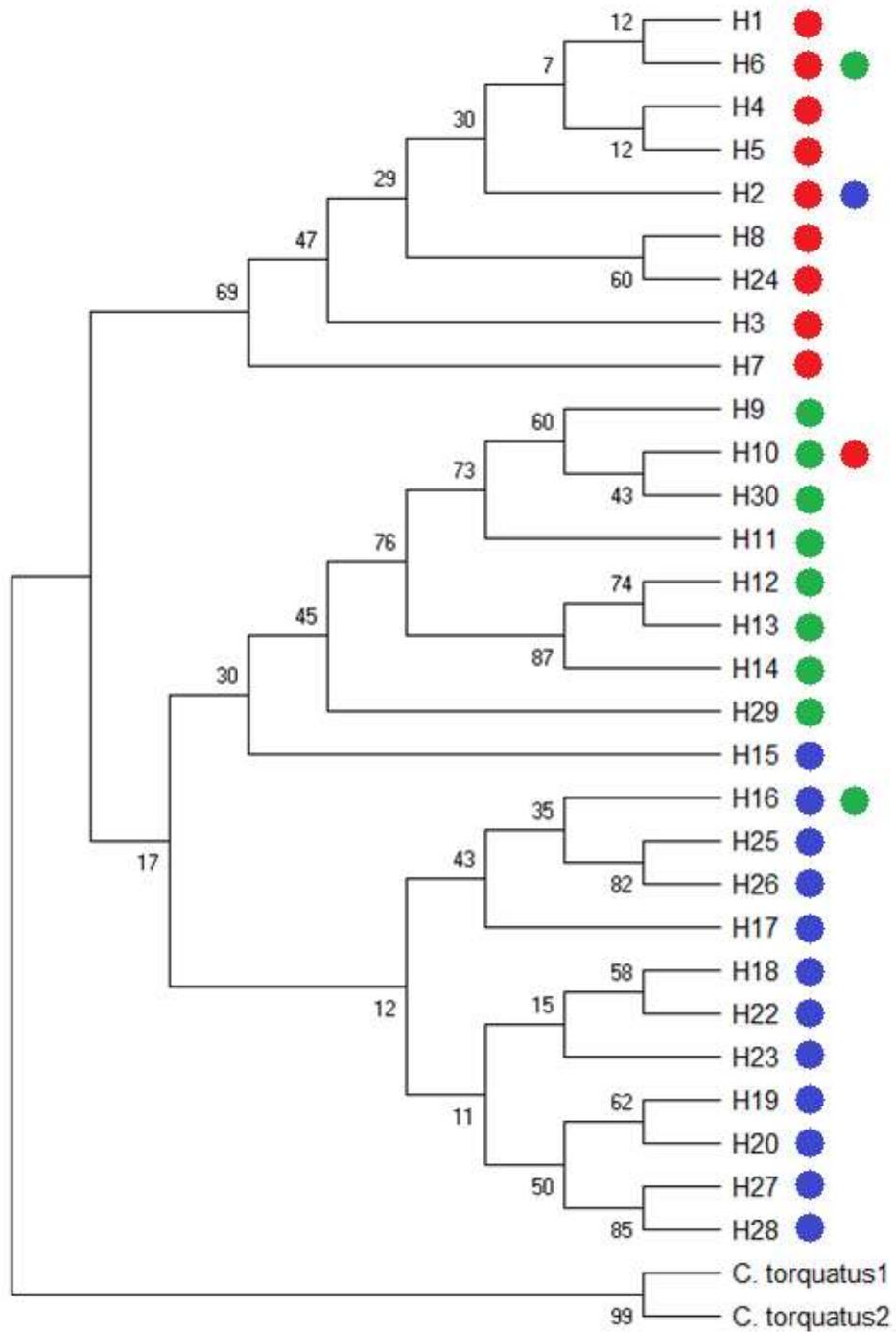


Figura 4ii. Análisis filogenético por método de Máxima Verosimilitud. Filogenia reconstruida por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo HKY. Se presenta el árbol de consenso de Bootstrap que fue inferido a partir de 2000 repeticiones. Los números junto a cada nodo indican su apoyo de bootstrap. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 70% de cobertura por sitio. Los colores de los círculos junto a cada haplotipo de *C. pearsoni* indican la región geográfica en donde fueron obtenidos, en color azul individuos de la región Centro-Oeste, en Verde de la región Centro-Sur y en rojo del a región Este.

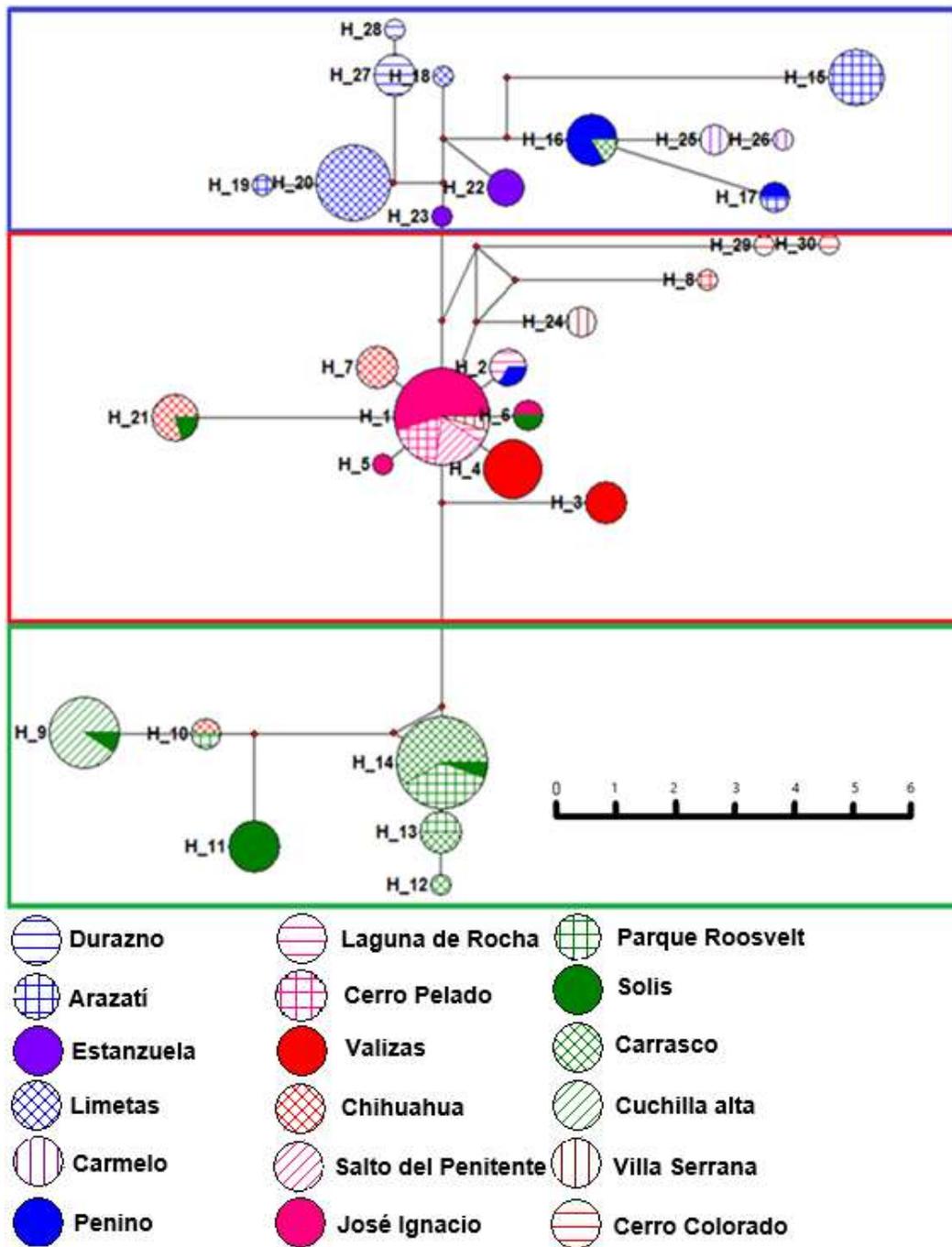


Figura 5. Esquema de las relaciones entre haplotipos de *C. pearsoni* realizada por median-joining. Cada círculo representa uno de los 30 haplotipos, el área de cada círculo es proporcional al número de individuos que presentaron cada haplotipo. La trama y color indica la población donde se presenta ese haplotipo. Los haplotipos con tonalidades azules corresponden a individuos colectados en La región Centro-Oeste de la distribución, los de tonalidades verdes en la región Centro-Sur y los de tonalidades rojas en la región Este. El largo de las líneas que unen los haplotipos es proporcional al número de diferencias nucleotídicas entre ellos y oscila entre 1 y 6, ver escala.

