TESIS DE MAESTRIA PEDECIBA AREA BIOLOGÍA

Filogeografía del tucu-tucu *Ctenomys pearsoni*: variación del ADN mitocondrial y sus implicancias para la diferenciación cromosómica.

Ivanna H. Tomasco

Octubre, 2003.

RESUMEN

Los "tucu-tucus" son roedores subterráneos sudaméricanos pertenecientes al género Ctenomys. El mismo, presenta más de 60 especies vivientes y exhibe uno de los mayores grados de variación cromosómica reportado para mamíferos. Esta variabilidad se explica tradicionalmente proponiendo que la estructura poblacional característica de Ctenomys, que forma pequeños demes aislados, promovería la fijación por deriva de rearreglos cromosómicos parcialmente deletéreos en heterocigosis, propiciando así también la especiación. En este trabajo se pretende poner a prueba esta hipótesis en la especie uruguaya C. pearsoni. La misma es un modelo particularmente interesante porque presenta una variabilidad cromosómica extraordinariamente alta que no se corresponde con otras variables estudiadas, conociéndose actualmente siete cariotipos diferentes. Para ésto se analizó la variabilidad en la secuencia de la Región de Control del ADN mitocondrial en 98 ejemplares provenientes de 11 poblaciones cubriendo toda su distribución. Se encontró que todos los cariomorfos conocidos son polifiléticos. La polifila del ADN mitocondrial en presencia de diferencias cariotípicas fijas, permite rechazar la hipóteis antes mencionada y hace invocar algún mecanismo que promueva la fijación de ciertos rearreglos cromosómicos, como selección o deriva meiótica. Evidencia complementaria suguiere, además, una estabilidad prolongada de estas poblaciones en su conformación actual, ya que: i) las poblaciones están equilibrio y existe un patrón de aislamiento por distancia y *ii*) la variación genética está igualmente repartida dentro de las poblaciones, entre poblaciones de igual cariomorfo y entre cariomorfos. Finalmente, las estimaciones de flujo génico entre pares de poblaciones de un extremo de la distribución son mayores al resto, sugiriendo una colonización regional más recientemente sin alterar el equilibrio general.

AGRADECIMIENTOS

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

a Enrique Lessa, gran orientador e investigador y excelente persona, por aceptarme como tesista en su Laboratorio y por apostar en todo momento al desarrollo personal de todos los quienes tenemos el gusto de conocerlo.

a Guillermo D´Elía, quien promovió este trabajo desde su inicio, aportando la mayor parte de la bibliografía utilizada, sugerencias varias y tiempo para la discusión y reflexión sobre el mismo.

a todos los compañeros del Laboratorio de Evolución, especialmente a Vicky por alentar continuamente mis iniciativas y a Gabriela Wlasiuk, amiga y compañera de camino incluso en la distancia, quien con la excusa de su partida fue un catalizador para la rápida finalización de este trabajo.

a los compañeros de la Sección Etología, en especial a Ciro, Graciela, Bettina y Marila, que siguieron de cerca mi trabajo y con quienes siempre pude contar como consejeros, especialistas calmar nervios y ansiedades.

a mis padres, mis principales referentes y a quienes les debo todo lo que soy y alcanzo en cada etapa de mi vida

a Jorge Bruzzese, que desde que lo conozco ha sido el complemento que necesito para lograr mis metas

a muchos otros familiares y amigos, quienes supieron comprender mis ausencias y no dejaron de alentar mis iniciativas y festejar mis logros.

Asimismo, agradezco a los miembros del tribunal por aceptar ser parte del mismo y por la discusión enriquecedora de la tesis, así como a PEDECIBA y CSIC por la financiación de este trabajo y de otras actividades relacionadas con mi formación académica.

INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto en el que se realiza el estudio

La especiación, o proceso de formación de nuevas especies, es desde mediados del siglo XX un tema central en la Biología Evolutiva, donde se conjugan los procesos micro y macroevolutivos (Berlocher 1998). La observación de diferencias cariotípicas en especies relacionadas en varios grupos de organismos condujo a algunos autores a plantear que los cambios cromosómicos ocurren frecuentemente en asociación con el proceso de especiación, pudiendo incluso ser los agentes causales del mismo (White 1968). Clásicamente, ésta ocurriría cuando en una población se fija uno o más rearreglos cromosómicos inicialmente con heterosis negativa, es decir que reducen la eficacia darwiniana de los individuos que los presentan en hererocigosis, generando finalmente aislamiento reproductivo entre formas cromosómicas. A este modo de especiación, en donde los cambios cromosómicos juegan un rol central en la misma se le ha denominado en un sentido amplio *especiación cromosómica* (King 1993).

En general, los modelos de especiación cromosómica han tenido poco apoyo teórico, debido a que: *i*) las mutaciones que reducen significativamente la eficacia darwiniana pueden ser fijadas sólo por el efecto de la deriva en poblaciones pequeñas, aisladas y con alta endocría (Reisenberg & Livingstone 2003, Sites & Moritz 1987) y *ii*) el efecto de los rearreglos cromosómicos sobre la eficacia darwiniana es impredecible y varía notablemente entre plantas y animales (Spirito 1998 y citas allí). Sin embargo, se han postulado muchos ejemplos en los cuales es evidente la primacía de los cambios cromosómicos en el proceso de especiación (compilados por King 1993). El debate sobre la importancia relativa de esta modalidad de formación de especies permanece abierto. Recientemente, se han propuesto modelos nuevos y originales que sortean las dificultades principales de los modelos clásicos (Rieseberg 2001, Spirito 1998), y sus predicciones parecen cumplirse para algunos casos (Navarro & Barton 2003).

1.2 El género Ctenomys

Los "tucu-tucus" son roedores subterráneos pertenecientes al género *Ctenomys,* De Blainville 1826 (familia Ctenomyidae, suborden Hystricognathi; Woods 1982). El mismo, consta aproximadamente 60 especies vivientes reconocidas distribuidas de forma endémica en las áreas abiertas de América del Sur, entre los 10° y 54° de latitud sur (Contreras & Bidau 1999), y desde el nivel del mar hasta más de 4.000 m de altura en la región Andina (Reig *et al.* 1990). Esta gran diversidad se alcanzó en un corto período de tiempo, unos 1,8 millones de años (Cook *et al.* 2000, Lessa & Cook 1998, Reig *et al.* 1990), lo que muchos autores denominan como fenómeno de cladogénesis explosiva (Reig 1970, 1989, Reig & Kiblisky 1969, Reig *et al.* 1990).

El género en su conjunto, así como muchas de sus especies, han despertado gran interés debido a su alta variación cariotípica intra e interespecífica, exhibiendo uno de los mayores grados de variación cromosómica reportado para un género de mamíferos (Cook *et al.* 1990). Sus números diploide y fundamental varían de 10 (*C. steeinbachi,* Anderson *et al.* 1987) a 70 (*C. dorbignyi* Contreras & De Contreras 1984, *C pearsoni* Lessa & Langguth 1983) y de 16 a 84, respectivamente (Cook *et al.* 1990, Reig & Kiblisky 1969, Reig *et al.* 1990). Además, las especies se comportan diferente con respecto a los tipos de reordenamientos cromosómicos y a la cantidad y distribución de la heterocromatina (Reig *et al.* 1992), así como frente a la variación en el número diploide en sí (Slamovits *et al.* 2001). Un resumen de las especies con polimorfismos en el número diploide se encuentra en la tabla 1, generalmente el número fundamental es aún más variable. Para algunas especies se ha reportado incluso variación cariotípica dentro de un mismo individuo (para *C. talarum* García *et al.* 2000, *C. porteousi* Massarini *et al.* 1991 y *C. pearsoni* Novello com. pers.), debido posiblemente a un mecanismo postcigótico de segregación somática (García *et al.* 2000).

Nombre de la	Descripción de la	Número	Descripción del
especie	especie	diploide	polimorfismo
C. pearsoni	Lessa & Langguth 1983	70,56,58,64,66	Ver texto
C. toquatus	Lichtenstein 1830	44, 46	Freitas & Lessa 1984
C. boliviensis	Waterhouse 1848	36, 42, 44	Anderson <i>et al</i> . 1987
C. minutus	Nehring 1887	42, 45 al 50	Freitas 1997
C. perrensi	Thomas 1896	48, 50	Ortells <i>et al.</i> 1990
C. lami	Freitas 2001	54 al 58	Freitas 2001
C. talarum	Thomas 1898	48, 49, 50	Massarini <i>et al.</i> , 1995

TABLA 1. Variación en el número diploide en especies del género Ctenomys

La forma de vida de estos animales, presenta una gran convergencia adaptativa con otros roedores subterráneos (Busch *et al.* 2000, Nevo 1979). Son mayoritariamente solitarios, habitan cada uno en una única cueva y forman poblaciones de baja densidad (Lacey *et al.* 2000). Se cree que la heterogeneidad en la distribución de los recursos y hábitat adecuados para su supervivencia es la causa de la distribución en parches de sus poblaciones (Busch et al. 2000), que en general no se solapan (Lessa 2000, Pearson 1959, Steinberg & Patton 2000). Es por ello que los roedores subterráneos han sido tomados clásicamente como modelos de especiación cromosómica (Reig & Kiblisky 1969), porque en principio cumplen las condiciones esperadas para que ésta sea posible. La formación de pequeños demes aislados, permitiría que deriva genética se sobreponga a los efectos de otros procesos evolutivos como la selección y el flujo génico, y se fijen rearreglos cromosómicos parcialmente deletéreos en heterocigosis.

Se ha propuesto que la estructura poblacional de los tucu-tucus, podría explicar su gran variabilidad cromosómica, y propiciar en gran medida la especiación del genero (Contreras & Bidau 1999, Nevo 1979, Reig & Kiblisky 1969). El género *Ctenomys* representaría para algunos autores uno de los mejores argumentos para la especiación rápida mediada por cambios cromosómicos dentro de la clase Mammalia (Massarini *et al.* 1991, Bidau *et al.* 1996, Contreras & Bidau 1999, entre otros).

Sin embargo, a pesar de que se ha avanzado bastante en el conocimiento de la variación cariotípica, poco se sabe sobre los mecanismos de diferenciación en el género (Lessa 2000). Se han realizado trabajos que intentan inferir los mecanismos de diferenciación a partir de la huella que dejan los procesos demográficos a nivel molecular. En general la variación alozímica encontrada en especies del género muestra patrones de variación interpoblacional muy diversos (Sage *et al.* 1986), no relacionados con las diferencias cromosómicas ni con las distancias geográficas (Gallardo & Kölher 1992). Se encontraron niveles de variación bajos (Gallardo & Küller 1992, Gallardo *et al.* 1995) y considerable estructuración geográfica (Gallardo & Palma 1992) en algunas especies, y lo contrario para otras (Apfelbaum *et al.* 1991, D´Elía *et al.* 1998, Gallardo & Palma 1992, Ortells & Barrantes 1994, Villar 2000). Sin embargo, las alozimas tienen un poder de resolución limitado y pueden estar bajo presiones de selección,

Comparaciones de secuencias del gen del citocromo b mitocondrial se han realizado en pocos casos, fundamentalmente para resolver las relaciones filogenéticas dentro del género (D'Elía *et al.* 1999, Lessa & Cook 1998, Mascheretti *et al.* 2000). Para el mismo marcador, especies argentinas de la provincia de Corrientes (*C. dorbignyi, C. roigi, C. perrensi y Ctenomys* sp.) mostraron ser poli y parafiléticas (Giménez *et al.* 2002), confirmando la diferenciación reciente de las mismas y una sustancial acumulación de diferencias a nivel cariotípico. En *C. rionegrensis*, una especie uruguaya de distribución muy restringida y monomórfica a nivel cariotípico, el conjunto de datos alozímicos, de secuencias del gen del citocromo b (D'Elía 1996) y loci microsatelitaes (Wlasiuk *et al.* 2003), permitieron inferir que ha sufrido un proceso de colonización y expansión poblacional reciente, a partir de una población ancestral de tamaño reducido.

Los tucu-tucus presentan interés adicional en la Biología Evolutiva, debido a que han sido considerados como un paradigma de selección de especies, contrastando su diversidad con el género monoespecífico relacionado *Spalacopus*, también subterráneo pero con una estructura poblacional completamente diferente (Vrba y Gould, 1986). Como se discutió anteriormente presentarían características emergentes propias del nivel de especies, que les brindarían mayores posibilidades de especiación (Vrba 1989). No obstante, trabajos recientes muestran que no son significativamente más diversos que los octodontinos (su grupo hermano) y que sería necesaria una revisión de la sistemática general de estos grupos para una mejor comparación (Cook & Lessa 1998).

1.3 *C. pearsoni* Lessa & Langguth 1983

Actualmente se reconocen tres especies del género *Ctenomys* en Uruguay: *C. torquatus* Lichtenstein 1830, *C. rionegrensis* Langguth & Abella 1970a y *C. pearsoni* Lessa & Langguth 1983. Desde su descripción *C. pearsoni*, ha sido la especie de tucutucu más estudiada en nuestro país. Es un modelo particularmente interesante para poner a prueba los modelos de especiación cromosómica clásicos, ya que presenta una variabilidad cromosómica extraordinariamente alta estructurada geográficamente, que no se corresponde con la variabilidad morfológica ni etológica estudiada hasta el momento (ver mas adelante).