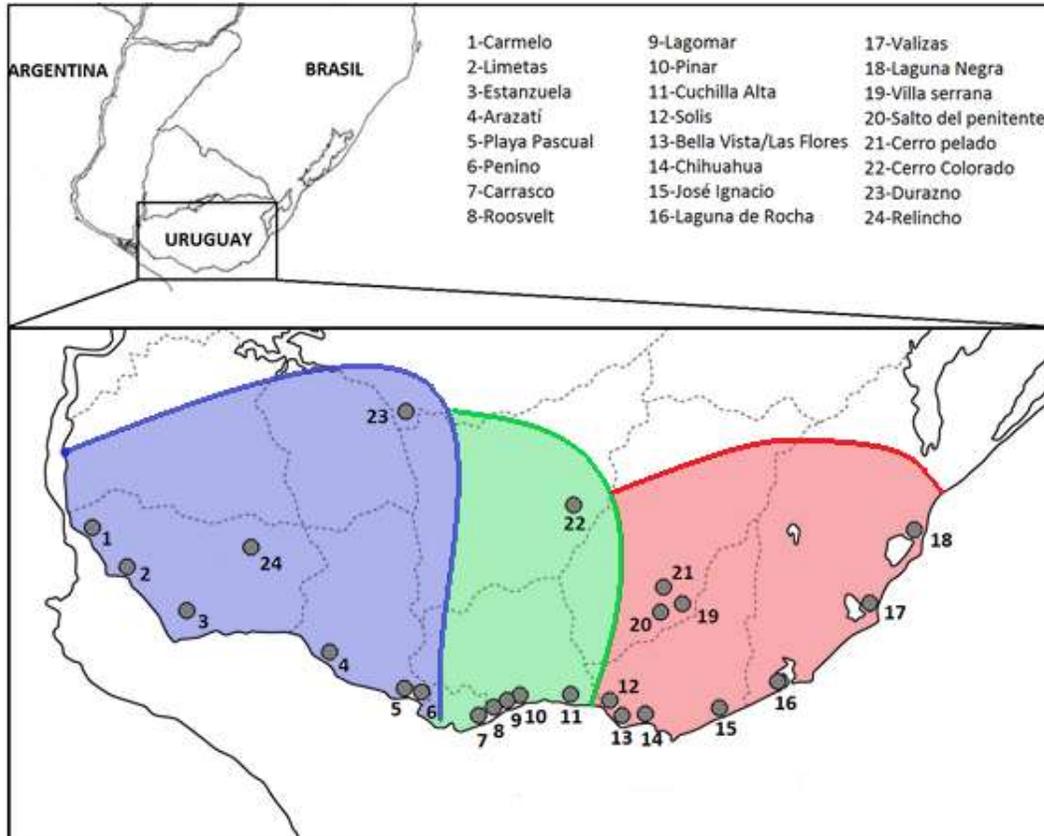


Figura 6. Ampliación de la distribución de *Ctenomys pearsoni*, Se muestran las 24 localidades analizadas en el estudio, se presenta la variación geográfica de la especie categorizada en tres regiones: La región Centro-Oeste (azul), la región Centro-Sur (verde) y la región Este (rojo).

Análisis morfométrico

El AVC resultó en la agrupación de individuos en tres nubes de puntos no superpuestas (Fig. 7). Las regresiones simples entre la variable “logaritmo del tamaño del centroide” con cada una de los dos ejes canónicos evidencian

independencia entre ellas (porcentaje de predicción de 2,01% y 0,02% para las variantes canónicas 1 y 2 respectivamente) (Fig. 8). Por lo tanto, la asignación de cada uno de los individuos a cada uno de los tres grupos es independiente del tamaño del cráneo de los mismos. Los valores de distancias de Mahalanobis entre los tres grupos resultantes del AVC junto con los valores de p del test de permutaciones se presentan en la Tabla 3, las medias de los tres grupos fueron significativamente diferentes. El análisis de discriminantes dio un resultado similar al AVC, para los tres pares de grupos de individuos separando a los individuos por grupo, no obstante, la función de reclasificación del Análisis Discriminante no los clasificó a todos en cada uno de los grupos asignados a priori. Ambos análisis se presentan en la figura 9.

Estas tres agrupaciones se corresponden con la ubicación geográfica de las poblaciones a las que pertenecen los individuos y son congruentes con la información aportada por la red de haplotipos y las reconstrucciones filogenéticas, separando los mismos tres grupos geográficos para la especie *Ctenomys pearsoni*; la región Centro-Oeste, la región Centro-Sur y la región Este (Fig. 6)

El Test de Mantel, que tiene como hipótesis nula que las matrices de variación genética y de variación morfológica no están correlacionadas, obtuvo un valor-p menor que el nivel de significancia $\alpha=0,05$, por lo que se debe rechazar esta hipótesis y aceptar la hipótesis alternativa de que las matrices están correlacionadas, el coeficiente de correlación entre ambas es de -0.864.

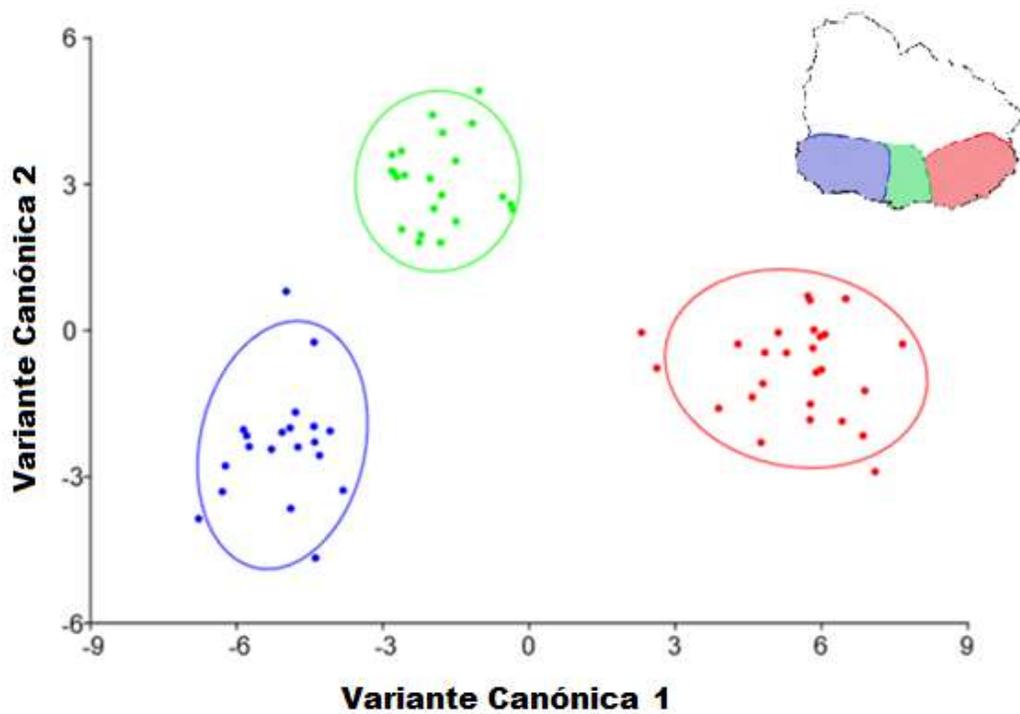


Figura 7. Análisis de variantes canónicas de los individuos de *Ctenomys pearsoni*, tomados en: Región Centro-Oeste (azul), Región Centro-Sur (verde), Región Este (Rojo). No se solapan las elipses que contienen a los individuos de cada región

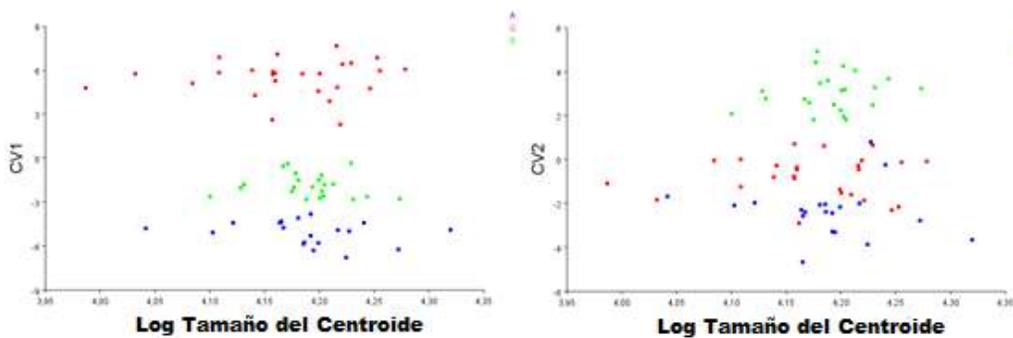


Figura 8. Regresiones simples entre la variable “logaritmo del tamaño del centroide” con cada una de las dos principales variantes canónica CV1 a la izquierda y CV2 a la derecha. Cada punto corresponde a un individuo y cada color identifica la región geográfica a la que pertenece cada individuo; Región Centro-Oeste (azul), Región Centro-Sur (verde), Región Este (Rojo). Las variables son independientes entre sí para ambos casos.

Tabla 3. Distancias de Mahalanobis (debajo de la diagonal) entre pares de grupos y p-valores del test de permutaciones (sobre la diagonal) con 10000 permutaciones de individuos entre grupos. El grupo "A" está integrado por individuos de la región Centro-Oeste de la distribución de la especie, El grupo "B" está integrado por individuos de la región Centro-sur de la distribución y el grupo "C" está integrado por individuos de la región Este de la distribución. Las distancias de Mahalanobis son significativamente diferentes entre todos los pares de grupos

Localidades	A	B	C
A	-	<.0001	<.0001
B	6,28	-	<.0001
C	10,65	8,29	-

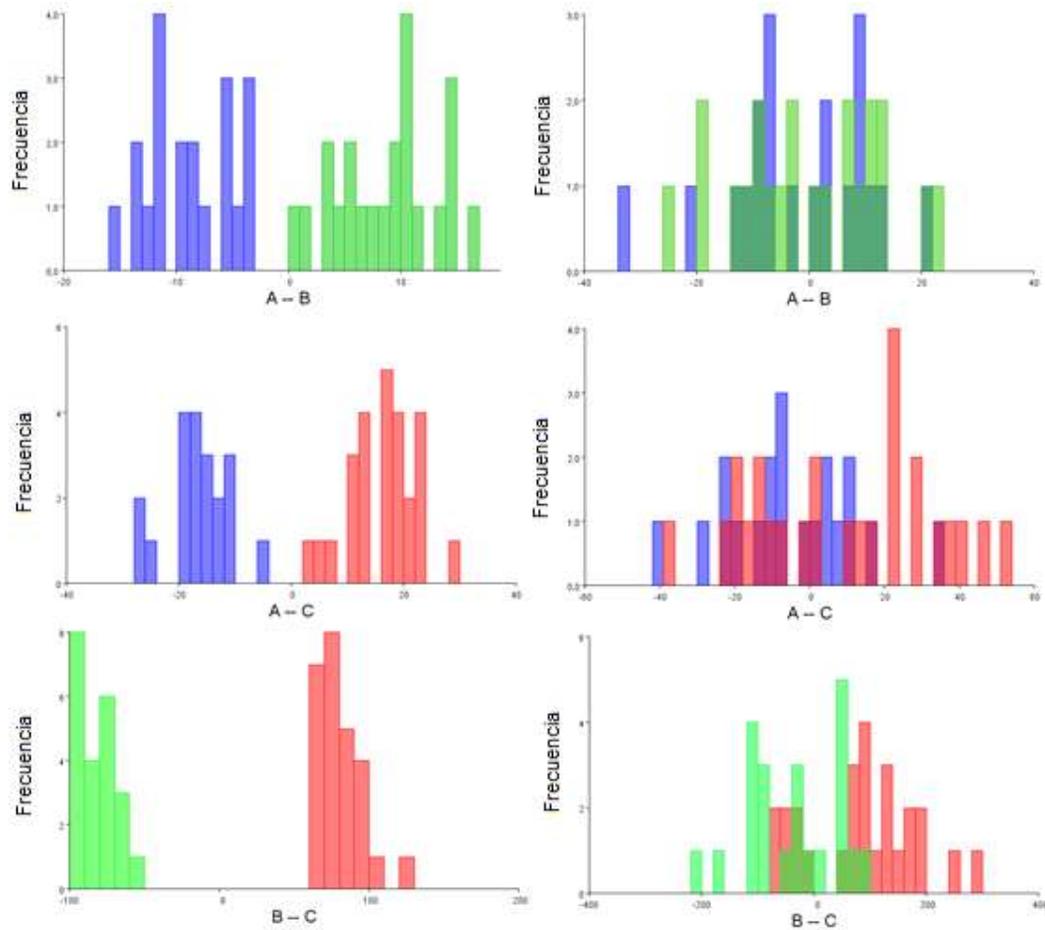


Figura 9. Resultados de análisis de discriminantes (figuras del lado izquierdo) y validación cruzada (figuras del lado derecho) para los tres pares de grupos de individuos. Se realizan todas las comparaciones posibles entre los tres grupos. Estas son: A-B (figuras superiores), A-C (figuras del medio) y B-C (figuras inferiores). El grupo "A" está integrado por individuos de la región Centro-Oeste de la distribución de la especie y sus individuos están presentados de color azul, El grupo "B" está integrado por individuos de la región Centro-sur de la distribución y sus individuos están presentados de color verde y el grupo "C" está integrado por individuos de la región Este de la distribución y sus individuos están presentados de color.

Discusión

Este trabajo releva la variación existente en poblaciones de tucu-tucu del en Uruguay (es decir todas menos las conocidas para *C. rionegrensis*) e intenta establecer los límites geográficos entre las especies *C. pearsoni* y *C. torquatus*. En este sentido, se amplía la distribución de *C. pearsoni* al menos 100 Km hacia al norte. Esta especie se pensaba que estaba restringida a la franja costera (Altuna y Lessa 1985, Bidau et al. 2008), sin embargo a partir de los resultados de este trabajo, se amplía su distribución hasta prácticamente la mitad del País sobre el Río Negro. *C. torquatus* entonces quedaría limitada al norte del Río Negro, y a los departamentos de Cerro Largo y Treinta y Tres. Este resultado es esperable si tenemos en cuenta que *C. torquatus* es compartida con Brasil, y otras poblaciones conocidas de *C. pearsoni* se encuentran en la provincia de Corrientes (Argentina), junto con el grupo hermano a la especie (complejo Corrientes) (Caraballo et al. 2016).

Es posible imaginar un escenario de colonización de la región por parte de *C. pearsoni* desde el oeste, tal vez en momentos donde el cauce del Río Uruguay y el delta del Paraná era diferente, producto de ingresiones marinas (Martínez y Del Río 2005). Estudios paleogeográficos de la región coinciden en postular que los lugares colonizados por *C. pearsoni* tienen una antigüedad no mayor a 5.000 años, al menos en áreas actuales donde el nivel del mar alcanzó su nivel máximo durante el Holoceno, aproximadamente 5 m por encima del actual (García- Rodríguez & Witkowski 2003, Cavallotto et al. 1999). Por lo tanto, la colonización de tales localidades por esta especie debió ser posterior, al menos en gran parte de la distribución actual de *C. pearsoni* en Uruguay. Luego se alcanzaría una estabilización y el patrón de diferenciación descrito para *C. pearsoni*.

Los datos de *C. pearsoni* en su conjunto apoyan los estudios anteriores (Tomasco y Lessa 2007), aunque ese trabajo se realizó con un número mucho menor de poblaciones y sin análisis de variación morfológica, en particular se apoya la idea de que estas poblaciones se encuentran diferenciándose en equilibrio entre la diferenciación por deriva genética local y los efectos

homogeneizadores del flujo génico. Evidencia de esto son los valores no significativamente diferentes de 0 del test de Tajima, así como la ausencia de monofilia en los clados formados por el marcador mitocondrial. Sin embargo, sería deseable ampliar el estudio con ejemplares de toda la distribución, incluyendo muestras argentinas de la especie.

Por otro lado, las poblaciones minuanas caen dentro del rango de variación genética y morfológica de *C. pearsoni*. Dada la posibilidad de que *C. brasiliensis*, proceda de Minas, Lavalleja. Sería necesario incluir muestras de tejido (ej. piel) del espécimen tipo de la especie *C. brasiliensis* (MNHN-Paris No1988-271) que se encuentra depositado en el Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), París, Francia, para en un futuro incluirlo en los análisis. Bi et al. (2013), entre otros, han mostrado que es posible trabajar con el ADN altamente degradado típico de muestras históricas, como las pieles de museo de principios del siglo XX. En caso de que se reconozcan como de la misma especie, y de acuerdo a la ley de prioridad del artículo veintitrés del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, se recomienda dar prioridad al nombre *C. brasiliensis*, que debiera reemplazar al de *C. pearsoni*, al menos para ejemplares de la localidad de Minas, y eventualmente para todas las poblaciones del complejo *pearsoni*.

El análisis de variación geográfica se realizó para *C. pearsoni*, la especie para la cual la mayor parte de la distribución es nacional. *C. torquatus*, en cambio, presenta la mayor parte de su distribución en Brasil, y se están realizando estudios similares en colaboración con investigadores de aquel país.

Los datos moleculares sugieren cierta diferenciación geográfica, mostrando tres grandes grupos, aunque no monofiléticos. Sin embargo, no permiten obtener conclusiones tajantes al respecto, porque si bien esbozan algunas agrupaciones que coinciden con trabajos previos (Tomasco y Lessa 2007), el apoyo estadístico de los nodos es bajo en cualquiera de los métodos usados. También lo refleja el bajo índice de consistencia de los árboles por máxima parsimonia (0,66). Esto es razonable, considerando que se pretende resolver la filogenia de 30 haplotipos con una secuencia de menos de 500 bases, y que dentro de ésta tenemos únicamente 33 sitios informativos. Sería ideal

estudiar la variación geográfica ampliando la información mitocondrial con más genes de ese genoma, y aún mejor con marcadores nucleares independientes. Los marcadores nucleares que han sido utilizados en el género, no han mostrado ser suficientemente informativos a nivel interespecífico (i.e.: intrones de Rhodopsina y Vimentina Castillo et al. 2005) y son en general monomórficos a nivel intraespecíficos a pesar de ser intrones. Por lo que es de esperar que tampoco sean útiles a este nivel de análisis. Pero sí existen marcadores autosómicos hipervariables como los STR (por su sigla en inglés “Short Tandem Repeat”, también llamados microsatélites en español) que ya han sido descritos para *Ctenomys haigi* (Lacey et al. 1999) y han mostrado resolver aspectos filogeográficos en otras especies de tucu-tucus como ser *C. sociabilis*, (Lacey 2001), *C. talarum* (Cutrera et al. 2005), *C. lami* (El Jundi y De Freitas 2004), *C. rionegrensis* (Wlasiuk et al. 2003), *C. chasiquensis* (Mora et al. 2017). Para *C. pearsoni* estos marcadores han sido optimizados y mostraron ser variables (Mannise et al. 2013), por lo que se estima que serían los marcadores a trabajar en el futuro para estudios filogeográficos en la especie.