FIGURA 1. Foto de un ejemplar de C. pearsoni del Departamento de Maldonado

C. pearsoni se distribuye en Uruguay sobre la costa del Río de la Plata, entre la margen sur del río San Salvador hasta la margen oeste del río Santa Lucía, existiendo también algunas poblaciones reportadas en Argentina (García *et al.* 2000). Su localidad típica se conoce con el nombre de Limetas, sobre el arroyo del mismo nombre, a 25 Km al sureste de Carmelo, Dpto. de Colonia. Se encuentra en hábitats variados: generalmente en terrenos arenosos aunque también se lo halla en suelos de tierra negra como en la localidad de Limetas (Langguth & Abella 1970b). Se caracterizan por habitar en forma permanente, extensos sistemas de galerías subterráneas, que permanecen cerrados al exterior por tapones de material removido del suelo (Altuna 1983).

Morfológicamente es semejante a *C. torquatus* Lichtenstein 1830, otra especie de distribución más amplia presente en el Uruguay que puede ser considerada como su especie hermana filogenéticamente según los estudios realizados hasta el momento (D'Elía *et al.* 1999, Slamovits *et al.* 2001). Además de las características discriminantes que permiten diferenciarla de otras especies del género propuestas en su descripción, fundamentalmente basadas en características del cráneo y su cariotipo (Lessa & Langguth 1983), deben incluirse otras encontradas posteriormente. Característico de su morfología peniana es la presencia de un bulbo espinoso y un número variable de estilos en el saco uretral, y la punta del báculum es redondeada (Altuna & Lessa 1985). Por otro lado, características pélvicas, como la profundidad relativa de la fosa glútea e iliaca, el grado de desarrollo de los procesos iliacos, la prominencia de las tuberosidades isquiáticas, la orientación de la rama descendente del isquion, y la forma y tamaño relativo del foramen obturador, permiten diferenciar a *C. pearsoni* de otras especies presentes un Uruguay (D'Elía *et al.* 1992, Ubilla & Altuna 1987).

Kiblisky *et al.* (1977) estudiaron el cariotipo de *C. pearsoni* en ejemplares de las localidades de Limetas, Playa Pascual y barra del río Santa Lucía (Departamentos de Colonia y San José), encontrando un complemento cromosómico idéntico en las tres localidades con un número diploide (2n) de 70 (de aquí en adelante referido como 2n=70a) y un número fundamental (NF) de 80. Para otra población próxima a Playa Pascual, Autódromo Nacional, se ha reportado el mismo cariotipo (Novello & Lessa 1986, Novello *et al.* 1990 y 1996, Villar 2000) y variación intrapoblacional, encontrándose una variante con 2n=68 y NF=80 en 9 ejemplares estudiados (Novello *et al.* 1990).

Sobre la costa platense y la costa atlántica al este del río Santa Lucía, existen otras poblaciones del género que comparten caracteres morfológicos con *C. pearsoni*, aunque se diferencian de esta especie por su cariotipo (Lessa & Langguth 1983, Novello & Altuna 2002, Novello & Lessa 1986, Novello *et al.* 1990 y 1996, Villar 2000). Todas estas formas "pearsonoides" comparten las características morfológicas del cráneo propuestas para *C. pearsoni* (Lessa & Langguth 1983, ver también Langguth & Abella 1970), tipo de espermatozoide (Ubilla y Altuna 1987) e igual morfología peniana (Altuna & Lessa 1985) y pélvica (D´Elía *et al.* 1992, Ubilla & Altuna 1987). Debido a estas similitudes se ha llamado "complejo *Ctenomys pearsoni*" (Altuna & Lessa 1985) al conjunto de poblaciones del litoral sur del Uruguay, al este del río Santa Lucía afines morfológicamente a *C. pearsoni*. Desde este momento en adelante, este trabajo incluirá en el nombre *C. pearsoni* a la forma típica y al antedicho "complejo *C. pearsoni*".

Diversos trabajos realizados hasta el momento, dan cuenta de la gran variación cromosómica presente en *C. pearsoni* (Kibliski *el al.* 1977, Novello & Altuna 2002, Novello & Lessa 1986, Novello *et al.* 1990 y 1996, Villar 2000). Esta información se resume en la tabla 2. La primer localidad al este del río Santa Lucía y única representante del Departamento de Montevideo es Carrasco, donde ha sido reportada gran variación cariotípica intrapoblacional (Novello & Lessa 1986, Novello *et al.* 1990). El cariotipo modal presenta un 2n=56 y 2N=78. El resto de los cariotipos conocidos presentan el mismo número diploide pero diferente número fundamental NF= 77 y 79 (debido probablemente a inversiones pericéntricas), o simplemente variaciones con igual 2n y NF pero no idénticos en el patrón de bandeo (debidos posiblemente a corrimientos de heterocromatina).

Del Departamento de Canelones se han cariotipado las poblaciones de Parque Roosevelt, Lagomar, Los Titanes, Cuchilla Alta, Santa Ana, Balneario Argentino y Jaureguiberry. Se caracterizan por un 2n=58 y NF=78, en principio sin variación intrapoblacional (Novello & Altuna 2002, Novello *et al.* 1996) (tabla 2). Sin embargo, Kiblisky *et al.* (1977) analizaron 11 ejemplares de la población de Roosevelt (reportada como Carrasco pero perteneciente al Departamento de Canelones) y reportaron un cariotipo de 2n=56 NF 84. Esta región es la más extensamente estudiada, aunque existe una zona central entre Lagomar y Los Titanes, limitada por los arroyos Pando y Solís Chico, donde se carece de información. No hay registros en la zona, aunque el ambiente es aparentemente el mismo.

12

TABLA 2. Variación cromosómica encontrada en *C. pearsoni*. Ver el texto por más información. Var. Intrapobl.: variación intrapoblacional, Meta/submeta: cromosomas metacéntricos o submetacéntricos, Telo/subtelo: cromosomas telocéntricos o subtelocéntricos, Meta.: metacéntrico, Subt.: subtelocéntrico, B. Portez: Barra de Portezuelo.

	Colonia						
Departamento	San José	Montevideo	Canelones		Maldonado		Rocha
	Tadaa	Company	Tadaa	Solís	D. Dartar	laać	Laguna
Localidad	Todas	Carrasco	Todas	Las Flores	B. Portez.	Jose	Laguna do Rocho
0 m	70-	FC	50		Chinuanua		
20	70a	0 0	00	700	00	04	700
NF	80	78	78	80	78	76	80
Meta/submeta	5	11	10	5	6	6	5
Telo/subtelo	29	16	18	29	26	25	29
Х	Meta.	Meta.	Meta.	Meta.	Meta.	Meta.	Meta.
Y	Subt.	Subt.	Subt.	Subt.	Subt.	Subt.	Subt.
Var. intrapobl.	2n=68	NF=77, 79	No	No	Banda C	No	No

El cariotipo de las poblaciones conocidas del Departamento de Maldonado es variable (tabla 2). En las localidades de Solís, Bella Vista y Las Flores es 2n=70 NF=80 (de aquí en adelante reportado como 2n=70b) diferente en el patrón de bandeo C (Novello *et al.* 1996) y G (Novello com. pers.), y el tamaño relativo de los cromosomas (Novello com. pers.) al cariomorfo 2n=70a descrito para las localidades de Colonia y San José, sin variación intrapoblacional (Novello & Altuna 2002). Para Barra de Portezuelo y Chihuahua, Villar (2000) ha reportado un 2n=66 NF=78, con la única diferencia de un par de cromosomas metacéntricos con tinción de banda C positiva en el centrómero en la segunda. En estas últimas poblaciones se ha reportado variación intraindividual en 6 ejemplares (García com. pers.). Por último, en la Barra de Maldonado y José Ignacio se caracteriza por 2n=64 con NF=76 (Villar 2000; Kiblisky *et al.* 1977 reporta un NF=82), que difiere del cariotipo anterior por la ausencia de dos cromosomas telocéntricos de pequeño tamaño y la localización de una constricción secundaria (Villar 2000).

Sobre estas tres últimas poblaciones (Chihuahua, Barra de Portezuelo y José Ignacio) se cuenta con información adicional sobre su variación alozímica (Villar 2000). Un estudio sobre 20 loci alozímicos, muestra una gran homogeneidad genética entre ellas y la ausencia de alelos únicos. La semejanza genética expresada como el índice de Roger (1972) es del mismo orden entre todas estas poblaciones (entre 0.974 y 0.988) y no fue muy superior al encontrado entre poblaciones de esta especie y otra de *C. rionegrensis* (0,969). Con la distancia de Nei (1978) estos valores son prácticamente cero en todos los casos. Además, en Chihuahua y José Ignacio, se constató un exceso de homocigotas con respecto a lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg en tres de los loci.

Del Departamento de Rocha, se conocen diferentes localidades con formas de *C. pearsoni*, referidas con los nombres de La Paloma y Laguna de Rocha, Cabo Polonio, Valizas, Laguna Negra, Laguna Merín, Santa Teresa por su proximidad con estas zonas. Recientemente, se ha cariotipado la población de Laguna de Rocha, encontrándose un complemento cromosómico con 2n=70 y NF=84 (de aquí en adelante referido como 2n=70c), que se diferencia de los dos anteriores con igual número diploide en el NF y los patrones de bandeo C y G (Novello com. pers.). No se cuenta con información cariotípica de las otras poblaciones.

A pesar de la gran variación cromosómica inter e intrapoblacional, las técnicas de bandeo C y G han mostrado la gran conservación de los cariotipos por la alta homología de brasos cromosómicos entre ellos (Novello & Altuna 2002, Novello & Lessa 1986, Novello *et al.* 1996, Villar 2000), lo que algunos autores lo atribuyen a una diferenciación reciente de las poblaciones (Villar 2000). Novello *et al.* (1986) mostraron que las localidades del Autódromo Nacional (2n=70a) y Carrasco (2n=56) presentan 20 pares cromosómicos idénticos, y 8 pares telocéntricos del primero son homólogos a 4 pares metacénticos del segundo. Hay sólo 4 pares cromosómicos exclusivos del cariotipo 2n=70a, y uno en el caso del cariomorfo de Carrasco. El cariomorfo de esta última población difiere del cariomorfo del Dpto. de Canelones (2n=58) únicamente por un reordenamiento Robertsoniano (Novello com. pers.). Asimismo, Novello & Altuna (2002) reportaron una homología del 80% entre el cariomorfo "Canelones" (2n=58) y el cariomorfo "Solís" (2n=70b) debido a que 26 pares cromosómicos del primero presentaron homología con 28 pares del segundo. Dos pares cromosómicos de Canelones mostraron

homología con cromosomas telocéntricos de Solís, y sólo 5 pares de este último no mostraron homología con ningún cromosoma o brazo cromosómico del cariomorfo Canelones. Estos cambios hacen suponer que las translocaciones Robertsonianas serían el tipo de cambio más frecuente en la generación de los diferentes cariomorfos (Novello & Altuna 2002, Novello & Lessa 1986), aunque no es el único debido a la presencia de pares únicos presentes en cada cariomorfo posiblemente causados por diferentes rearreglos en el mismo cromosoma o rearreglos más complejos. Finalmente, todos los cariomorfos estudiados hasta el momento, se caracterizan por presentar bandas C en el centrómero de algunos cromosomas, aunque difieren en el número y tipo de los cromosomas en donde éstas se presentan (Villar 2000).

Al analizar la distribución geográfica de las formas cromosómicas conocidas se constata que varias de éstas se encuentran separados por accidentes geográficos como el río Santa Lucía, el arroyo Carrasco, el arroyo Solís Grande, la Laguna del Sauce y el arroyo Maldonado (figura 2), lo que hace suponer que estas barreras geográficas podrían haber jugado un rol importante en su fijación. Por otro lado, el estatus taxonómico de las diferentes formas cromosómicas es incierto. Algunos autores han considerado a las diferentes formas cromosómicas como especies diferentes, aunque sin describirlas ni diagnosticarlas formalmente (Altuna *et al.* 1999, González 2001).

Paralelamente se han realizado investigaciones sobre ecoetología y etología para indagar aspectos básicos de la estrategia de vida, como la estructura y microclima de las cuevas (Altuna 1991), organización espacial y socioreproductiva de las colonias (Altuna *et al.* 1992). En laboratorio se han estudiado algunos aspectos del comportamiento excavador (Altuna *et al* 1992 y 1993), alimentario (Altuna *et al.* 1998, Tassino 1999), sexual (Altuna *et al.* 1991) y de comunicación (Francescoli 1999, 2001, 2002) difícilmente observables en su medio natural, dado los hábitos fosoriales de esta especie (Busch *et al.* 2000) También se han estudiado otros aspectos anatómicos como la presencia de una glándula perineal (Altuna & Corte 1987).

Como resultado de los trabajos anteriores, se han reportado otras diferencias entre las poblaciones de esta especie. A nivel morfológico, se han detectado una sutil variación en las proporciones del báculum a lo largo de la costa (Altuna & Lessa 1985), así como discontinuidades morfológicas a nivel del cráneo, particularmente en la región rostral entre



Figura 2 Distribución de los diferentes cariotipos de *C. pearsoni*. Los puntos grises indican las poblaciones estudiadas. 1: Limetas, 2: Arazatí, 3: Penino, 4: Carrasco, 5: Roosevelt, 6: Cuchilla Alta, 7: Solís, 8:Chihuahua, 9: José Ignacio, 10: Laguna de Rocha y 11: Valizas. Ver el texto por mas información.

las poblaciones separadas por el arroyo Solís Grande (2n=58 *vs.* 2n=70b) (Altuna *et al.* 1988). A nivel etológico, se han reportado diferencias en el comportamiento excavador (Altuna *et al.* 1993) y en la longitud media de las cuevas (Altuna *et al.* 1992) entre la localidad de Penino (2n=70a) y Solís (2n=70b), si bien lo último podría deberse a las diferentes cantidades de biomasa vegetal en los diferentes ambientes (Altuna *et al.* 1992). Por otro lado, Francescoli (2002) detectó variantes locales (dialectos) entre 3 poblaciones de *C. pearsoni* (Penino 2n=70a, Solís 2n=70b y El Relincho, Departamento de San José, de cariotipo desconocido) en el ritmo de emisión de una de las señales acústicas reconocidas para la especie (Francescoli 1999).