A pesar de la falta de definición en el marcador mitocondrial utilizado, es interesante que los resultados genéticos obtenidos son consistentes con los resultados morfológicos. En ambos casos se rescatan tres grandes grupos, y dentro de cada uno de estos se encuentra al menos una población del interior del territorio, relativamente alejada de la costa. Incluso, que la matriz de variación molecular se correlacione negativamente con la matriz de variación morfológica, indica que a mayores valores de F_{st} entre grupos, menores son las distancias de Mahalanobis entre ellos. Este resultado, tendría una explicación estadística, ya que, dado que son únicamente tres los grupos que se comparan entre sí, son tres puntos en un plano que podrían correlacionarse (estar los tres puntos en una misma recta que los una) por azar. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en un estudio previo de la morfología del cráneo de la especie, que indica que, con la excepción de los cariomorfos de Solís, los restantes son morfológicamente indistinguibles (D’Anatro y D’Elía 2011). Sin embargo, en ese estudio se incluyeron solo seis localidades costeras de la especie, muchas de las cuales son próximas entre sí. Por otro lado, la diferenciación morfológica en la especie se había evaluado previamente a nivel del pene (Altuna y Lessa, 1985)

y la pelvis (D'Elía et al., 1992), pero no se encontraron diferencias significativas a este nivel.

Si bien los resultados son interesantes, sería necesario un muestreo más denso de poblaciones para delimitar con mayor precisión la distribución geográfica de cada grupo, y asociarlos a los diferentes accidentes geográficos para entender la historia de los mismos. Un abordaje igualmente interesante, que será abordado más adelante, es asociar estas diferencias con los cariotipos conocidos. Las diferencias moleculares entre los cariomorfos han sido abordadas por Tomasco y Lessa (2007), que realizaron un análisis filogeográfico y no encontraron correlación entre los patrones de variación cromosómica y molecular, de todos modos, en este estudio no tuvieron en cuenta las nuevas localidades aquí descritas, por lo que podría haber una correspondencia en el número fundamental entre las nuevas localidades y las descritas previamente.

Conclusiones

Se amplía la distribución de la especie *Ctenomys pearsoni*, desde la franja costera de Uruguay: Siendo el punto más Oeste, la localidad de Carmelo (Colonia). Internamente en el continente, en dirección Norte desde la costa, hasta tres puntos de referencia. En la Región Centro-Oeste de la distribución, hasta la localidad de Durazno (Durazno), en la región centro-Sur de la distribución, hasta la localidad de Cerro Colorado (Florida) y en la región Este de la distribución, hasta las localidades de Cerro Pelado, Salto del Penitente y Villa Serrana (Lavalleja).

Se muestra como la especie *Ctenomys pearsoni* está estructurada en tres grandes grupos, que se evidencian a nivel genético y morfológico y se corresponden geográficamente con las regiones Centro-Oeste, Centro-Sur y Este de la nueva distribución de la especie.

Perspectivas

Este trabajo intenta esclarecer los patrones de diferenciación poblacional en *C. pearsoni*. Sin embargo, este es un abordaje particular y una visión completa requiere de estudios complementarios. Menciono a continuación algunos de ellos puesto que suponen la continuidad natural de este trabajo.

En primer lugar, realizar un skyline plot (Drummond et al. 2005) agregando muestras argentinas, en un número importante. Esto permitiría hacer inferencias sobre las dinámicas de la población en el pasado. Sumado a esto, se podría realizar un análisis de variables ambientales para determinar si existen factores asociados a la distribución particular de cada una de las especies uruguayas.

Por otra parte, conociendo los patrones de variación morfológica y molecular, es importante realizar un análisis a otro nivel de organización. Una tercera vía sería la de analizar los cariotipos que ya fueron hechos en campo, cuyos resultados preliminares (no mostrados en la tesis) dan patrones de variación, dentro de la especie *C. pearsoni*, consistentes con los resultados de variación morfológica y molecular presentados en este trabajo.

Finalmente, sería interesante realizar un análisis similar para *C. torquatus*, lo que está en curso en una colaboración con investigadores de Brasil para estudiar variación conjunta de la especie *C. torquatus* en toda su distribución, que es mayormente brasilera, y no solamente en las localidades presentes en Uruguay.

Referencias bibliográficas

- Altuna CA. 1983. Sobre la estructura de las construcciones de *Ctenomys pearsoni* Lessa y Langguth, 1983 (Rodentia Octodontidae). *Revista de Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales de Montevideo (Uruguay)*. 3:70-72
- Altuna CA, Lessa EP. 1985. Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia:Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 66:483–488.
- Anderson S, Yates TL, Cook JA. 1987. Notes on Bolivian mammals 4: the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern lowlands. *American museum novitates*. 2891:1–19.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37–48.
- Bi K, Linderoth T, Vanderpool D, Good JM, Nielsen R, Moritz C. 2013. Unlocking the vault: Next-generation museum population genomics. *Molecular Ecology*. 22:6018–6032.
- Bidau CJ, Jiménez MD, Contreras JR. 1996. Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Mendeliana*. 12:25-37.
- Bidau CJ, Lessa EP, Ojeda R. 2008. *Ctenomys pearsoni*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2008: e.T5819A11735567. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T5819A11735567.en>. Downloaded on 19 November 2018.
- Bidau CJ. 2015. Family Ctenomyidae lesson, 1842. In: Patton, J.L., Pardinas, U.F., D'Elía, G. (Eds.), *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*. University of Chicago Press, pp. 818–877.
- Bidau CJ. 2018. *Ctenomys rionegrensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T136635A22193418. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T136635A22193418.en>. Downloaded on 19 November 2018.
- Blainville HMD. 1826. Sur une nouvelle espèce de Rongeur fouisseur du Brésil. *Bulletin de la Societe philomathique de Paris*. 3:62–64.
- Busch C, Antinuchi CD, del Valle JC, Kittlein, M, Malizia AI, Vassallo AI, & Zenuto RR. 2000. Population ecology of subterranean rodents. Life underground: the biology of subterranean rodents, 183-226.
- Caraballo D, Tomasco IH, Campo D, Rossi M. 2016. Phylogenetic relationships between tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) of the Corrientes group and the *C. Pearsoni* complex. *Mastozoología Neotropical*. 23:39-49.

- Carmarán A. 2018. Informe N° 250/2018. Administración de Parques Nacionales. Argentina. 4 pp.
- Castillo AH, Cortinas MN, Lessa EP. 2005. Rapid diversification of South American tuco tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intrón sequences. *Journal of Mammalian*. 86, 170–179
- Contreras JR, Berry LM. 1982. *Ctenomys Bonettoi*, una nueva especie de tucu-tucu procedente de la provincia del Chaco. República Argentina (Rodentia, Octodontidae). Diagnosis preliminar. *Historia Natural*. 14:123-124.
- Contreras JR, Berry LM. 1984. una nueva especie del género *Ctenomys* procedente de la provincia de Santa Fe (Rodentia, Ctenomyidae). *Libro de Resúmenes de las VII Jornadas Argentinas de Zoología*, Mar del Plata, Argentina. 75.
- Contreras JR, Bidau CJ. 1999. Líneas generales del panorama evolutivo de los roedores excavadores sudamericanos del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Ciencia Siglo XXI*, Buenos Aires, No. 1. Fundación Bartolomé Hidalgo, Buenos Aires, Argentina. 22 pp.
- Cook JA, Anderson S, Yates TL. 1990. Notes on Bolivian mammals. 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the eastern highlands. *American Museum Novitates*. 2980:1-27.
- Cook JA, Lessa, EP Harly. 2000. in *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*, E. A. Lacey, J. L. Patton, G. N. Cameron, Eds. (University of Chicago Press, Chicago, USA), pp. 332–369.
- Cutrera AP, Lacey EA, Busch C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology*. 14:2511-2523.
- D'Anatro A, D'Elía G. 2011. Incongruent patterns of morphological, molecular, and karyotypic variation among populations of *Ctenomys pearsoni* Lessa and Langguth, 1983 (Rodentia, Ctenomyidae). *Mammalian. biology*. 76:36–40.
- D'Elía G, Lessa EP, Cook JA. 1999. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): Evaluation of the mendocinus species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution*. 6:19–38.
- D'Elía G, Ubilla M, Altuna CA. 1992. Características discriminantes y morfofuncionales de la pelvis en poblaciones de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*. 7:41–42.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, 22(5), 1185-1192.

- El Jundi TA, De Freitas TR. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia:Ctenomyidae). *Hereditas* 140:18-23.
- Estevan I, Lacey EA, Tassinio B. 2016. Daily patterns of activity in free-living Rio Negro tuco-tucos (*Ctenomys rionegrensis*). *Mastozoología neotropical*. 23.
- Excoffier L, Lischer H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Fernandes FA, Fornel R, Cordeiro-Estrela P, Freitas TRO. 2009. Intra and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia-Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155:220–237.
- Fernandes FA, Fornel R, Freitas TRO. 2012. *Ctenomys brasiliensis* Blainville (Rodentia: Ctenomyidae): clarifying the geographic placement of the type species of the genus *Ctenomys*. *Zootaxa*. 3272:57-68.
- Fernandez MJG, Gaggiotti OE, Mirol, P. 2012. The evolution of a highly speciose group in a changing environment: are we witnessing speciation in the Iberá wetlands?. *Molecular ecology*.21(13), 3266-3282.
- Filatov DA. 2009. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*. 25:3189–3190.
- Freitas TRO, Lessa EP. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia - Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 65:637–642.
- Gava A, Freitas TRO. 2003. Inter and intra-specific hybridization in tucotucos (*Ctenomys*) from Brazilian Coastal Plains (Rodentia: Ctenomyidae). *Genetica* 119.
- Gava A, Freitas TRO. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* from southeastern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 85:1201–1206.
- Kiblicky P, Brum-Zorrilla N, Perez G, Saez FA. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana*. 2:85–93.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 11:353-357.

- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca S, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 86:6196-6200.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 35:1547-1549.
- Lacey EA. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity.* 86:628-637.
- Lacey EA, Braude SH, Wieczorek JR. 1997. Burrow Sharing by Colonial Tuco-Tucos (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy.* 78:556-562.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP, Matocq MD. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8:1754-1756.
- Langguth A, Abella A. 1970. Especies uruguayas del género *Ctenomys*. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo.* 10:1-27.
- Lichtenstein H. 1830. Darstellung neuer order wenig bekannter Säugethiere in Abbildungen. Berlin.
- Mallet J, Besansky N, Hahn MW. 2016. How reticulated are species?. *BioEssays*, 38(2):140-149.
- Mannise N, González S, Maldonado JE, Izquierdo G, Francescoli G, Cosse M. 2013. High levels of polymorphism found through cross-amplification of microsatellite loci in a *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Ctenomyidae) population. *Genetics and Molecular Research.* 12(2):887-891.
- Martinez S, Del Río C. 2005. Las Ingresiones marinas del Neógeno en el sur de EntreRíos (Argentina) y Litoral Oeste de Uruguay y su contenido malacológico. *Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino II.* 14:13–26.
- Massarini AI, Barros MA, Ortells MO, Reig OA. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyopite differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica.* 83:131-144.
- Miller SA, Dikes DD, Polesky HH. 1988. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 16:215.
- Mirol P, Gimenez MD, Searle JB, Bidau CJ, & Faulkes CG. 2010. Population and species boundaries in the South American subterranean rodent *Ctenomys* in a dynamic environment. *Biological Journal of the Linnean Society.* 100(2):368-383.
- Monteiro LR, dos Reis SF. 2000. Principios de Morfometria Geométrica. *Ribeirão Preto: Holos.* Pp. 188.

- Mora MS, Mapelli FJ, López A, Fernández MJG, Mirol, PM, Kittlein MJ. 2017. Landscape genetics in the subterranean rodent *Ctenomys "chasiquensis"* associated with highly disturbed habitats from the southeastern Pampas region, Argentina. *Genetica*, 145(6):575-591.
- Nevo E. 2007. Mosaic Evolution of Subterranean Mammals: Tinkering, Regression, Progression, and Global Convergence. In: Begall S., Burda H., Schleich C.E. (eds) *Subterranean Rodents*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Nevo E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10:269-308.
- Nevo E. Beiles A. Spradling T. 1999. Molecular evolution of cytochrome b of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies. *Isr. Journal of Molecular Evolution*. 49:215–226
- Novello A, Altuna CA. 2002. Cytogenetics and distribution of two new karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae) from southern Uruguay. *Mammalian Biology*. 67:188–192.
- Novello A, Cortinas MN, Suárez M, Musto H. 1996. Cytogenetic and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Chromosome Research*. 4:335–339.
- Novello AF, Lessa EP. 1986. G-band homology in two karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia Octodontidae) of Neotropical fossorial rodents. *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 51:378–380.
- Novello A, Lessa EP, Sambarino C, Monzón S. 1990. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 55:43–48.
- Opazo C. 2005. A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37:932–937.
- Ortells MO, Contreras JR, Reig OA. 1990. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia, Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica*, 82(3):189-201.
- Ortells MO. 1995. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 54:43–70
- Parada A, D'Elía G, Bidau C, Lessa EP. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 82(3):671–682.

- Parededa MG, Novello A. 2012. Chromosome mosaicism: extreme karyotype variation in the genus *Ctenomys* from Uruguay (Rodentia: Ctenomyidae). *Caryologia*. 65:251–257
- Reig OA, Bosch C, Contreras JR, Ortells MO. 1990. An overview of evolution, systematic, population biology, cytogenetics, and molecular biology in *Ctenomys*. En *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Level* (Nevo, E., and O. A. Reig, eds.). Pp. 71-96 *Progress in Clinical and Biological Research*, vol. 335. Wiley-Liss, New York, New York, USA.
- Reig OA, P Kiblsky. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma*. 28:211-244.
- Reig OA, Massarini AI, Ortells MO, Barros MA, Tiranti SI, Dyzenchouz FJ. 1992. New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia*. 56:603-624.
- Rosenberg MS, Subramanian S, Kumar S. 2003. Patterns of transitional mutation biases within and among mammalian genomes. *Molecular biology and evolution*. 20(6):988-993.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with athermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487–491.
- Sánchez T. 2012. Revisión de las especies del género *Ctenomys* (mammalia, Rodentia, Ctenomyidae) de la provincial de Tucuman, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 19(1).
- Sikes RS. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*. 97:663–688.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585-595.
- Tassino B, Estevan I, Garbero RP, Altesor P, Lacey EA. 2011. Space use by Río Negro tuco-tucos (*Ctenomys rionegrensis*): Excursions and spatial overlap. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 76:143-147.
- Thomas O. 1902. On mammals collected at Cruz del Eje, central Córdoba, by Mr. PO Simmons. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 7(9):237-245.
- Tomasco IH, Boulosa N, Hoffmann FG, Lessa EP. 2017. Molecular adaptive convergence in the α -globin gene in subterranean octodontid rodents. *Gene*. 628:275-280.
- Tomasco IH, Lessa EP. 2007. Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. En: Kelt DA, Lessa EP, Salazar-Bravo JA, Patton JL (eds). *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Publications in Zoology, pp 859–882.

- Upham NS, Patterson BD. 2012. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 63(2):417-29.
- Verzi DH. 2002. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología Neotropical*. 9:309-328.
- Verzi DH, Itatí Olivares A, Morgan CC. 2013. Phylogeny, evolutionary patterns and timescale of South American octodontoid rodents: The importance of recognising morphological differentiation in the fossil record. *Acta Palaeontologica Polonica*. 59(4):757-769.
- Villar S, Martínez S, Novello A. 2014. G-banding patterns of the genus *Ctenomys* from Uruguay (Rodentia Ctenomyidae): high karyotype variation but chromosome arm conservation, *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 67:2 178-184.
- Viscosi V, Cardini A. 2011. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS One*.
- Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP. 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*. 57:913-926.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD. 2012. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. *London: Academic Press*.

CAPÍTULO 2

APROXIMACIÓN TRANSCRIPÓMICA PARA ESTIMAR FILOGENIA E HIBRIDIZACIÓN EN LAS ESPECIES URUGUAYAS DE TUCU-TUCUS (*Ctenomys*).

Resumen

El rol potencial de la hibridación en la especiación es un tema en discusión actualmente, y es necesario el análisis de los sistemas que no son modelo, estos análisis son ahora posibles a partir de datos multilocus, dado que en la última década, los costos asociados a la generación de los mismos, han disminuido considerablemente. Los tuco-tucos (género *Ctenomys*) son roedores subterráneos endémicos de América del Sur y se consideran un modelo interesante de especiación rápida. Las relaciones filogenéticas entre las especies han sido difíciles de resolver y la presencia de híbridos está bien documentada por los métodos clásicos a pesar de las diferencias cromosómicas. Recientemente, un estudio morfométrico de la especie tipo del género, *C. brasiliensis*, encuentra que es morfológicamente intermedio entre *C. pearsoni* y *C. torquatus*, dos especies con distribuciones geográficas adyacentes. Para poner a prueba la hipótesis de hibridación entre estas dos especies, en este estudio se armaron de novo 8 transcriptomas de especímenes de las localidades tipo y se aplicó el estadístico D de Patterson. De los 3.93×10^6 reads obtenidos en promedio para cada transcriptoma, se ensamblaron 91.317 contigs en promedio y se anotó un promedio de 11.416 genes por transcriptoma, de los cuales 1.524 cumplieron con las condiciones de presentar: i) más del 85% de identidad, ii) más de 85 % de longitud de alineación / longitud de referencia contra *Cavia porcellus* y iii) estar presente en todas las muestras de *Ctenomys*. La filogenia obtenida muestra que las poblaciones de minas tienen mayor afinidad con *C. pearsoni* que con *C. torquatus*. Los valores del estadístico D en promedio entre todas las combinaciones probadas fueron de 0,07, lo cual rechaza la hipótesis de introgresión. Solamente un 10% de los marcadores fueron incongruentes, lo que refleja una proporción moderada de reparto diferencial de linajes.

Introducción

La especiación, o proceso de formación de nuevas especies, es un tema central en biología evolutiva, ya que en este proceso radica la génesis de biodiversidad. Históricamente la hibridización ha sido vista como un impedimento a la especiación (Barton 2001). Sin embargo, su rol en la especiación ha cambiado y es tema de debate actual (Abbott et al. 2013, Schumer 2014). Una de las mayores dificultades para su estudio es que la naturaleza híbrida de una especie era difícil de detectar, pero esto ha comenzado a cambiar recientemente gracias al desarrollo de nuevas técnicas de genética molecular. El análisis de grandes volúmenes de datos, como los generados por las nuevas técnicas de secuenciación masiva, ha comenzado a arrojar luz sobre las huellas de estos procesos en el genoma. De hecho, el número de especies híbridas descubiertas está aumentando en diferentes grupos de plantas y animales (Brennan et al. 2019, Kumar et al. 2017, Zinenko et al. 2016).

Los tucu-tucus son roedores subterráneos sudamericanos pertenecientes al género *Ctenomys*. Este género presenta al menos 70 especies descritas (Bidau 2015), formadas en un período no mayor a 3 millones de años (Verzi 2002, Verzi et al. 2013). Llama la atención la capacidad de especiación del género y cabe preguntarse qué mecanismos serían los responsables de la formación de tantas especies (Freitas 2006, Lessa et al. 2008). Los esfuerzos dirigidos a revelar el patrón macroevolutivo de diversificación de los tucu-tucus se han visto obstaculizados por la falta de comprensión de los límites de las especies y de las relaciones filogenéticas entre ellas (Parada et al. 2011).

En Uruguay han sido descritas 3 especies de tucu-tucu: *C. rionegrensis* (Langguth y Abella 1970), *C. torquatus* (Lichtenstein 1830) y *C. pearsoni* (Lessa y Langguth 1983). Sin embargo, recientemente se ha planteado que, en Minas, Departamento de Lavalleja, se encuentra la localidad de procedencia de *C. brasiliensis* (Blainville 1826) la especie tipo del género *Ctenomys*. La nominación *C. brasiliensis* hace referencia al país de procedencia en el momento de su

descripción en el año 1826, no al país de procedencia actual. La comparación mediante morfometría geométrica del cráneo del espécimen tipo de *C. brasiliensis* con los de otras especies del género, muestra que la forma del cráneo de *C. brasiliensis* se encuentra estrechamente relacionada a *C. torquatus* y *C. pearsoni*, no pudiéndose precisar a cuál de estas especies está particularmente asociada ya que se solapan en la mayor parte de sus caracteres morfológicos (Fernandes et al. 2012). Es probable entonces que *C. brasiliensis* sea un caso de hibridización entre ambas especies.

El abordaje multilocus, basado en miles de marcadores distribuidos por todo el genoma, habilitaría a resolver el estatus taxonómico de *C. brasiliensis*, lo que podría tener importantes consecuencias en la sistemática actual del género, y en particular de las especies uruguayas. De lo contrario, podría responder que grado de parentesco presentan las poblaciones minuanas, ahora posiblemente *C. brasiliensis*, con cada una de las especies uruguayas más próximas. Entre las formas de análisis de datos multilocus, recientemente se ha propuesto una aproximación basada en la Teoría del Coalescente para detectar grados de hibridización/parentesco entre tres poblaciones cercanamente emparentadas mediante la estimación del estadístico llamado “estadístico D de Patterson” (Green et al. 2008, Durand et al. 2011), basado en la frecuencia de asimetrías entre dos árboles de genes no congruentes en un árbol de tres poblaciones y una cuarta como grupo externo. Es decir, dada la filogenia de la figura 10, para los casos en los que el taxón P3 exhibe un alelo derivado B, y éste es compartido por sólo uno de los taxones restantes (P1 o P2), se evidencian historias de genes que son incongruentes con la filogenia dados los alelos A y B, los patrones mencionados serían (((AB)B)A) y (((BA)B)A).

La no congruencia entre árboles se generaría por diferentes escenarios demográficos, este estadístico es sensible a estas diferencias. Además, este estadístico tiene la ventaja de detectar hibridización en el pasado, contando sólo con muestras de las poblaciones actuales y un individuo de cada especie (Durand et al. 2011).

Esta prueba estadística utiliza sitios de nucleótidos bialélicos que se dividen en dos categorías: 'ABBA' y 'BABA', donde cada letra se refiere a un alelo

en cada uno de los cuatro taxones. "A" se refiere al alelo ancestral, y 'B' se refiere al alelo derivado (ver Figura 10). Ambas configuraciones, ABBA y BABA, deberían producirse con igual frecuencia en los casos en que no haya habido mezcla entre taxones y en las poblaciones ancestrales haya habido apareamientos al azar. Cuando estas configuraciones son contabilizadas en todo el genoma, un sesgo hacia sitios ABBA o sitios BABA indicarían un sesgo sistemático en los alelos compartidos entre taxones.

Si esto es causado por azar, las frecuencias de los patrones ABBA y BABA se espera que sea igual y el estadístico D no difiere de 0. Para los casos BBBA o AABA. P3 comparte estado con P1 y con P2, o no comparte con ninguno, no aumentando el número de asimetrías. siendo irrelevante para el uso del estadístico D. En los casos en que se encuentra un enriquecimiento de alelos compartidos entre taxones, la hibridación es una posible explicación.

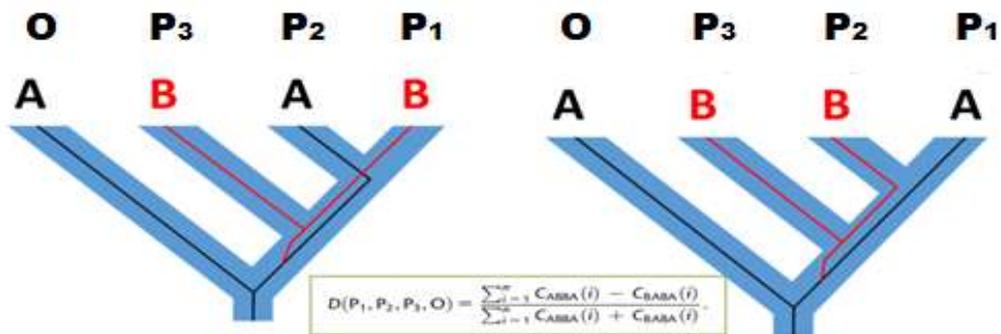


Figura10. Sitios bialélicos de Secuencias ortólogas alineadas. En ausencia de hibridación, estos patrones discordantes deberían ocurrir en la misma frecuencia, y D=0

Asumiendo una historia de divergencia sin hibridación posterior, los patrones discordantes de alelos respecto del árbol de las especies deberían ocurrir a la misma frecuencia. Si el árbol es (GE, (P3, (P1, P2))) (siendo Pi las diferentes poblaciones o especies que se comparan) y se quiere evaluar la posible hibridación entre P1 y P3, bajo la hipótesis de divergencia sin hibridación, los alelos derivados compartidos entre P1 y P3 serán igualmente frecuentes que los compartidos entre P2 y P3. Bajo la hipótesis de hibridación, habrá un sesgo

hacia mayor cantidad de SNPs derivados compartidos entre P1 y P3, comparado con P2 y P3.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el estatus taxonómico y el grado de parentesco de las poblaciones minuanas, posiblemente *C. brasiliensis*, con las dos especies más próximas desde el punto de vista morfológico y de ubicación geográfica, *C. pearsoni* y *C. torquatus*, utilizando a *C. rionegrensis* como grupo externo, mediante una aproximación multilocus, a partir de datos de transcriptomas.

Materiales y métodos

Preparación y elección de las muestras

Los muestreos se realizaron utilizando trampas Oneida Victor No. 0 en las localidades de: Minas (Villa Serrana 34°18.6' 64'' S, 55° 58.8' 69'' W, representando a *C. brasiliensis*), la localidad tipo de *C. pearsoni* (Limetas 34° 09' 00'' S, 58° 05' 30'' W), Sierra de Vaz (32° 36' 51'' S, 54° 06' 08'' W), localidad conocida de *C. torquatus* y la localidad tipo de *C. rionegrensis* (Las Cañas 33° 11.34' S, 58° 21.33' W) que fue utilizada como grupo externo.

Todos los procedimientos siguieron los lineamientos establecidos por American Society of Mammalogists para el uso de mamíferos silvestres en investigación (Sikes et al. 2016) y fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A., Uruguay).

De cada ejemplar se extrajeron distintos tejidos (i.e.: piel, hígado, páncreas, médula ósea, corazón, músculo, cerebro) que fueron conservados en Nitrógeno líquido en el campo y se conservaron luego en freezer de -80 °C, de la colección de tejidos del Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias.

Se prepararon y depositaron las pieles, esqueletos y muestras de hígado conservadas en etanol 95% en el Laboratorio de Evolución (Facultad de Ciencias, UdelaR), con número de voucher de EV1895 a EV2017. También se prepararon los cariotipos usando células de médula. Se administró una inyección subcutánea de levadura a los animales (Lee y Elder, 1988) 24 h antes de que los animales recibieran una inyección intraperitoneal de colchicina al 0,1% (0,1 ml / 100 g). Las preparaciones de cromosomas se obtuvieron después de la fijación con metanol-ácido acético (3:1). Estos preparados no fueron analizados en esta tesis y las células de médula ósea fijas se depositaron en el laboratorio de Evolución.

Laboratorio

A partir de dos ejemplares colectados por localidad se hicieron transcriptomas de una mezcla de 4 tejidos divergentes (piel, hígado, páncreas y

médula ósea). Para cada individuo, la extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy mini de Qiagen. La cantidad y pureza de ARN se evaluó con Agilent 2100 Bioanalyzer. Las extracciones se enviaron a la empresa Macrogen Inc. (<http://www.macrogen.com>) para la preparación de librerías y secuenciado con la plataforma Illumina HiSeq 2000.

Análisis

A partir de los transcriptomas crudos, en una primera instancia se corroboró la calidad de las secuencias. Para esto se utilizará el programa FastQC Report (Andrews 2010), que aporta diversos gráficos relacionados a la calidad y características generales de las bibliotecas. Posteriormente se realizó un filtrado de calidad utilizando la herramienta sickle (Joshi y Fass 2011), la cual utiliza ventanas deslizantes junto con umbrales de calidad y longitud para determinar cuándo la calidad es suficientemente baja para recortar los extremos de las lecturas o incluso para eliminar la lectura por completo.

El ensamblaje de secuencias *de novo* se implementó en el programa Trinity V2.2 (Grabherr et al. 2011), luego del ensamblaje se procedió a anotar los contigs resultantes mediante búsquedas con BLASTX, contra las bases de datos de proteínas no redundantes de vertebrados del NCBI y la base de datos del OMA browser que contiene las proteínas secuenciadas de las especies de vertebrados cuyos genomas han sido completamente secuenciados.