La comparación cariotípica con otras especies del género es también interesante. Existe un 100% de homología entre las poblaciones argentinas de *C. pearsoni* y *C. dorbignyi*, una especie de la Provincia de Corrientes, Argentina. García *et al.* (2000), mostraron que son indistinguibles citogenéticamente, con un cariotipo de 2n=70 NF=88. Lo mismo sucede con otras formas de *C. dorbignyi* también correntinas y las formas ya descritas para Uruguay de Colonia y San José (Ortells *et al.* 1990). Sin embargo, la diferenciación a nivel específico no ha sido correctamente evaluada aún. Con respecto a su especie "hermana" *C. torquatus* (D´Elía *et al.* 1999, Slamovits *et al.* 2001), presenta homología aunque en un grado más limitado. En este caso 4 pares cromosómicos del primero tienen completa homología con 5 pares del segundo, y el cromosoma autosómico mayor es idéntico en ambos, difiriendo únicamente en una inversión pericéntrica (Novello & Lessa 1986), para los cariomorfos 2n=70a, 70b, 56 y 58 (Novello *et al.* 1990).

1.4 Hipótesis de trabajo

A pesar de sus diferencias, la mayoría de los modelos de especiación cromosómica propuestos suponen que los nuevos rearreglos cromosómicos reducen la eficacia darwiniana de los heterocigotas que los portan, generando un mecanismo de aislamiento postcopulatorio con la población ancestral y confiriendo un estatus de especie a la nueva población, según el concepto biológico de especie (Mayr 1963). Sin embargo una de las principales críticas ha sido que estos rearreglos cromosómicos no pueden aumentar su frecuencia por selección hasta que la misma haya alcanzado un valor crítico alto por azar (Futuyma & Mayer 1980). Es probable que se fijen rearreglos en que los heterocigotas son débilmente deletéreos. Sin embargo y paradójicamente, si los rearreglos cromosómicos van a jugar un rol primario en la especiación, deben haber una selección fuerte en contra de los heterocigotas. De otra forma, no se constituiría una barrera al flujo génico y no se constituiría un aislamiento reproductivo considerable para la formación de una nueva especie (Sites & Moritz 1987). El aumento de su frecuencia hasta ese valor crítico es muy improbable, a menos que ocurra en pequeñas poblaciones, donde el efecto de la deriva es mayor, aisladas geográficamente para impedir el efecto homogenizador del flujo génico.

Un escenario alternativo sería que la acumulación de fusiones y fisiones céntricas con poca o ninguna heterosis negativa en las poblaciones parentales conduzca a formas incompatibles (Baker & Bickham 1986). Otros modelos aluden a la deriva meiótica asociada al nuevo rearreglo cromosómico. Plantean que este último mecanismo, solo o en combinación con la selección, la deriva genética o alta endocría, podría colaborar con la fijación de un nuevo rearreglo (Hedrick 1981, Spirito 1998), si luego de un tiempo se recupera la segregación normal (King 1993). Sin embargo, ninguno de estos modelos ha sido propuestos para el género *Ctenomys*.

Si diferentes variantes cromosómicas han surgido por la fijación al azar de rearreglos con heterosis negativa, se espera obtener un patrón filogeográfico determinado. Como se planteó anteriormente, se cree que la gran diversificación del género Ctenomys puede estar mediada por la estructura poblacional particular de sus especies, que promovería la fijación de cambios cromosómicos con esas características. De ser este el caso de C. pearsoni, se espera que todos o alguno de sus cariomorfos, sean monofiléticos en su ADN mitocondrial. Al ser haploide y tener heredabilidad exclusivamente materna, el tamaño poblacional efectivo de este último es cuatro veces menor y los haplotipos mitocondriales se fijan por deriva cuatro veces más rápido en promedio que un marcador autosómico diploide, como los cambios cromosómicos. Una posibilidad, es que todas las formas cromosómicas presentes en la actualidad sean monofiléticas para su ADN mitocondrial. Asimismo, es posible que la forma de mayor distribución (2n=70 a, b y c) forme parte de un cariotipo ancestral, por ejemplo, y sean monofiléticas sólo aquellas formas derivadas. El sentido histórico en que se produjo la diferenciación se podría conocer al incorporar en la comparación especies cercanamente relacionadas C. pearsoni.

18

Por otro lado, existen varias hipótesis alternativas posibles. Si la diferenciación se propició luego de la aparición de barreras geográficas que interrumpieron el flujo génico entre poblaciones, éstas estarían modelando la diferenciación genética encontrada en el complejo, y no así la variación cromosómica. Otra posibilidad incluye la colonización de la costa a partir de una población ancestral común y una posterior estabilidad de las poblaciones conectadas por bajos niveles de flujo génico que daría lugar a un patrón de aislamiento por distancia, donde el intercambio de individuos migrantes entre pares de poblaciones es inversamente proporcional a la distancia entre ellas. En caso de encontrar un exceso de variantes en baja frecuencia propias de cada una de las poblaciones estudiadas, sin poder resolver claramente las relaciones de parentesco entre las mismas, es probable que la población ancestral haya sufrido expansión poblacional reciente, por ejemplo por colonización de nuevos hábitat, y las poblaciones resultantes no haber tenido tiempo suficiente para diferenciarse.

El poner a prueba estas hipótesis es posible mediante el análisis de la secuencia de uno o varios genes (Avise 2000) (Recuadro 1). Actualmente, la biología molecular permite la obtención y secuenciación de fragmentos de ADN con relativa facilidad, y los métodos para su análisis están ampliamente desarrollados (Swofford *et al.* 1996). El estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de diferente cariotipo, así como las estimaciones de flujo génico y la reconstrucción de las relaciones genéticas entre ellas, permitiría aceptar o rechazar los diferentes escenarios propuestos. Como objetivo de este trabajo se propone utilizar estas herramientas para poner a prueba que los diferentes cariomorfos de *C. pearsoni* se fijaron en poblaciones pequeñas. Los resultados derivados de este estudio serán además, una contribución importante hacia el esclarecimiento del estatus taxonómico de las diferentes formas cromosómicas, que algunos autores han considerado como especies diferentes, aunque sin describirlas ni diagnosticarlas formalmente (Altuna *et al.* 1999, González 2001).

1.5 Objetivos

- Poner a prueba la hipótesis que plantea que diferenciación cromosómica de los cariomorfos de *C. pearsoni* involucró la fijación reciente de nuevos rearreglos cromosómicos en poblaciones de pequeñas.
- Conocer la diversidad genética dentro y entre los diferentes cariomorfos de C. pearsoni, de forma de estimar los tiempos y patrones de diversificación de los mismos.
- Contribuir a la sistemática del género Ctenomys en Uruguay, caracterizando genéticamente los diferentes cariomorfos presentes C. pearsoni y resolviendo las relaciones genéticas entre ellos. Asimismo, contribuir a la comprensión taxonómica del género Ctenomys.
- Contribuir a dilucidar las formas y modos de diversificación del género Ctenomys

Para ello, se amplificará in vitro y secuenciará un fragmento de la Región de Control del ADN mitocondrial de diferentes poblaciones *C. pearsoni*, junto con representantes de otras dos especies utilizadas como grupo externo. A partir de estos los resultados, se realizarán estimaciones de diversidad genética y flujo génico entre poblaciones, y se establecerán las relaciones de parentesco entre las diferentes poblaciones y cariotipos.

Recuadro 1.

SECUENCIAS DE ADN Y FILOGEOGRAFÍA

La disponibilidad de secuencias de ADN ha sido fundamental para el desarrollo de una nueva disciplina llamada filogeografía, que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes incluyendo aquellos a nivel intraespecífico (Avise, 2000). Los estudios filogeográficos se basan en dos aspectos de la variabilidad intraespecífica del ADN: 1) la magnitud y el patrón de la divergencia filogenética entre alelos, y 2) la distribución geográfico constituye un excelente método para, entre otras cosas, entender los factores históricos que han moldeado los patrones actuales de diversidad y establecer límites taxonómicos y de distribución.

Ciertas hipótesis de especiación cromosómica predicen, como se menciono anteriormente, una estructura filogeográfica determinada. Por lo tanto, el enfoque a seguir para poner a prueba las hipótesis de trabajo consiste en evaluar y comparar la estructura filogeográfica de los diversos cariotipos conocidos de *C. pearsoni*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de las muestras:

Se analizaron un total de 100 ejemplares, 98 pertenecientes a *C. pearsoni*, uno a *C. rionegrensis* y otro a *C. torquatus*.

Se partió de muestras de tejido conservadas en Etanol 95º depositados en la colección de tejidos del Laboratorio de Evolución, de la Facultad de Ciencias. Asimismo, se colectaron animales adicionales en dos localidades, Limetas (34º 09´S, 58º 5.5´W) y Arazatí (34º 33´S, 57º 0´W), con trampas de tipo Gopher Ready Set. De los ejemplares capturados, se extrajo hígado para conservar en Etanol 95º, y se preparó piel y esqueleto de acuerdo a protocolos necesarios para su ingreso a la colección. Todos ellos fueron depositados en la colección del Laboratorio de Evolución (ver Apéndice).

2.2 Representación geográfica:

Se escogieron poblaciones de *C. pearsoni*, abarcando toda su distribución e incluyendo los diferentes cariotipos conocidos, así como un localidad del Departamento de Rocha desconocida a este nivel. Se tomó una población por cariomorfo, a excepción del cariomorfo 2n=70a representado por tres poblaciones y del Departamento de Canelones 2n=58 con dos, debido a que sus distribuciones geográficas son más extensas.

Se estudiaron las localidades de: Limetas 2n=70a (Dpto. Colonia), Arazatí, Penino-Playa Pascual 2n= 70a (Dpto. San José), Carrasco 2n=56 (Dpto. Montevideo), Roosevelt y Cuchilla Alta 2n=58 (Dpto. Canelones), Solís 2n=70b, Punta del Este 2n=66, José Ignacio 2n= 64 (Dpto. Maldonado), Laguna de Rocha 2n=70c y Valizas (Dpto. Rocha). Ver figura 2.

Se analizaron entre 7 y 11 ejemplares de cada población, a excepción de la localidad Laguna de Rocha que fue representada por 3 individuos (tabla 3). Este tamaño muestral permite realizar inferencias sobre la relación de parentesco entre poblaciones,

así como estudios intrapoblacionales. Para los estudios de variabilidad general y de relaciones entre los haplotipos se incluyó, además, una muestra (CA717) correspondiente a la localidad de Laguna Negra (Dpto. Rocha).

Cariomorfo modal	localidad	№ de inds.	Número de individuo
2n=70a	Limetas	8	EV1437, EV 1438, EV 1439, EV 1450, EV 1451, EV 1452, EV 1453, EV 1454, EV 1455, EV 1456
	Arazatí	9	CA377, CA378, CA380, CA381, CA382, EV1470, EV1471, EV1472, EV1473
	Penino	7	CA352, CA353, CA371, CA372, CA373, CA374, CA375
2n= 56	Carrasco	10	CA906, CA910, CA920, CA922, CA923, CA924, CA954, CA960, CA958, CA959
2n=58	Roosevelt	11	CA351, CA354, CA359, CA446, CA448, CA450, CA491, CA493, CA552 CA553 CA555
	Cuchilla Alta	10	CA558, CA559, CA560, CA563, CA564, CA568, CA570, CA571, CA572, CA574
2n=70b	Solís	10	CA361, CA362, CA363, CA364, CA365, CA366, CA368, CA716, CA841, CA852
2n=66	Chihuahua	9	CA482, CA486, CA487, CA489, CA581, CA582, CA583, CA585, CA586
2n=64	José Ignacio	10	CA451, CA452, CA453, CA454, CA455, CA462, CA472, CA473, CA474, CA475
2n=70c	Laguna de Rocha	a 3	CA466, CA467, CA470
2n=?	Valizas	8	CA497, CA498, CA619, CA620, CA621, CA623, CA624, CA625

TABLA 3. Número y cantidad de ejemplares de cada una de las poblaciones utilizadas para el estudio, ordenadas según su cariomorfo. ?: desconocido.

2.3 Trabajo de laboratorio:

<u>Extracción de ADN</u>. Se partió de muestras de tejidos preservados en Etanol 95°. Se realizaron extracciones de ADN total, según protocolos corrientes de tratamiento del tejido con SDS y Proteinasa K, precipitación de proteínas con Cloruro de Sodio y finalmente precipitación de ADN con Isopropanol (Miller *et al.* 1988, Maniatis *et al.* 1992).

<u>Amplificación por PCR</u>. (PCR, "Polymerase Chain Reaction", Saiki *et al.* 1988). A partir de diluciones de extracciones de ADN total, se obtuvo de un fragmento de aproximadamente 470 pares de bases (pb) del ADN mitocondrial, que incluye la primer parte de la Región de Control adyacente al gen del ARN de trasferencia de la Prolina (Pro-RNAt). Se utilizaron los oligonucleótidos (oligos) TucoPro (5´- ACT TTC GTT TAT TGC TTA ATT -3) y TDKD (5´- CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG -3´, Kocher *et al.* 1989). El primero de ellos se asienta sobre el gen Pro-tRNA, mientras que el segundo, en sentido contrario lo hace sobre una región conservada en medio de la Región de Control. (Recuadro 2)

Recuadro 2.

ELECCIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR.

Los genes mitocondriales presentan ciertas ventajas frente a los autosómicos para evaluar relaciones filogenéticas intraespecíficas, por lo que constituyen el marcador corrientemente usado en este tipo de estudios (Avise 2000). Entre otras, su herencia materna y tamaño poblacional efectivo cuatro veces menor que el ADN genómico hacen que los haplotipos mitocondriales se fijen vía deriva genética en promedio cuatro veces más rápido que un gen autosómico. Esto es crucial en el caso de la mayoría de los árboles intraespecíficos.

La Región de Control del ADN mitocondrial, presenta una tasa de sustitución elevada dentro del genoma mitocondrial y es un marcador idóneo para estudios que incluyan variación a nivel intraespecífico o entre especies estrechamente relacionadas.

Aunque el árbol de los genes no siempre coincide con el de las especies, lo que representa una limitación si se trabaja con un único locus (ya sea mitocondrial o nuclear) en estudios filogenéticos, el restringir el análisis al estudio de un único locus mitocondrial constituye una primer aproximación al problema que constituirá la base para la integración futura de marcadores nucleares (por ejemplo microsatélites) en estudios de diferenciación en el complejo *C. pearsoni.*

Las concentraciones finales en cada reacción de amplificación fueron de 0,04 unidades por μ l de Taq (ATGen) en Buffer 1X, 240 μ M de cada uno de los oligonucleótidos (dNTP), 240 nM de cada oligonucleótido y 4 mM de MgCl₂. Para un volumen total de reacción de 20 μ l se utilizaron 2 μ l de dilución de la extracción de ADN total, diluida en agua en un factor de 1 en 100.

Las condiciones de ciclado se optimizaron en un termociclador Rapid-Cycler[™] (Idaho Technology) en 1 minuto de desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de 30 segundos desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de asociación a 47 °C y 30 segundos de extensión a 72 °C, terminando con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

El control de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en minigeles de poliacrilamida 5 % de 1 mm de espesor, a 170 V durante 20 minutos en solución de TBE 1X, teñidos según Sanguinetti *et al.* (1994). Los productos que no mostraron bandas secundarias y que fueron de intensidad similar al fragmento de 500 pares de bases (pb) del estándar de peso molecular de 100 pb (LIFE TECHNOLOGIES, BRL), se seleccionaron para su secuenciación.

Limpieza de los productos de PCR. Previo a su secuenciación, los productos de PCR se purificaron mediante cromatografía por tamaño con columnas de Sephadex (Sephadex G50 fino, Pharmacia Biotech AB), según protocolo modificado de sus proveedores. Cada columna fue armada con 800 µl de Sephadex 5% centrifugado durante 4 minutos a 3.000 revoluciones por minuto (rpm); luego de colocar en ella de 5 a 30 µl del producto de PCR, se centrifugó nuevamente 3 minutos a 3.000 rpm.

Secuenciación automática: se realizó en el secuenciador automático Perkin-Elmer (ABI Prism 377) del servicio Centro Técnico de Análisis Genéticos de la Facultad de Ciencias, a partir de los productos de PCR ya purificados. La reacción de secuenciación se realizaró en un volúmen final de 10 μ l (conteniendo 3,5 μ l de Byg Dye Terminator Cycle Sequencing kit, 1 μ l de primer 5 μ M y cantidad necesario de ADN y agua) y bajo 25 ciclos de 10" a 95° C, 20 segundos a 50° C y 4 minutos a 60° C Se secuenciaron una o ambas hebras con los oligos utilizados en la amplificación por PCR. En los casos necesarios, se secuenció mas de una vez cada hebra para resolver ambigüedades.

2.4 Análisis de las secuencias:

2.4.1 Edición y alineación de las secuencias

Las secuencias se editaron utilizando el programa *Sequence Navigator* (Applied Biosystems Inc., Version 1.0.1). En caso de tener mas de una secuencia por individuo, ambas hebras por ejemplo, éstas se compararon para obtener la secuencia de trabajo. Luego de su edición, se alinearon con el programa *CLUSTALX* (Thompson *et al.* 1997) usando las opciones por defecto. Con el resultado de este alineamiento se identificaron los diferentes haplotipos, que se utilizaron para la siguiente etapa.

2.4.2 Exploración de variabilidad e identificación de haplotipos.

Las secuencias idénticas fueron consideradas pertenecientes al mismo haplotipo, aceptándose aquellas que presentaran un sitio ambiguo (y en un caso dos). Con el programa *PAUP** (Swofford 2000) se calculó número absoluto de cambios y el porcentaje de diferencias nucleotídicas pareadas sobre el total de diferencias.

2.4.3 <u>Relaciones entre haplotipos</u>

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos fueron reconstruidas utilizando el programa *PAUP** (Swofford 2000) mediante dos métodos: i) con el criterio de máxima parsimonia sin pesos (Fitch 1971) y ii) con la distancia HKY mediante el algoritmo de Unión de Vecinos (Saitou & Nei 1987). En el primer caso, se realizó una búsqueda heurística mediante adición secuencial simple y paso a paso (simple stepwise addition) y el algoritmo TBR (Tree Bisection-Reconnection), que son las opciones por defecto del programa. En el segundo caso, la distancia utilizada se calcula asumiendo el modelo de sustitución de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.* 1985), que permite considerar diferencias en las frecuencias nucleotídicas y la presencia de un sesgo de transiciones contra transversiones, como se sabe que hay en el ADN mitocondrial (Aquadro & Greenberg 1983, Bickham *et al.* 1996, Lara *et al.* 1996). En los dos casos, el apoyo de los nodos se evaluó mediante *Bootstrap* (Felsenstein 1985) utilizando 1000 réplicas. Como

grupo externo se tomaron secuencias de las otras dos especies uruguayas, *C. torquatus* (CA565) y *C. rionegrensis* (EV935). La primera está estrechamente relacionada con *C. pearsoni* (D´Elía *et al.* 1999, Slamovits *et al.* 2001).

A partir de las distancias mínimas entre haplotipos se reconstruyó una red llamada "Minimun Spanning Network" (Excoffier & Smouse 1994), que explicita en forma gráfica la relación entre ellos. La topología de la misma es igual al los árboles obtenidos con el criterio de parsimonia sin raíz, pero permite uniones alternativas igualmente parsimoniosas.

2.4.4 Variación poblacional

Una vez establecidos los haplotipos presentes en cada una de las once poblaciones consideradas (Limetas, Arazatí, Penino, Carrasco, Roosevelt, Cuchilla Alta, Solís, Chihuahua, José Ignacio, Laguna de Rocha y Valizas) y su frecuencia, se calcularon la diversidad nucleotídica π (número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos presentes en la muestra) y se estimó el parámetro poblacional θ , basado en el número de sitios segregantes en la muestra (θ_w , Watterson 1975). θ = $2N_{ef}\mu$, siendo μ la tasa de mutación y N_{ef} el tamaño poblacional efectivo del ADN mitocondrial (en general, el número de hembras que se reproducen).

Con el objetivo de evaluar si los datos son consistentes con la ocurrencia de selección a nivel molecular o de la ocurrencia de diferentes eventos demográficos en el pasado, se realizaron las pruebas de neutralidad de Tajima (D, Tajima 1989) y de Fu (F_s , Fu 1997) para cada una de las poblaciones utilizando el programa *Arlequin* (Schneider *et al.* 2000) (Recuadro 3). La neutralidad es uno de los supuestos de los análisis realizados y de ello depende además, las predicciones de hipótesis de trabajo.

2.4.5 Estimaciones de flujo génico

Se aplicó la prueba de Mantel (Mantel 1967) en el programa Arlequín (Schneider *et al.* 2000) para evaluar si los datos son consistentes con un modelo de aislamiento por distancia de las poblaciones (es decir, que el intercambio de migrantes sea mayor cuanto

más próximas se encuentran las poblaciones). Esto implica examinar si existe una correlación significativa entre una matriz de distancias pareadas y otra de flujo génico pareado entre las poblaciones, mediante un procedimiento de permutaciones, en este caso 1000.

Recuadro 3.

PRUEBAS DE NEUTRALIDAD

Las pruebas de neutralidad permiten evaluar si los datos son consistentes con la ocurrencia de selección a nivel molecular o de diferentes eventos demográficos en el pasado, a partir de la variación poblacional presente en las poblaciones naturales. Las dos pruebas utilizadas en este estudio se basan en la Teoría del Coalescente (Kingman 1982) y el modelo de Fisher-Wright con sitios infinitos sin recombinación. Esto significa que se asume que la población es de tamaño constante y finito, con apareamientos al azar y generaciones no solapantes, y sin selección (neutralidad) ni recombinación sobre el locus en cuestión. Además, el modelo de sitios infinitos plantea que al ser el número de sitios tan grande y la tasa de mutación tan baja (y constante en estos casos), cada mutación se produce en un sitio diferente siendo despreciable la probabilidad de mutaciones múltiples en un mismo sitio.

Cuando los datos se apartan significativamente de lo esperado según esas asunciones (es decir, la probabilidad de obtener los vabres observados es improbable), se infiere que la neutralidad u otra asunción del modelo ha sido violada. El no rechazar la hipótesis puede ser evidencia de que el locus ha evolucionado bajo neutralidad, o simplemente mostrar que la prueba no es lo suficientemente poderosa como para detectar un apartamiento significativo del locus con ese tamaño muestral.

Ambas pruebas estadísticas se basan en comparaciones de diferentes estimadores del parámetro poblacional è.

TAJIMA (Tajima, 1987): compara dos estimadores de è, uno basado en el número medio de diferencias pareadas (ð) llamado \dot{e}_0 y otro basado en el número de sitios segregantes (variables, S) \dot{e}_w

$$\hat{\boldsymbol{q}}_{\boldsymbol{p}}^{\Lambda} = \boldsymbol{p} \qquad \hat{\boldsymbol{q}}_{w}^{\Lambda} = S / \sum_{i=1}^{n-1} (1/i)$$
$$D = \frac{\boldsymbol{q}_{\boldsymbol{p}} - \boldsymbol{q}_{w}}{\sqrt{Var(\boldsymbol{q}_{\boldsymbol{p}} - \boldsymbol{q}_{w})}}$$

en página siguiente

Recuadro 3 (continuación)

El primero es poco sensible a variaciones en las frecuencias alélicas mientras que el segundo es afectado en gran medida por las mismas. Cuando se cumplen las diferentes asunciones del modelo, el valor esperado del estadístico D es cero. Sin embargo, cuando no es así, por ejemplo frente a cambios en el tamaño poblacional o si el locus es sometido a selección, ambos estimadores responderán diferente, y el estimador D se apartará de su valor esperado. Por ejemplo, en una población que aumenta su tamaño, el incremento de la variación ocurrirá inicialmente en los alelos de baja frecuencia, que contribuirán a S pero poco a \eth , por lo que \grave{e}_w crecerá más rápido \grave{e}_{\eth} y D será negativo. Cuando la población deje de crecer, ambos estimadores de è se igualarán, y D volverá al equilibrio.

FU (Fu 1997): utilizando los mismos estimadores, evalúa la probabilidad de una muestra con el número de clases alélicas igual o menor al observado dado un ô observado. Esta probabilidad es llamada S´ y es

S'= Pr (
$$\delta > \delta_{obs}$$
. $|\dot{\mathbf{e}} = \dot{\mathbf{e}}_{\delta}$) = $\sum_{k \ge k_0} \frac{|S_k| \mathbf{q}_{\mathbf{p}}^k}{S_n(\mathbf{q})}$

donde $S_n \begin{pmatrix} \Lambda \\ \boldsymbol{q}_{\delta} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Lambda \\ \boldsymbol{q}_{\delta} - 1 \end{pmatrix} \dots \begin{pmatrix} \Lambda \\ \boldsymbol{q}_{\delta} - n + 1 \end{pmatrix} y S_k$ es el coeficiente de $\boldsymbol{q}_p^{\Lambda}$ en S_n . $F_s = Ln (S' / (1-S'))$

Para obtener los valores críticos, se obtiene una distribución empírica del estadístico a partir de simulaciones de poblaciones ideales con los valores de è estimados.

El número medio de migrantes por generacón (*Nm*, siendo N el tamaño poblacional, y m la fracción de individuos migrantes por generación) para la construcción de la segunda matriz fue estimado por el programa como: Nm = (1 - Fst) / (2 Fst). La matriz de distancias fue estimada a partir de las coordenadas geográficas de las localidades en cuestión utilizando el programa *''How far is it?''* tomado de <u>http://www.indo.com/distance</u>. En las localidades de Limetas, Arazatí y Solís las coordenadas fueron tomadas en terreno, mientras que las otras fueron aproximadas utilizando un programa de transformación de coordenadas (Proyección Gaus Krugger) diseñado en 1992 por el Ing. Agr. Roberto Perez Rodiro (Instituto de Agrimensura, Facultad de Ingeniería), ubicando las localidades en el mapa (tabla 4).