A partir de los transcriptos anotados, se identificaron genes únicos y ortólogos entre muestras. Se usó un protocolo conservador para seleccionar transcriptos para estimar el estadístico D, quedándose con aquellos que cumplieron con los siguientes atributos después de ejecutar el Blastn (parámetros predeterminados con e value establecido en 1×10^{-10}): i) más del 85% de identidad, ii) más de 85 % de longitud de alineación / longitud de referencia contra *Cavia porcellus* y iii) estar presente en todas las muestras de *Ctenomys*.

Los transcriptos resultantes fueron alineados usando Muscle V3.8 (Edgar 2004). Posteriormente fueron concatenados y utilizados para estimar la filogenia por métodos de máxima verosimilitud utilizando el modelo de Tamura 3

parámetros con distribución gama de la tasa de sustituciones entre sitios por ser este modelo de sustitución el que presentó el menor valor de BIC (Bayesian Information Criterion), por lo que era el modelo que más se ajustaba a los datos. Como opción de inferencia de árboles se escogió Nearest-Neighbor-Interchange implementados en MEGAX (Kumar et al. 2018).

Para poder identificar si entre estas tres especies hubo o no hibridación y el sentido de la misma, se analizó de forma individual cada transcripto para las combinaciones de las 8 muestras secuenciadas mediante el estadístico D. Para esto se utilizó el árbol resultante del análisis filogenético previsto en el paso anterior. El cálculo del estadístico D se basó exclusivamente en los transcriptos que presentaron un patrón no concordante (o ABBA o BABA) y se determina como:

$$D(P_1, P_2, P_3, O) = \frac{\sum(C_{ABBA}(i) - C_{BABA}(i))}{\sum(C_{ABBA}(i) + C_{BABA}(i))}$$

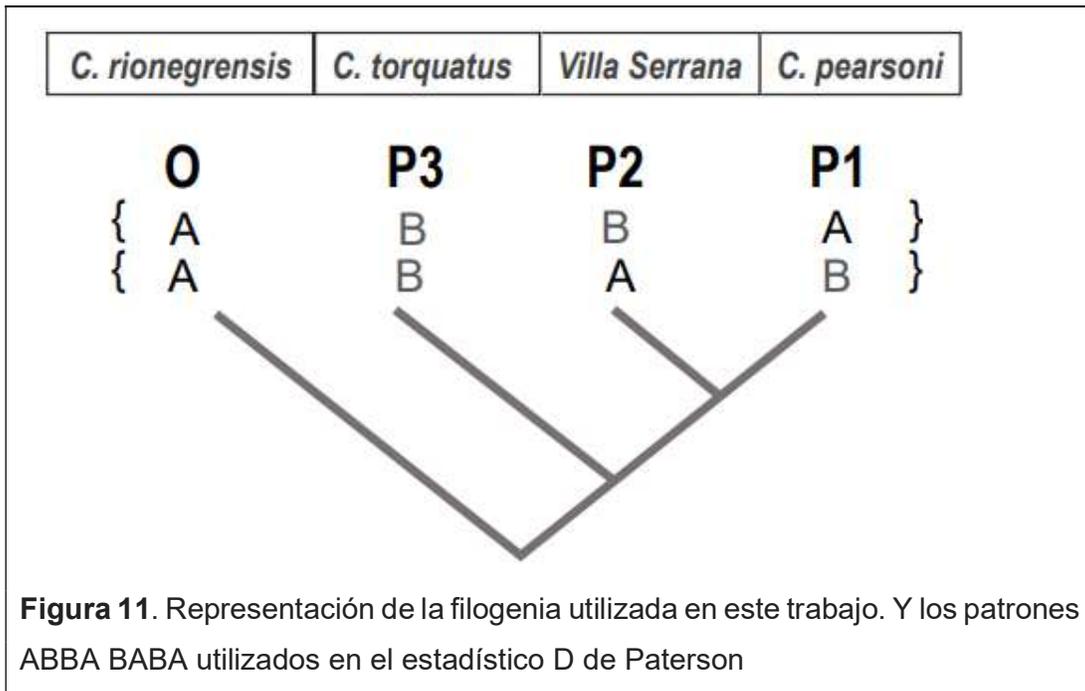
Donde $C_{ABBA}(i)$ y $C_{BABA}(i)$ son conteos que toman valores de 1 o 0, dependiendo de si el patrón especificado (ABBA o BABA) se observa o no en el sitio "i" de los transcriptos.

Para determinar si el valor de "D" difiere o no significativamente de 0, se realizó un test binomial de dos colas

Resultados

La descripción detallada de los transcriptomas y de los resultados de ensamblaje por especie y por localidad se muestra en la tabla 4. Se obtuvo un promedio de $3,9 \times 10^7$ lecturas de 101 pb con calidad mayor a Q24 para cada muestra. Los ensamblajes de los transcriptomas individuales tuvieron una media de 91.317 con un largo máximo de 13.697 pb. De estos, un promedio de 34.769 se anotó contra el ARNm de *Cavia porcellus*, identificando un promedio de 11.416 genes diferentes.

Un total de 1524 genes resultaron compartidos entre todas las especies de *Ctenomys* (incluida *C. sociabilis*), superaron el filtro cualitativo de alineamiento y fueron utilizados para estimar la topología general entre las especies. Con el concatenado de estos genes, que representan 1.754.367 codones, la topología obtenida (figura 11) sugiere una afinidad más cercana entre las poblaciones de Villa Serrana y *C. pearsoni*, que Villa Serrana con *C. torquatus* (probabilidad posterior igual a 1 en todos los nodos).



Se utilizó el mismo conjunto de 1.524 genes para aplicar el estadístico D de Patterson a las 16 combinaciones posibles de 4 ejemplares. Los valores para los estadísticos D de Patterson no difieren de 0 para ninguna combinación de individuos probada (tabla 5).

Tabla 4. Resultados generales de los transcriptomas para cada uno de los dos individuos de las cuatro localidades. CAVPO: genes anotados para *Cavia porcellus*

Especie	<i>C brasiliensis</i>		<i>C torquatus</i>		<i>C pearsoni</i>		<i>C rionegrensis</i>		
Localidad	Villa Serrana		Sierra de Vaz		Limetas		Las Cañas		
Vaucher ID	EV1911	EV1913	EV1924	EV1925	EV1938	EV1941	EV1996	EV1997	Promedio
N° de reads	35082800	41497116	36040796	47047595	40192620	35437684	41371116	38129740	39349933
N° de contigs	75359	88397	89301	87474	110249	74593	102711	102450	91317
Tamaño mínimo del contig (pb)	201	201	201	201	201	201	201	201	201
Tamaño máximo del contig (pb)	15263	16132	16120	11733	12711	8597	15209	13810	13697
N° de contigs blastearon CAVPO	29809	33900	36303	31875	40509	29613	38139	38004	34769
N° de genes anotados	11054	11317	11911	10699	11374	11479	11820	11670	11416

Tabla 5. Combinaciones de individuos utilizados, Cantidad de sitios ABBA y BABA para cada combinación, valor del estadístico D y P-valor asociado a cada combinación

Localidad/voucher VS/CP/CT/CR	ABBA	BABA	D	P-valor
1911/1938/1925/1996	16	11	0,19	0,097
1913/1941/1924/1997	19	16	0,09	0,118
1911/1941/1925/1996	14	13	0,04	0,149
1911/1938/1924/1996	17	18	-0,03	0,132
1911/1938/1925/1997	16	9	0,28	0,061
1913/1938/1925/1996	16	12	0,14	0,113
1913/1938/1925/1997	19	11	0,27	0,051
1913/1938/1924/1996	19	17	0,06	0,125
1913/1941/1925/1996	13	15	-0,07	0,139
1913/1941/1925/1997	15	16	-0,03	0,140
1911/1941/1924/1996	19	19	0,00	0,129
1911/1941/1924/1997	18	17	0,03	0,132
1911/1941/1925/1997	13	16	-0,10	0,126
1911/1938/1924/1997	17	15	0,06	0,132
1913/1938/1924/1997	19	13	0,19	0,081
1913/1941/1924/1996	18	19	-0,03	0,129

Discusión

La topología obtenida sugiere una afinidad más cercana entre las poblaciones de Villa Serrana y *C. pearsoni*, que Villa Serrana con *C. torquatus* confirmando los resultados obtenidos en el capítulo anterior a partir de un marcador mitocondrial y el estudio de la morfometría de cráneo. No se encontraron pruebas de hibridación para las poblaciones comparadas. Los resultados son robustos, sin valores de D significativamente diferentes de 0. En el caso de los valores marginales, cercanos a $p = 0.05$, estos parecen tener un patrón ambiguo y no congruente entre ellos. Los resultados sugieren la baja factibilidad de asumir un escenario de hibridación entre las poblaciones comparadas, por lo que la conclusión principal de este estudio sugeriría que no se produjo una hibridación previa entre *C. torquatus* con la población de Limetas (localidad tipo de *C. pearsoni*) o la población de Villa Serrana (posiblemente *C. brasiliensis*).

Sin embargo, podría existir una limitación de la técnica aplicada o del muestreo. Este estudio se basó en RNA-seq, El inconveniente de este enfoque es que la información sobre las regiones no transcritas (por ejemplo, intrones, regiones intergenes, etc.) que podrían ser informativas, se pierde. Además, estos análisis se realizaron con un enfoque bastante conservador. A parte de los filtros de identidad y de cobertura de secuencia, solo se consideraron transcritos que tuvieran 1 sitio ABBA o un sitio BABA, evitando que transcritos con múltiples sitios de uno u otro tipo tuvieran un mayor peso en el estadístico “D”, Con un enfoque más laxo, más sitios de ABBA BABA podrían haber sido obtenidos dándole más poder a la prueba estadística.