34° 09´ 00´´ S, 58° 05´ 30´´ W
34° 33´ 00´´ S, 57° 00´ 00´´ W
34° 68´ 00´´ S, 56° 25´ 00´´ W
34° 53´00´´S, 56° 02´00´´W
34° 51´ 18´´ S, 56° 02´ 38´´ W
34º 47´ 06´´ S, 55º 29´ 55´´ W
34° 47´ 00´´ S, 55° 23´ 00´´ W
34° 56´ 44´´ S, 54° 56´ 47´´ W
34° 50´ 22´´ S, 54° 38´ 52´´ W
34º 37´ 21´´ S, 54º 15´ 27´´ W
34° 21´ 06´´ S, 53° 50´ 30´´ W

TABLA 4. Coordenadas geográficas de las localidades estudiadas

El programa *Migrate 1.5* (Beerli & Felsenstein 1999), permitió estimar el tamaño poblacional y las tasas de migración entre poblaciones mediante Máxima Verosimilitud (ML) basado en la teoría del coalescente. Este programa permite la implementación de diferentes modelos de migración, lo que permitió la comparación de los diferentes ajustes de los datos a los mismos. Se corrieron: *i*) modelos completos, librando al programa la estimación de todos los tamaños poblacionales y tasas de migración pareadas en ambos sentidos, *ii*) modelo de islas, *iii*) modelo de piedras de paso clásico y *iv*) modelo de piedras de paso asimétrico (Recuadro 4), trabajando con las opciones sugeridas por el programa y una relación transiciones / transversiones de 5. Se realizaron al menos 3 corridas de cada modelo para examinar la convergencia en las estimaciones de los parámetros.

2.4.6 Estudio de la variabilidad entre cariomorfos

Para evaluar la existencia de una posible estructura poblacional jerárquica se realizó un AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) mediante el programa *Arlequin* (Schneider *et al.* 2000). Éste estima los índices de estructura genética usando la información sobre las distancias entre los haplotipos (número de mutaciones) y sus frecuencias en cada población, y utilizando procedimientos de permutación evalúa la significación de los componentes de la varianza asociada a posibles niveles de estructura poblacional. En este caso se evaluó la estructuración en poblaciones, y de éstas incluidas en grupos mayores según su semejanza cariotípica, de aquí en adelante referidos como *grupos de cariomorfos*, de la siguiente manera:

Grupos	Poblaciones incluidas	Cariomofos
1	Limetas, Arazatí, Penino	2n=70a
2	Carrasco, Roosevelt, Cuchilla Alta	2n=56 y 58
3	Solís	2n=70b
4	Chihuahua, José Ignacio	2n= 64 y 68
5	Laguna de Rocha, Valizas	2n=70c y ?

Esta rutina también se implementó utilizando sólo los datos de las frecuencias de los haplotipos (sin datos de distancia genética), convirtiendo el análisis en un Fst clásico de Wright (1978). Se escogió la opción de 1000 permutaciones en ambos casos.

Se estimaron los tiempos de divergencia netos entre estos grupos de cariomorfos (estimando la variación común presente en la población ancestral que les dio origen y ajustando sus efectos) mediante el programa M-DIV (Nielsen & Wakeley 2001), asumiendo el modelo de sustitución nucleotídica de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.* 1985). Se utilizaron las condiciones de partidas sugeridas por el programa (largo de cadenas de Markov de 5.000.000, "burn-in time" de 500.000, tasa de migración máxima de 10, máximo tiempo de divergencia entre grupos de 20 N generaciones). Asume, entre otras cosas, que las dos poblaciones a comparar son descendientes de una población panmíctica ancestral, y que luego de su separación pudieron o no haber estado conectadas por migración.

Recuadro 4

ESTIMACIONES DE FLUJO GÉNICO Y MODELOS

Los métodos clásicos para estimar los niveles de intercambio genético entre poblaciones, típicamente usan la distribución espacial de las frecuencias de los diferentes haplotipos. La mayoría de estas aproximaciones están basadas en las expectativas de equilibrio de los modelos teóricos de genética de poblaciones bajo la teoría neutral. De la variación geográfica en las frecuencias alélicas observadas, se estima un parámetro combinado *Nm*, donde *m* es la tasa de migración (proporción de alelos migrantes en cada generación) y *N* el tamaño efectivo poblacional. *Nm* es interpretado entonces como el número medio absoluto de migrantes intercambiados por generación entre poblaciones. Valores de *Nm* mayores a 1 indican, según la teoría, que el efecto homogeinizador del flujo génico superará los efectos de diferenciación por deriva local de las subpoblaciones.

Los modelos de intercambio de migrantes evaluados en este trabajo son:

Modelo de islas (Wright, 1931), que supone que la especie esta dividida en poblaciones de igual tamaño que intercambian alelos con igual probabilidad.

Modelo de piedras de paso (stepping-stones, Kimura 1953) que supone que los intercambios genéticos ocurren únicamente entre poblaciones adyacentes, con igual probabilidad en ambos sentidos. Una modificación es permitir que las tasas de migración entre poblaciones vecinas dependan del sentido de la migración. En el texto se refiere a este último como modelo de piedras de paso asimétrico.

RESULTADOS

3.1 Variación genética y diversidad de haplotipos

De un total de 100 muestras analizadas, 98 ejemplares de *C. pearsoni*, 1 de *C. torquatus* y 1 de *C. rionegrensis*, se secuenciaron 438 pb correspondientes a la primera región hipervariable de la Región de Control del ADN mitocondrial, lindera al gen ProtRNA. En los extremos (zonas conservadas), algunas secuencias de *C. pearsoni* quedaron sin resolver: 4 en el 5´ y 36 en el extremo 3´ (ver APENDICE).

El conjunto de secuencias presentó 50 sitios variables, de los cuales 26 fueron informativos según el criterio de parsimonia. A partir de los primeros se definieron 21 haplotipos exclusivos de *C. pearsoni* clasificados por sus semejanzas en cuatro grupos nombrados como A, B, C (figura 3). La frecuencia de los haplotipos en la muestra varía, desde aquellos de copia única (6 haplotipos con frecuencia 0.01) a otros representados por 16 copias (0.16). La relación de transiciones / transversiones en el total de las secuencias fue de 3,28 % (habiendo un 2,33% de transversiones y 7,55 % de transiciones). Las secuencias presentaron 14,33% de Guanidina, 23,52% de Citosina, 27,93% de Timina y 34,21% de Adenina, coherente con lo encontrado en el género *Ctenomys* (D´Elía 1996, Lessa & Cook 1998), otras especies relacionadas (Lara *et al.* 1996) y mamíferos en general (Irwin et al. 1991).

El rango de variación observado entre haplotipos, incluyendo el grupo externo, fue de 1 a 27 cambios (0,002 a 0,057 %) (tablas 5 y 6). Las distancias máximas observadas coincidieron con comparaciones con el grupo externo, alcanzando entre entre 16 y 27 cambios (0,037 a 0,057 de divergencia) entre *C. pearsoni y C. rionegrensis*. Las divergencias con *C. torquatus* fueron menores, en el rango de 10 a 21 cambios (0,023 a 0,048 de divergencia). La distancia máxima encontrada entre secuencias de *C. pearsoni* fue de 0,037 entre los haplotipos C8 y B4, equivalente a 16 sustituciones nucleotídicas y correspondiente a una distancia de 0,038 siguiendo el modelo de sustitución HKY (Hasegawa *et al.* 1985).
FIGURA 3. Sitios variables de los 22 haplotipos (*C. pearsoni* y los grupos externos) en comparación con una secuencia de referencia; el número vertical debajo de ella indica la posición de ese sitio en la secuencia original. Los puntos indican que el nucleótido en ese sitio es igual a la secuencia de referencia de lo contrario se especifica la base correspondiente. Los sombreados corresponden a los sitios ambiguos.

Sec	c. ref.:	CTTTGTCCATGGGAAAAGACACAATCTCTCTTACGCAAAGCAGTATTCGTG
		11111111111111111111112222222222222333334 458802223333344555566778888900012233566789001221 185895641480134578567808392369646950204929749399380
	Grupo A :	
A1	9	
A2	1	
A3	5	GATCA
A4	2	GATCTTGA
A5	1	GATT
A6	7	CAGA.TTGA
	Grupo B:	
B1	16	T.GATCTAC.GA
В2	4	T.GATCTAC.GAC
В3	1	T.GATCTAC.GACC
В4	6	T.GATCCTGATC.GAC
в5	2	T.GACCTGC.GAC
B6	11	CT.GACCT.C.GC.GAC
	Grupo C:	
C1	10	GCC.CTC.A
C2	1	GCC.CTCC.A
C3	1	GCW.
C4	4	GCGC.CTC.A
C5	3	GCGC.CTCA
C6	4	GTC.CTC.A.C
C7	4	G.ACC.CTG.C.GA
C8	1	CGCGTC.ATCAC
	Grupo D:	
Dl	5	CGCTCTCAT
	Grupo ex	terno:
C. to:	rquatus	C.ATTTTGTCT.ACT.ACT
C. rio	negrensis	TCC.AC.TTG.CTCTCT.AGCT.ATT

TABLA 5. Número total de diferencias (sobre la diagonal) y porcentaje de diferencias nucleotídicas sobre el total de diferencias (debajo de la diagonal) entre pares de haplotipos. Las columnas y filas sombreadas son las comparaciones con las secuencias tomadas como grupos externos. Los números resaltados en negritas son los máximos indicados en el texto.

1 A1	1	2	2		-	~	_	-	•	10	11	12
1 Al			3	4	5		7	8		10		12
o	-	0.002	0.011	0.018	0.009	0.018	0.023	0.025	0.029	0.032	0.025	0.030
2 A2	1	-	0.007	0.014	0.009	0.014	0.018	0.021	0.024	0.027	0.021	0.025
3 A3	5	3	-	0.007	0.007	0.016	0.016	0.018	0.022	0.025	0.018	0.023
4 A4	8	6	3	-	0.014	0.018	0.018	0.021	0.024	0.023	0.021	0.025
5 A5	4	4	3	6	-	0.018	0.018	0.021	0.024	0.027	0.021	0.025
6 A6	8	6	/	8	8	-	0.018	0.021	0.024	0.027	0.025	0.030
7 B1	10	8	7	8	8	8	-	0.002	0.005	0.011	0.009	0.014
8 B2	11	9	8	9	9	9	1	-	0.002	0.014	0.011	0.016
9 83	14	10	9	10	10	10	2	Ţ	-	0.01/	0.015	0.019
10 84	14	12	11	10	12	12	5	6	1	-	0.007	0.011
11 B5	12	11	10	11	9	11	4	5	0	3	-	0.005
12 80	13	11	10	11	11	11	0 7	/	8	11	2	10
14 02	,	5	7	10	/	10	/	0	10	10	0	11
14 C2	8	7	7	10	8	12	8	9	10	12	9	11
15 C3	0	7	7	10	0	12	0	9	10	10	9	11
17 05	0	/	/ 7	10	8	10	8	9	10	12	9	11
19 06	8 0	/	/ 7	10	8	12	8	9	10	12	9	11
19 C7	10	· ·	/ 0	10	10	10	0	9	10	10	9	11
20 C8	11	10	10	12	11	15	0 10	9 1 2	14	16	9 1 2	15
	9	20	20 8	11		12	2	10	11	13	10	10
21 D1		15	16	17	15	20	17	16	17	21	18	17
21 D1 22 C. torquatus	16	10						0.4	0.5	27	24	23
21 Dl 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis	16 21	20 13	22 14	23 15	21 16	25 17	23	24 19	25	21	24	23
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2	16 21	13 20 13 0.016 0.014	22 14 0.018 0.016	23 15 0.019 0.017	21 16 0.018 0.016	25 17 0.018 0.016	18 0.018 0.016	19 0.023 0.021	25 20 0.025 0.023	21 0.021 0.018	24 0.037 0.034	23 0.049 0.046
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014	22 14 0.018 0.016 0.016	23 15 0.019 0.017 0.017	21 16 0.018 0.016 0.016	25 17 0.018 0.016 0.016	23 18 0.018 0.016 0.016	19 0.023 0.021 0.021	25 20 0.025 0.023 0.023	21 0.021 0.018 0.018	22 0.037 0.034 0.037	23 0.049 0.046 0.051
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021	22 14 0.018 0.016 0.016 0.023	23 15 0.019 0.017 0.017 0.024	21 16 0.018 0.016 0.016 0.023	25 17 0.018 0.016 0.016 0.023	23 18 0.018 0.016 0.016 0.023	19 0.023 0.021 0.021 0.023	20 0.025 0.023 0.023 0.030	21 0.021 0.018 0.018 0.025	22 0.037 0.034 0.037 0.039	23 0.049 0.046 0.051 0.053
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016	22 14 0.018 0.016 0.016 0.023 0.018	23 15 0.019 0.017 0.017 0.024 0.019	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018	18 0.018 0.016 0.023 0.018	19 0.023 0.021 0.021 0.023 0.023	25 20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025	21 0.021 0.018 0.018 0.025 0.016	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 D1	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016 0.025	22 14 0.018 0.016 0.016 0.023 0.018 0.027	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.012	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027	19 0.023 0.021 0.021 0.023 0.023 0.027	25 20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025 0.034	21 0.021 0.018 0.018 0.025 0.016 0.030	24 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.046	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 2 P2	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.027	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029 0.019 0.019	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.027	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.018	23 18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.027	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.018	25 20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027	21 0.021 0.018 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021	24 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.046 0.039	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057 0.053
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.018 0.022	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029 0.019 0.022 0.022	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.018 0.021 0.024	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024	20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.023	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057 0.053 0.055 0.055
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 P4	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.025 0.018 0.022	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029 0.029 0.022 0.024 0.022	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.024	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.021 0.024	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.024	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024	20 0.025 0.023 0.023 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.027	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041 0.049	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057 0.053 0.055 0.061 0.062
1 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.025 0.016 0.025 0.022 0.025 0.018	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029 0.029 0.022 0.024 0.029 0.022 0.024	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.024 0.022	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027	20 0.025 0.023 0.023 0.025 0.034 0.027 0.034 0.037 0.030	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.027 0.030 0.023	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057 0.053 0.055 0.061 0.062 0.052
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.025 0.018 0.022 0.025 0.018	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.024	23 15 0.019 0.017 0.024 0.019 0.029 0.022 0.022 0.024 0.029 0.022 0.022 0.022	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.028 0.020 0.025	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021	20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.027 0.030 0.023 0.023	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041 0.039	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.053
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.028 0.022 0.025 0.018 0.023	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.024 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022	21 16 0.018 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.028 0.020 0.025 0.002	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025	20 0.025 0.023 0.023 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.011	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.027 0.030 0.023 0.023 0.023 0.023	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041 0.039	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.048 0.057 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.055 0.053
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2	16 21.	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.025 0.016 0.025 0.016 0.022 0.025 0.018 0.022 0.025 0.018 0.023 0.025 0.018 0.023 0.012 0.014 0.014 0.014 0.014 0.014 0.025 0.016 0.014 0.025 0.016 0.025 0.016 0.025 0.016 0.025 0.016 0.025 0.05	14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.022 0.022	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.024 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.025 0.025 0.019 0.025 0.019 0.025 0.019 0.025 0.055 0	21 16 0.018 0.023 0.023 0.027 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.028 0.020 0.025 0.005	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.005	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.021 0.021 0.025 0.007	20 0.025 0.023 0.023 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.034 0.014	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.027 0.030 0.023 0.023 0.023 0.011	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.049 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041 0.039 0.031	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.055 0.061 0.062 0.055 0.053 0.051 0.053 0.041
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.025 0.016 0.025 0.018 0.022 0.025 0.018 0.023 - 1	14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.022 0.025 0.0025 0.0025	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.029 0.022 0.022 0.022 0.022 0.027 0.002 0.005 -	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.021 0.022 0.025 0.002 0.005	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.022 0.025 0.002 0.002 0.005	23 18 0.018 0.016 0.023 0.027 0.021 0.021 0.024 0.021 0.022 0.025 0.005 0.007	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.021 0.024 0.021 0.025 0.007 0.009 0.010	20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.011 0.014	21 0.021 0.018 0.018 0.016 0.030 0.021 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041 0.039 0.031 0.031	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.055 0.061 0.062 0.055 0.053 0.041 0.043
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.022 0.025 0.018 0.023 - 1 1 1	22 14 0.018 0.016 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.025 0.002 - 2 2	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.029 0.022 0.024 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.027 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.022 0	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002 0.005 0.005	25 17 0.018 0.016 0.023 0.028 0.028 0.021 0.024 0.022 0.025 0.002 0.005 0.005	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.018 0.027 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.005 0.007 0.007	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.027 0.018 0.027 0.024 0.027 0.021 0.025 0.007 0.009 0.010 0.009	20 0.025 0.023 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.011 0.014 0.014	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011 0.012	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.041 0.041 0.041 0.041 0.039 0.031 0.034	23 0.049 0.051 0.053 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.055 0.053 0.041 0.043 0.044
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5	16 21	13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.025 0.016 0.025 0.018 0.0225 0.018 0.023 - 1 1 1 1	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.021 0.024 0.027 0.025 0.002 - 2 2 2 2	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.029 0.022 0.025 0	21 16 0.018 0.016 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.022 0.022 0.002 0.025 0.002 0.005 0.005 0.005 0.005	25 17 0.018 0.016 0.023 0.028 0.028 0.021 0.024 0.022 0.002 0.005 0.005 0.005 0.005	18 0.018 0.016 0.023 0.028 0.027 0.018 0.027 0.021 0.025 0.005 0.007 0.007 0.007 0.007	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.027 0.021 0.025 0.007 0.009 0.010 0.009	20 0.025 0.023 0.020 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.034 0.011 0.014 0.014	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011 0.012	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.037 0.041 0.039 0.031 0.034 0.037 0.034	23 0.049 0.051 0.053 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.061 0.062 0.055 0.053 0.041 0.043 0.046 0.043
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5 18 C6	16 21	13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016 0.025 0.025 0.018 0.022 0.025 0.018 0.023 - 1 1 1 2	22 14 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.022 0.025 0.0025 0.0025 0.025	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.022 0.022 0.022 0.002 0.002 0.002 0.005 - 2 3	21 16 0.018 0.016 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.027 0.021 0.022 0.005 0.005 0.005 2 3	25 17 0.018 0.016 0.023 0.028 0.021 0.024 0.024 0.022 0.022 0.002 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.024 0.024 0.027 0.025 0.005 0.007 0.007 0.007	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.007 0.009 0.009 0.010	20 0.025 0.023 0.023 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.034 0.037 0.030 0.034 0.014 0.014 0.014 0.014	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011 0.012 0.011 0.012	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.039 0.034 0.041 0.041 0.039 0.031 0.034 0.034 0.034 0.034	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.055 0.061 0.055 0.055 0.055 0.055 0.055 0.053 0.041 0.043 0.044 0.043
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5 18 C6 19 C7	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.025 0.016 0.025 0.018 0.022 0.025 0.018 0.023 - 1 1 1 2 3	22 14 0.018 0.016 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.025 0.0025 0.0025 0.022 2 2 2 3 4	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.023 0.023 0.023 0.024 0.019 0.019 0.017 0.017 0.024 0.019 0.029 0.029 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.024 0.022 0.024 0.022 0.022 0.022 0.024 0.024 0.022 0.022 0.025 0.024 0.025 0.024 0.025 0.024 0.025 0.055 0	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005	25 17 0.018 0.016 0.023 0.028 0.023 0.024 0.024 0.024 0.025 0.0025 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005	18 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.007 0.007 0.007 0.007 5	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.024 0.024 0.027 0.021 0.025 0.007 0.009 0.009 0.010	20 0.025 0.023 0.030 0.025 0.034 0.037 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.014 0.014 0.014 0.014 0.018	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.023 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011 0.011 0.012 0.011 0.012 0.014 0.016	22 0.037 0.034 0.039 0.034 0.046 0.039 0.041 0.041 0.041 0.039 0.031 0.034 0.034 0.037 0.034 0.035 0.034	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.061 0.043 0.043 0.043 0.044 0.043 0.044
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5 18 C6 19 C7 20 C8	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.021 0.016 0.018 0.025 0.018 0.025 0.018 0.022 1 1 1 1 2 3 5	22 14 0.018 0.016 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.025 0.002 2 2 2 2 3 4 6	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.029 0.022 0.022 0.027 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.027 0.002 0.002 0.017 0.019 0.019 0.017 0.019 0.029 0.029 0.024 0.029 0.022 0.024 0.022 0.022 0.022 0.022 0.024 0.024 0.024 0.024 0.024 0.024 0.022 0.025 0.024 0.024 0.025 0.024 0.025 0.024 0.025 0.024 0.026 0.024 0.026 0.024 0.026 0.024 0.026 0	21 16 0.018 0.016 0.023 0.018 0.027 0.021 0.024 0.021 0.025 0.002 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.002 0.005 0.005 0.005 0.025 0.005 0	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.024 0.024 0.022 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 - 3 4	18 0.018 0.016 0.016 0.023 0.018 0.027 0.024 0.021 0.021 0.025 0.007 0.007 0.007 0.007 7 7	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.024 0.021 0.024 0.021 0.025 0.007 0.025 0.007 0.009 0.010 0.009 0.009 0.009 0.009	20 0.025 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.034 0.037 0.030 0.034 0.011 0.014 0.014 0.014 0.014 0.014	21 0.021 0.018 0.018 0.025 0.030 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.010 0.011 0.012 0.011 0.012 0.014 0.021	22 0.037 0.034 0.037 0.039 0.034 0.039 0.037 0.041 0.041 0.041 0.039 0.031 0.034 0.034 0.035 0.034 0.035 0.034 0.034	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.053 0.055 0.053 0.061 0.062 0.055 0.053 0.041 0.043 0.044 0.043 0.044 0.043 0.044
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5 18 C6 19 C7 20 C8 21 D1	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.010 0.016 0.012 0.016 0.018 0.022 0.025 0.016 0.023 1 1 1 2 3 5 4	22 14 0.018 0.016 0.023 0.027 0.018 0.027 0.021 0.025 0.002 - 2 2 2 3 4 6 5	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.024 0.024 0.029 0.022 0.025 0.055 0	21 16 0.018 0.016 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002 0.005 0.05 0.	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.022 0.002 0.002 0.005 0	23 18 0.018 0.016 0.023 0.023 0.021 0.021 0.021 0.025 0.007 0.005 0.007 0.005 0.005 0.007 0.005 0.005 0.007 0.005 0.005 0.007 0.005 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.007 0.005 0.007 0.007 0.005 0.007 0.007 0.005 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.005 0.007 0	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.024 0.021 0.025 0.007 0.025 0.007 0.025 0.007 0.009 0.010 0.009 0.010 	20 0.025 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.034 0.034 0.034 0.034 0.014 0.014 0.014 0.014 0.014 0.016 0.016	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.020 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.024 0.024 0.025 0.016 0.025 0.016 0.025 0.016 0.025 0.025 0.027 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.021 0.023 0.023 0.021 0.021 0.023 0.021 0.023 0.021 0.021 0.023 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.011 0.012 0.014 0.012 0.014 0.012 0.014 0.012 0.014 0.021 0.012 0.014 0.021 0.021 0.012 0.014 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.012 0.014 0.021	22 0.037 0.034 0.039 0.039 0.039 0.039 0.037 0.041 0.039 0.031 0.034 0.035 0.034 0.035 0.034 0.039 0.034 0.039	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.053 0.055 0.061 0.062 0.055 0.053 0.041 0.043 0.044 0.043 0.044 0.043 0.048 0.050
21 D1 22 C. torquatus 23 C. rionegrensis 1 A1 2 A2 3 A3 4 A4 5 A5 6 A6 7 B1 8 B2 9 B3 10 B4 11 B5 12 B6 13 C1 14 C2 15 C3 16 C4 17 C5 18 C6 19 C7 20 C8 21 D1 22 C. torquatus	16 21	13 20 13 0.016 0.014 0.014 0.021 0.016 0.016 0.018 0.022 0.025 0.016 0.023 1 1 1 1 2 3 3 4 4 14	22 14 0.018 0.016 0.023 0.023 0.021 0.024 0.027 0.021 0.025 0.002 - 2 2 2 3 4 6 5 15	23 15 0.019 0.017 0.024 0.029 0.022 0.022 0.022 0.022 0.022 0.002 0.002 0.005 - 2 2 3 4 6 5 15	21 16 0.018 0.016 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.027 0.025 0.002 0.005 0	25 17 0.018 0.016 0.023 0.018 0.028 0.021 0.024 0.028 0.022 0.025 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 0.005 1.5	23 18 0.018 0.016 0.023 0.023 0.023 0.021 0.024 0.021 0.025 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.005 0.007 0.007 0.005 0.007 0.007 0.007 0.005 0.007 0	19 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.027 0.018 0.021 0.024 0.025 0.007 0.025 0.007 0.009 0.010 0.009 0.010 	25 20 0.025 0.023 0.030 0.025 0.034 0.027 0.030 0.034 0.037 0.030 0.034 0.011 0.014 0	21 0.021 0.018 0.025 0.016 0.030 0.023 0.023 0.023 0.023 0.023 0.011 0.012 0.011 0.012 0.014 0.016 0.021 0.012 0.014 0.012 0.014 0.012 0.014 0.012 0.012 0.012 0.012 0.012 0.012 0.012 0.010 0.010 0.010 0.023 0.021 0.023 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.021 0.023 0.021 0.021 0.023 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.021 0.011 0.012 0.011 0.012 0.011 0.012 0.014 0.021 0.021 0.011 0.012 0.011 0.021 0.021 0.011 0.012 0.021	22 0.037 0.034 0.039 0.039 0.039 0.039 0.037 0.041 0.048 0.041 0.039 0.031 0.034 0.035 0.034 0.035 0.034 0.035 0.034	23 0.049 0.046 0.051 0.053 0.055 0.061 0.055 0.053 0.055 0.053 0.041 0.043 0.044 0.043 0.044 0.043 0.044 0.043 0.048 0.050 0.037 0.025

3.2 Relaciones ente haplotipos

Las topologías de los árboles mostrando las relaciones filogenéticas entre haplotipos se presentan en las figuras 4 y 5, junto con los valores de *Bootstrap* que apoyan los nodos en más del 50% de las réplicas. Aplicando el criterio de máxima parsimonia se obtuvieron 6 árboles con 70 pasos, un Índice de Consistencia (CI, número mínimo de pasos / número de pasos observado) de 0,79 y un Índice de Homoplasia (HI = 1 -CI) de HI = 0,21. Como puede observarse en el consenso de estos 6 árboles (figura 4) las diferencias entre ellos son mínimas coincidiendo en la mayoría de los nodos; las diferencias consisten agrupamientos en dos nodos internos, que incluyen los haplotipos A3, A4 yA5 en un caso y B4, B5 y B6 en el otro. La reconstrucción por distancias (figura 5) presenta una topología coincidente a la obtenida por el criterio de máxima parsimonia, lo que era esperable debido al bajo nivel de variación media encontrada.