Es importante considerarla evaluación de un escenario de hibridación con un conjunto más amplio de poblaciones, no sólo las de las localidades tipo (como este estudio) que están ubicadas a distancias del orden de los cientos de kilómetros (es decir, desde Sierra de Vaz (*C. torquatus*) hasta Limetas (*C. pearsoni*) y a Villa Serrana (posible *C. brasiliensis*) hay 400 y 250 Km, respectivamente). Esto es importante por varias razones. Primero, porque la totalidad de la distribución geográfica y los límites de estas especies son aún

difusos (ver capítulo anterior) Además, la extensión de *C. torquatus* es en realidad muy amplia y si hubiera habido hibridación, esto debería haber ocurrido con las poblaciones cercanas al límite de la distribución. *C. torquatus* presenta la mayor distribución conocida entre las especies del género, presente en el centro y norte de Uruguay y sureste de Brasil (Fernandes et al., 2009; Freitas y Lessa, 1984). Sería más prometedor incluir en los análisis las poblaciones de *C. torquatus* más cerca de Villa Serrana.

También es importante mencionar que las especies del grupo *torquatus* (Parada et al., 2011; Slamovits et al., 2001), como las involucradas en este estudio, tienen una alta variación cromosómica. Entre ellos, *C. pearsoni* es el más variable en el grupo y en el género. Presenta siete cariomorfos conocidos ($2n = 70a, 70b, 70c, 56, 58, 64, 66$, revisados en Tomasco, 2003) que difieren entre ellos en los reordenamientos Robertsonianos (Freitas y Lessa, 1984; Villar et al., 2005) y han sido referidos como el "complejo de Pearsoni" (Altuna y Lessa, 1985). La población considerada en este estudio es Limetas, $2n = 70a$, un cariomorfo distribuido en toda la costa oeste de Uruguay (departamentos de Colonia y San José). La información sobre los alrededores de Villa Serrana, se remonta varios años atrás, cuando Kiblsky et al. (1977) reportaron poblaciones de Lavalleja (no exactamente Minas) con $2n = 64$, similar a las poblaciones del "complejo de pearsoni" de Maldonado (Villar, 2000), departamento al sur de Lavalleja. Investigaciones futuras deberían incluir estas poblaciones en los análisis.

Como se mencionó en la introducción, estos resultados proporcionan elementos sobre la sistemática de estas especies. En particular, los tucu-tucus de Villa Serrana tienen una mayor afinidad con *C. pearsoni* (figura 1), con lo cual la distribución geográfica de esta especie se extiende hacia el norte. Con los datos actuales no podemos concluir que las poblaciones cercanas a Minas, o en particular la de Villa Serrana, pertenezcan a *C. brasiliensis*.

Perspectivas

Los estudios adicionales, especialmente los análisis filogenéticos de los datos de ADN de especímenes de museos, serían esenciales para corroborar y para dilucidar el estatus taxonómico de las poblaciones de las Minas. Sería deseable realizar los contactos necesarios para conseguir muestras de tejido (ej. piel) del espécimen tipo de la especie *C. brasiliensis* (MNHN-Paris No1988-271) que se encuentra depositado en el Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), París, Francia, para en un futuro incluirlo en los análisis. Bi et al. (2013) ya han demostrado que es posible trabajar con el ADN altamente degradado típico de muestras históricas, como las pieles de museo de principios del siglo XX. En caso de que sean reconocidos como de la misma especie y de acuerdo con la ley de prioridad del artículo veintitrés del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, se recomienda dar prioridad al nombre *C. brasiliensis*, que debe reemplazar al de *C. pearsoni*, al menos para especímenes de Minas, y eventualmente para todas las poblaciones de la misma.

Relacionado al punto anterior está el hecho de que se desconoce dónde fue colectado el ejemplar tipo del género, una revisión preliminar de crónicas y de mapas en los años de colecta del género, sugieren que se denominaba "Región de las minas", del estado de San Pablo a un conjunto de minas de oro y otros minerales también conocidas como las minas de Paranápánema, identificar si en esa región hay registros para el género e identificar a que especie pertenecen y determinar qué relación tiene con las especies uruguayas podría ayudar a la reconstrucción de la historia del grupo,

También pueden desarrollar estudios más detallados sobre la morfología y los cariotipos que complementan los datos moleculares para comprender mejor la variación interna dentro del "complejo de Pearsoni" y *C. torquatus*, y para determinar mejor la relación entre *C. brasiliensis* y las especies del grupo torquatus presente en Uruguay. La pregunta más importante sigue siendo cuáles son los procesos que están generando diversidad, en este contexto de especiación híbrida y cambios cromosómicos, la identificación de número y forma de los cromosomas de las distintas poblaciones y especies, ayudaría a dar respuesta a esta pregunta

Referencias bibliográficas

- Abbott R, Albach D, Ansell S (y 36 coautores). 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*. 26(2):229-246.
- Altuna CA, Lessa EP. 1985. Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia:Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 66:483–488.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- [Barton N. 2001](#). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*. 10:551–568.
- Bi K, Linderoth T, Vanderpool D, Good JM, Nielsen R, Moritz C. 2013. Unlocking the vault: Next-generation museum population genomics. *Molecular Ecology*. 22:6018–6032.
- Blainville HMD. 1826. Sur une nouvelle espèce de Rongeur fouisseur du Brésil. *Bulletin de la Societe philomathique de Paris*. 3:62–64.
- Brennan AC, Hiscock SJ, Abbott RJ. 2019. Completing the hybridization triangle: the inheritance of genetic incompatibilities during homoploid hybrid speciation in ragworts (*Senecio*). *AoB Plants*, 11(1).
- Durand EY, Patterson N, Reich D, Slatkin M. 2011. Testing for ancient admixture between closely related populations. *Molecular Biology and Evolution*. 28(8):2239-52.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
- Fernandes FA, Fomel R, Cordeiro-Estrela P, Freitas TRO. 2009. Intra and interspecific skull variation in two sister species of the subterranean rodent genus *Ctenomys* (Rodentia-Ctenomyidae): coupling geometric morphometrics and chromosomal polymorphism. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 155:220–237
- Fernandes FA, Fornel R, Freitas TRO. 2012. *Ctenomys brasiliensis* Blainville (Rodentia: Ctenomyidae): clarifying the geographic placement of the type species of the genus *Ctenomys*. *Zootaxa*. 3272:57-68.
- Freitas TRO. 2006. Cytogenetics status of four *Ctenomys* species in the South of Brazil. *Genetica*. 126:227-235.
- Freitas TRO, Lessa EP. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 65:637–642.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, et al. 2011. Fulllength transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. 29: 644– 652.

Green RE, Malaspinas AS, Krause J, et al. (25 co-autores). 2008. A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell*. 134(3):416–426.

Joshi NA, Fass JN. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Disponible en: <https://github.com/najoshi/sickle>

Kibliskey P, Brum-Zorrilla N, Perez G, Saez FA. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana*. 2:85–93.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.

Kumar V, Lammers F, Bidon T, Pfenninger M, Kolter L, Nilsson MA, Janke A. 2017. The evolutionary history of bears is characterized by gene flow across species. *Scientific Reports*. 7: 46487.

Langguth A, Abella A. 1970. Especies uruguayas del género *Ctenomys*. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 10:1-27.

Lessa EP, Langguth A. 1983. *Ctenomyspearsoni*, n. sp. (Rodentia: Octodontidae), del Uruguay. *Resúmenes y Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales del Uruguay*. [3:86–88](#).

[Lessa EP, Vassallo AI, Verzi DH, Mora MS. 2008.](#) Evolution of morphological adaptations for digging in living and extinct ctenomyid and octodontid rodents. *Biological Journal of the Linnean Society*. 95: 267–283.

Lichtenstein H. 1830. Darstellung neuer order wenig bekannter Säugethiere in Abbildungen. Berlin.

Parada A, D'Elía G, Bidau C, Lessa E. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 82(3):671–682.

Reig OA, Busch C, Ortells MO, Contreras JR. 1990. An overview of evolution, systematics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pp. 71-96. En: *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels* (Nevo, E. y O.A. Reig, eds.). [Wiley-Liss](#)

- Schumer M, Rosenthal G, Andolfatto P. 2014. How common is homoploid hybrid speciation?. *Evolution*. 68(6):1553-1560.
- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP, Rossi MS. 2001. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Molecular Biology and Evolution*. 18:1708–1719.
- Tomasco IH. 2003. Filogeografía del tucu-tucu *Ctenomys pearsoni*: variación del ADN mitocondrial y sus implicancias para la diferenciación cromosómica. *Mastozoología Neotropical*. 11:122
- Verzi DH. 2002. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología Neotropical*. 9:309-328.
- Verzi DH, Itatí Olivares A, Morgan CC. 2013. Phylogeny, evolutionary patterns and timescale of South American octodontoid rodents: The importance of recognising morphological differentiation in the fossil record. *Acta Palaeontologica Polonica*. Disponible online, doi: <http://dx.doi.org/10.4202/>
- Villar, S., 2000. Caracterización citogenética y alozímica de poblaciones de *Ctenomys* del Uruguay.
- Villar S, Martínez-López W, Folle G, Novello A. 2005. Cytogenetic analysis of different *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) species from Uruguay using G-banding. *Mammalian Biology*. 70:255–260.
- Zinenko O, Sovic M, Joger U, Gibbs HL. 2016. Hybrid origin of European Vipers (*Vipera magnifica* and *Vipera orlovi*) from the Caucasus determined using genomic scale DNA markers. *BMC Evolutionary Biology*. 16:76.