Desde aquí en adelante se trabajará con los 20 haplotipos presentes en las poblaciones de estudio, excluyendo el haplotipo C8 perteneciente a Laguna Negra, Departamento de Rocha. El esquema de las relaciones entre los haplotipos, junto con sus distribuciones por población y cariomorfo se presenta en la figura 6. Se observa que ninguno de los cariomorfos estudiados es monofilético, así como una relación en general más estrecha entre los haplotipos dentro de los grupos. Si bien siete haplotipos son compartidos entre las poblaciones, 13 son exclusivos de las diferentes poblaciones.



FIGURA 4. Árbol de consenso por la regla de la mayoría de 6 árboles igualmente parsimoniosos de haplotipos de *C. pearsoni* reconstruidos con el criterio de Máxima Parsimonia mediante Búsqueda Heurística. El grupo externo *C. rionegrensis* y *C. torquatus.* Los números junto a cada nodo indican: *abajo* su apoyo de *Bootstrap* (1000 réplicas), *arriba* el porcentaje de veces que ese nodo apareció en los árboles utilizados para su construcción.



FIGURA 5. Árbol de haplotipos de *C. pearsoni* reconstruido por el método de Unión de Vecinos con la distancia HKY (Hasegawa *et al.* 1985). El grupo externo está formado por *C. rionegrensis* y *C. torquatus*. Los números al lado de cada nodo indican su apoyo de *Bootstrap* (1000 réplicas).



FIGURA 6. Esquema de la relación entre haplotipos ("Mininum Spanning Network") de *C. pearsoni*. Cada círculo representa un haplotipo, y su área es directamente proporcional a su frecuencia en la muestra. Las líneas que los unen representan las conexiones entre ellos y cada barra transversal sobre la misma un cambio.

TABLA 6. Distancia según el modelo HKY (Hasegawa *et al.* 1985) entre pares de haplotipos. Las áreas sombreadas corresponden a las comparaciones con el grupo externo (*C. rionegrensis* y *C. torquatus*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 A1	-											
2 A2	0.002	-										
3 A3	0.012	0.007	-									
4 A4	0.019	0.014	0.006	-	-							
5 A5	0.010	0.010	0.006	0.013	-							
6 A6	0.019	0.014	0.016	0.018	0.019	-						
7 B1	0.023	0.019	0.016	0.018	0.019	0.019	-					
8 B2	0.026	0.021	0.018	0.020	0.021	0.029	0.002	-				
9 B3	0.030	0.023	0.022	0.024	0.025	0.025	0.005	0.002	-			
10 B4	0.033	0.028	0.025	0.023	0.028	0.028	0.012	0.014	0.017	-		
11 B5	0.026	0.021	0.018	0.020	0.021	0.026	0.010	0.012	0.015	0.007	-	
12 B6	0.031	0.026	0.023	0.025	0.026	0.031	0.014	0.016	0.020	0.012	0.005	-
13 C1	0.016	0.014	0.013	0.020	0.016	0.026	0.016	0.019	0.022	0.026	0.019	0.023
14 C2	0.019	0.016	0.016	0.023	0.019	0.028	0.019	0.030	0.024	0.028	0.021	0.026
15 C3	0.020	0.017	0.017	0.024	0.020	0.030	0.020	0.022	0.025	0.030	0.022	0.027
16 C4	0.019	0.016	0.016	0.023	0.019	0.028	0.019	0.021	0.025	0.028	0.021	0.026
17 C5	0.019	0.016	0.016	0.023	0.019	0.028	0.019	0.021	0.025	0.028	0.021	0.026
18 C6	0.019	0.016	0.016	0.023	0.019	0.028	0.019	0.021	0.025	0.028	0.021	0.026
19 67	0.023	0.021	0.020	0.023	0.023	0.028	0.019	0.021	0.025	0.028	0.021	0.026
20 68	0.026	0.023	0.023	0.030	0.026	0.035	0.028	0.030	0.035	0.038	0.030	0.035
21 D1	0.021	0.019	0.018	0.025	0.016	0.031	0.021	0.023	0.027	0.031	0.023	0.023
22 C. torquatus	0.038	0.035	0.037	0.040	0.035	0.048	0.040	0.038	0.042	0.050	0.042	0.040
23 C. rionegrensis	0.050	0.048	0.052	0.055	0.050	0.060	0.055	0.058	0.064	0.065	0.058	0.055
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
13 C1		_										
14 C2	0.	002	-									
15 C3	0.	002 0.	005	-								
16 C4	0.	002 0.	005 0.	005	-							
17 C5	0.	002 0.	005 0.	005 0.	005	-						
18 C6	0.	005 0.	007 0.	008 0.	007 0.	007	-					
19 C7	0.	007 0.	010 0.	010 0.	010 0.	010 0.	012	-				
20 C8	0.	012 0.	014 0.	015 0.	014 0.	014 0.	016 0.	019	-			
21 D1	0.	010 0.	012 0.	012 0.	012 0.	012 0.	014 0.	017 0.	021	-		
22 C. torquatus	0.	033 0.	035 0.	038 0.	035 0.	036 0.	035 0.	041 0.	045 0.	023	-	
23 C. rionegrens	is 0.	043 0.	045 0.	048 0.	045 0.	046 0.	045 0.	050 0.	053 0.	038 0.	026	-

3.3 Variación dentro y entre las poblaciones

Los haplotipos encontrados en cada población y sus frecuencias se muestran en la tabla 6 En las tablas 7 y 8, se indica cómo y cuáles de éstos son compartidos entre las poblaciones. La muestra procedente de la localidad de Cuchilla Alta es monomórfica, compartiendo su único haplotipo con la localidad de Solís. Solís fue la localidad más variable, con mayor número de haplotipos (5) y más haplotipos compartidos con otras poblaciones (3 haplotipos compartidos con 4 poblaciones). En general el número medio de haplotipos presentes por población fue de 2.64 y la frecuencia media de haplotipos por población 0.38.

	Tamaño	Número			
	muestral	haplotipos	Haplotipos		Frecuencias
Limetas	10	2	A1 A5		0.900 0.100
Arazatí	9	3	A2 A4 A6		0.111 0.111 0.778
Penino	7	3	C5 A3 A4		0.143 0.714 0.143
Carrasco	10	3	B2 B3 B1		0.200 0.100 0.700
Roosevelt	11	3	B1 B2 B5		0.727 0.182 0.091
Cuchilla Alta	10	1	B6		1
Solís	10	5	B1 B4 D1 C2 B6		0.100 0.600 0.100 0.100 0.100
Chihuahua	9	3	B5 D1 C6		0.111 0.444 0.444
José Ignacio	10	2	C1 C3		0.900 0.100
Lag Rocha	3	2	C2 C5		0.333 0.667
Valizas	8	2	C4 C7		0.500 0.500
Núme	ero medio de	e haplotipos p	or población	2.64	

TABLA 7. Resumen de los haplotipos encontrados por población de C. pearsoni y sus frecuencias.

Los valores de diversidad nucleotídica (ð), θ_w , y los resultados de las pruebas de neutralidad se encuentran resumidos en la tabla 9. La población que presenta mayores valores de ð y θ_w es Solís (5,76 y 5,66, respectivamente), seguida en orden decreciente de θ_w por Chihuahua, Penino y Arazatí. Para la mayoría de las poblaciones los valores de *D* fueron negativos, exceptuando a Valizas, Chihuahua y Solís. Los valores significativamente diferentes de cero ocurrieron en las localidades de Limetas, Penino (p<0,05) y Valizas (p<0,01), y valores marginales para Roosevelt (p<0,068). En cuanto a los valores de *F*_s fueron positivos y altos, a excepción de Carrasco y José Ignacio que presentaron valores negativos pero cercanos a cero, si bien ninguno de éstos fue significativo.

TABLA 8. Haplotipos compartidos entre pares de poblaciones. NP: número total de poblaciones con las que comparte haplotipos, NH: número total de haplotios compartidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Limetas											
Arazatí											
Penino		A4									
4. Carrasco											
5. Roosevelt				B1 B2							
Cuchilla Alta											
7. Solís				B1	B1	B6					
8. Chihuahua					B5		D1				
9. Jose Ignacio		0-									
10.Lag. Rocha		C5							C5		
11.Valizas											
NP	0	1	2	2	3	1	4	2	1	2	0
NH	0	1	1	2	3	1	3	2	1	1	0

TABLA 9. Se muestran los valores de \mathbf{q}_{w} , δ , *D* (Tajima 1989) y F_s (Fu 1997) para cada una de las poblaciones estudiadas de *C. pearsoni.* *: p<0,05, **: p<0,01, ns: no significativo, m: marginal (0,10<p<0,05). No se incluye la población de Cuchilla Alta por ser monomórfica.

Nombre de las poblacioes	¶w	P	D	Fs
Limetas	1,41	0,80	-1,67 *	1,74 ns
Arazatí	3,68	2,89	-1,00 ns	2,73 ns
Penino	4,08	2,86	-1,61 *	2,09 ns
Carrasco	0,71	0,67	-0,18 ns	-0,27 ns
Roosevelt	1,71	1,05	-1,46 m	0,69 ns
Solís	5,66	5,76	0,08 ns	1,95 ns
Chihuahua	4,42	4,78	0,39 ns	4,31 ns
José Ignacio	0,35	0,20	-1,11 ns	-0,34 ns
Laguna Rocha	0,67	0,67	0 ns	0,20 ns
Valizas	1,54	2,29	2,10 **	3,93 ns

3.4 Estimaciones de flujo génico

En la tabla 10 y la figura 7, se muestran los valores de distancias (en km) y flujo génico (*Nm*) estimados entre pares de poblaciones. La prueba de Mantel detectó una correlación negativa significativa (p<0,015) entre esas dos variables, que se representa gráficamente en la figura 7. Esto sugiere un patrón de aislamiento por distancia. Lo mismo puede observarse sutilmente de la tabla de haplotipos compartidos entre poblaciones (tabla 8), éstos se encuentran sobre la diagonal, es decir, entre localidades vecinas.

Los resultados del programa Migrate (ver Apéndice) muestran valores de verosimilitud (LnL) mayores para el modelo complejo de 121 parámetros (estimaciones de tamaño poblacional de todas las poblaciones y las tasas de migración en ambos sentidos) estando éste entre 27 y 34, en las 5 realizaciones). Lo siguen al mismo nivel, los modelos "piedras de paso" tanto simétrico (21 parámetros) como no simétrico (51 parámetros), con valores de verosimilitud el rango de 9 a 13 y de 5 a 12, respectivamente (tres realizaciones de cada uno). El modelo de menor ajuste fue el de islas (dos parámetros), con verosimilitud en el rango de 0.7 y 2, correspondiendo éste último valor al modelo que estimó tasas de migración menores. Como es un sistema neutral las verosimilitudes mayores corresponden a los modelos con mayor cantidad de parámetros estimados. Sería posible poner a prueba la significación de los modelos anidados sabiendo que -2 Δ LnL se distribuye aproximadamente como χ^2 con tantos grados de libertad como la diferencia del número de parámetros estimados por los modelos a comparar. En este caso la dificultad radica en que para cada modelo a evaluar, las diferentes ejecuciones del programa arrojan distintos valores de verosimilitud, convergiendo a un rango amplio de los mismos que impide la comparación directa. Si se compara de modo conservador los valores de verosimilitud más bajos de los modelos complejos con los valores más altos de los modelos simples anidados, no da significativa la diferencia en ningún caso (datos no mostrados).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Limetas		110	117	206	204	248	259	302	325	356	392
2. Arazatí	0,17		84	96	94	140	150	193	218	252	291
3. Penino	0,23	0,38		45	46	92	102	136	165	205	251
4. Carrasco	0,16	0,31	0,39		3	31	60	100	127	165	209
5. Roosevelt	0,05	0,14	0,17	<u>10⁷</u>		50	61	101	128	16	210
6. Cuch.Alta	0,02	0,06	0,08	0,22	0,05		11	54	78	115	159
7. Solís	0,18	0,31	0,44	<u>1,11</u>	0,82	0,51		44	68	105	149
8. Chihuahua	0,23	0,25	0,57	0,44	0,25	0,15	0,63		30	73	121
9. Josélgnacio	0,22	0,23	0,52	0,39	0,22	0,13	0,45	<u>2,10</u>		43	92
10. Lag. Rocha	0,07	0,14	0,34	0,32	0,08	0,02	0,39	<u>1,16</u>	<u>6,34</u>		30
11. Valizas	0,10	0,15	0,28	0,29	0,12	0,05	0,36	0,95	<u>2,32</u>	0,61	

TABLA 10. Comparaciones pareadas de los cálculos de distancias en km (sobre la diagonal) y estimaciones del número de migrantes por generación (*Nm*, valores debajo de la diagonal).



FIGURA 7. Representación gráfica del ajuste de los datos a un modelo de aislamiento por distancias. Se muestra la ecuación de la recta. *Nm* es el número de migrantes por generación.

Una descripción cualitativa de estos modelos muestra como todos los modelos estimaron los θ s (proporcionales a los tamaños poblacionales, si μ es constante) en el orden de 10⁻³. En el modelo complejo la mayoría de las tasas de migración son prácticamente 0, existiendo también valores menores a 1 en algunos pares de poblaciones sin llegar a una convergencia a este nivel. El modelo de piedras de paso simétrico muestra valores de *Nm* bastante menores a 1 para los diferentes pares de poblaciones con excepción del par Carrasco-Roosevelt, que en algunos casos llega a valores cercanos aunque menores a un migrante por generación. El modelo de piedras de paso asimétrico muestra asimetrías de varios órdenes de magnitud en la estimación de *Nm*, a excepción de los pares Limetas-Arazatí, Roosevelt-Carrasco y Chihuahua-Solís, que de todas formas son bajos. Por último, el modelo de islas estima una migración próxima a 0.01 migrantes por generación.

3.5 Estudio de la variabilidad entre cariomorfos

En la tabla 11, se muestran los resultados del análisis de varianza molecular para todas las poblaciones agrupadas según cariomorfo. El mismo se obtuvo *i*) computando las distancias genéticas entre haplotipos y sus frecuencias, y *ii*) teniendo en cuenta únicamente las frecuencias de los haplotipos como información, convirtiéndose en el cómputo de los estadísticos *F* convencionales. Ambos análisis coinciden en rescatar que la mayor parte de la variación está asociada a la diferenciación poblacional (34,31 y 54,83 % de la variación, respectivamente) seguida por la variación dentro de las poblaciones (31,75 y 42,87 % de la variación, respectivamente). Éstos componentes de la varianza son altamente significativos en ambos análisis. El nivel de los cariomorfos es el que menos explica la variación encontrada (33,94 y 2,3 %, respectivamente), siendo altamente significativa cuando se consideran las distancias genéticas entre haplotipos.

El tiempo de divergencia neto entre cariomorfos estimado por el programa M-DIV está en el rango de 3.96 y 0.48, con un promedio de 2.41 (tabla 12). En este caso el tiempo es medido en unidades de N_{ef} generaciones, siendo N_{ef} el tamaño efectivo de la población ancestral y las descendientes contando solamente las hembras. **TABLA 11.** Resultados del AMOVA. F_{SC} : diferenciación entre poblaciones dentro de los cariomorfos, F_{ST} : diferenciación poblacional respecto al total y F_{CT} : diferenciación entre cariomorfos. **= muy significativo (p<0.01), ns = no significativo.

	g.d.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación					
Entre cariomorfos	4	11,34	0,011	2,30	F _{CT} : 0.023ns				
Entre poblaciones del mismo cariomorfo	6	15,11	0,268	54,83	F _{SC} : 0,561*** F _{ST} :				
Dentro de poblaciones	86	18,04	0,210	42,87	0.571***				
Total	96	44,49	0,489						

Computando solo las frecuencias haplotípicas

Computando las distancias entre haplotipos y sus frecuencias.

	g.d.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación	
Entre cariomorfos	4	187,43	1,640	33,94	F _{CT} : 0,339**
Entre poblaciones del mismo cariomorfo	6	94,81	1,658	34,31	F _{SC} : 0,519***
Dentro de poblaciones	86	131,93	1,534	31,75	с _{вт} 0,683***
Total	96	414,17	4,832		

TABLA 12. Estimaciones de los tiempos de divergencia netos (escalados en N_{ef}) entre las poblaciones estudiadas de *C. pearsoni* mediante el programa M-DIV (Nielsen & Wakeley 2001).

	70a	58-56	70b	66-64	70c			
70a								
58-56	2,20							
70b	1,74	2,86						
66-64	2,00	3,96	2,56					
70c	2,36	3,64	2,30	0,48				
promedios								
por cariomorfo	2,08	3,17	2,37	2,20	2,20			
	promedio global = 2,41							



3.1 Interpretación de los resultados

3.11 Variación genética y diversidad de haplotipos

La variación genética encontrada es mayor a la reportada en los trabajos anteriores en el género con ADN mitocondrial (D´Elía 1996, Giménez *et al.* 2002), de acuerdo con la naturaleza no codificante de la Región de Control. Asimismo, la relación transiciones / transversiones fue la esperada para el ADN mitocondrial con un sesgo mayor a favor de las primeras (Aquadro & Greenberg 1983, Bickham *et al.* 1996, Lara *et al.* 1996, D´Elía 1996). Las divergencias mayores fueron las encontradas en la comparación con *C. rionegrensis*, mientras que algunas de las comparaciones con *C. torguatus* se encuentran dentro del rango de variación intraespecífico de *C. pearsoni.*

La variación dentro de los haplotipos de *C. pearsoni* es alta, correspondiente una antigüedad de decenas a cientos de miles de años para los linajes más divergentes. La divergencia empírica (*p*) puede ser convertida en tiempo (*t*) por la ecuación $t = (1, 2 \ 10^5) \ x$ (*p*), asumiendo una calibración de reloj molecular de la región del 8.4 % de divergencia en la secuencia por millón de años (MA) (divergencia media estimada para humanos Vigilant *et al.* 1989, aunque se han encontrado tasas mayores y menores en otros géneros, Hoelzel *et al.* 1991 y ver Avise 2000). El resultado correspondería a una tiempo de divergencia máximo de 438.000 años para el par de haplotipos más divergentes dentro de *C. pearsoni.* Seguramente esto sea una sobrestimación, debido a que la tasa para el género *Ctenomys* ha sido estimada en 9.6% por MA (Contreras & Bidau 1999) en el gen del citocromo b mitocondrial, por lo que en la Región de Control debería ser mayor.

Sin embargo, estudios paleogreográficos 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 2002, García-Rodríguez & Witkowski 2003, Cavallotto *et al.* 1999). Por lo tanto, la colonización de tales localidades por esta especie debió ser posterior, y la diferenciación presente reflejaría, al menos en parte, polimorfismos ancestrales que predatan a la separación de las poblaciones. De todos modos, la divergencia entre haplotipos no debe igualarse a la divergencia entre poblaciones

50

3.1.2 Variación dentro y entre las poblaciones

A pesar de que en algunas poblaciones la prueba de Tajima presentó valores significativamente menores que cero, la prueba de Fu (que en estos casos es más sensible), no mostró apartamientos significativos de la neutralidad en ninguna de las poblaciones, sugiriendo que el locus no está sometido a apartamientos de la neutralidad y que las poblaciones no han sufrido una expansión poblacional, al menos reciente. La pueba de Tajima detectó un apartamiento significativo en la población de Valizas, compuesta por dos haplotipos moderadamente divergentes en igual proporción. Sin apartamientos de la neutralidad (ver también William *et al.* 1995), el resultado no se podría interpretar como consecuencia de la selección manteniendo estos haplotipos en alta frecuencia. Es más plausible suponer una conformación mixta de esta población, a partir de otras en un tiempo reciente. Más concretamente, la muestra Valizas está compuesta por ejemplares tomados en localidades próximas lo que podría ser el origen de las desviaciones.

Los análisis de la variación genética por población indican estabilidad prolongada desde el establecimiento de poblaciones en todas las localidades estudiadas. Para comprender las disparidades en los resultados de las pruebas de Fu y Tajima es preciso considerar su diferente sensibilidad. El primero de ellos es muy potente para detectar barridas selectivas (es decir *Hitchhiking selection*, cuando una mutación favorable en un locus arrastra consigo por ligamiento una población entera de variantes neutras) o crecimiento rápido en el tamaño poblacional (casos que aumentan el número de variantes de baja frecuencia), mientras que el segundo ha mostrado mejores resultados comparativos frente casos de selección de fondo (reducción de variantes en un locus neutro por ligamiento con loci bajo selección donde se eliminan las mutaciones deletéreas) (Fu 1997).

51



FIGURA 8. Valores de **a**) estimaciones de $(\theta_W y \pi) y$ **b**) los estimadores F_s (Fu 1997) y *D* (Tajima 1987), para las diferentes poblaciones estudiadas: 1:Limetas, 2:Arazatí, 3:Penino, 4:Carrasco, 5:Roosevelt, 6:Cuchilla Alta (monomórfica), 7:Solís, 8:Chihuahua, 9:José Ignacio, 10:Laguna de Rocha y 11:Valizas.

La tabla 8 muestra como, en este sistema aparentemente en equilibrio, los haplotipos compartidos tienden a ubicarse entre poblaciones adyacentes. A su vez, las poblaciones de los extremos no presentan haplotipos compartidos y la variabilidad en éstas es de moderada a baja. En la figura 8, se aprecia cualitativamente otra reducción de la variabilidad dentro del cariomorfo 2n=56 y 58, con su máxima expresión en Cuchilla Alta, única población monomórfica.

3.1.3 Relaciones ente haplotipos

A pesar de que el índice de consistencia (C.I. = 0.79) del árbol hallado señala la existencia de un nivel de homoplasia dentro de los datos, existe una señal clara en los mismos. Por un lado, los árboles encontrados se encuentran bastante alejados de la distribución de frecuencias del número de pasos de árboles generados al azar (datos no mostrados). Por otro lado, el C.I. aumenta a 0.80 excluyendo las secuencias correspondientes al grupo externo.

El árbol de consenso obtenido por Máxima Parsimonia fue básicamente coincidente con el obtenido por distancias. La mayoría de los nodos no cuentan con un apoyo de *Bootstrap* importante, a excepción del que relaciona todos los haplotipos de *C. pearsoni* en un grupo monofilético. Este resultado es consistente con el estatus específico de *C. pearsoni*, así como con su semejanza morfológica (Altuna & Lessa 1985, D'Elía *et al.* 1992, Lessa & Langguth 1983), citogenética (Villar 2000) y de secuencias del gen del citocromo b (D'Elía *et al.* 1999) con *C. torquatus*. De todos modos esta última especie está representada aquí por una única secuencia, lo que impide evaluar si *C. pearsoni* y *C. torquatus* son monofiléticas recíprocas.

Se podría considerar el haplotipo D1 como el más ancestral de los encontrados, basándose en que la raíz del árbol del mtDNA se infiere en ese lugar, indicando que es que presenta menor divergencia con los haplotipos del grupo externo. Las distancias entre algunos haplotipos son importantes (tabla 5), y el esquema de la figura 6 muestra que la reconstrucción más parsimoniosa de sus relaciones necesariamente infiere nodos intermedios teóricos no presentes en la muestra.

No se encontró ninguna población, cariomorfo, o grupo de cariomorfos (cariomorfos agrupados por su semejanza, especificados en la sección 2.4.6) que fuese monofilético. La única excepción es Cuchilla Alta, por ser monomórfica, pero aún comparte el haplotipo B6 con Solís (figura 6, tabla 8). En todos los casos éstos grupos son polifiléticos. El mismo patrón también fue encontrado por Giménez *et al.* (2000) entre especies correntinas de *Ctenomys* (*C. dorbignyi*, *C. roigi*, *C. perrensiy* otras cuatro formas innominadas aún). Algunos haplotipos bien distantes se encuentran en alta frecuencia y son compartidos por poblaciones pertenecientes a diferentes grupos de cariomorfos, como es el caso del B1 (tabla 8). También, existen haplotipos exclusivos de algunas poblaciones, como Limetas y Valizas, que muestran cierta diferenciación poblacional. Esto se corrobora con otros análisis que se discuten más adelante. Los haplotipos del grupo A pertenecen a las localidades del cariomorfo 2n=70a de *C. pearsoni*, y forman un grupo monofilético.

Para interpretar estos resultados es necesario considerar que los procesos demográficos, tanto contemporáneos como históricos, y la estructura geográfica de las poblaciones de una especie, modelan las genealogías mitocondriales. En un sistema neutral, el aislamiento de las poblaciones conduce inevitablemente a su diferenciación debido a la pérdida por azar de haplotipos (mayor cuanto menor sea el tamaño poblacional), así como por el surgimiento por mutación de nuevos haplotipos exclusivos de cada población. El flujo génico actuaría como un agente homogenizador, intercambiando haplotipos entre poblaciones, aunque podría potencialmente conducir a la divergencia entre poblaciones a través de la creación y dispersión de combinaciones únicas de alelos (Slatkin 1987).

El patrón encontrado en *C. pearsoni* se caracteriza por grandes distancias entre algunas ramas del árbol mitocondrial, con linajes de alta frecuencia codistribuidos en una gran área geográfica. Teóricamente, este patrón es esperable en especies con Ne grande y gran flujo génico en el pasado. Entonces, algunos linajes separados antiguamente, pueden ser retenidos por azar a expensas de otros que se pierden. Bajo aislamiento completo entre las poblaciones, la ausencia de monofila recíproca entre éstas, junto con la divergencia pronunciada en algunos pares de haplotipos y la ausencia de haplotipos intermedios serían evidencia a favor de un origen relativamente reciente de estas poblaciones (Avise 2000). Sin embargo, la presencia de algunos haplotipos exclusivos por población, así como el equilibrio de las poblaciones y el patrón de equilibrio por distancia entre ellas, son indicio de estabilidad de las poblaciones en su conformación actual que se discutirán más adelante.

3.1.4 Estimaciones de flujo génico

El equilibrio entre la pérdida de alelos debido a la deriva local y su reemplazo por flujo génico en el conjunto de poblaciones que han colonizado un área se alcanza luego de un tiempo de establecido un régimen de migración entre ellas. Las poblaciones intercambiarán más migrantes con las que se encuentran próximas que con las más distantes (modelo de "piedras de paso"), lo que conduce un patrón semejante al de "aislamiento por distancia" (Wright 1943). De esta forma, las poblaciones se diferenciarán más en un locus neutral cuanto mayor sea la distancia geográfica que las separa. Esta predicción, ha sido confirmada por varios estudios empíricos (Steinberg & Patton 2000). Si las poblaciones quedaran completamente aisladas inmediatamente luego de su separación, no se alcanzaría ese equilibrio y no evolucionaría tal patrón; la proximidad genética será alta al principio, y por tanto también lo serán las estimaciones de flujo génico, pero éstas disminuirán rápida e independientemente de la distancia geográfica (Slatkin 1993).

Una especie que presente dispersión restringida debería exhibir un patrón de aislamiento por distancia si ha pasado un tiempo suficiente que le permita aproximarse a un equilibrio, y tiene que haber ciertos indicios de aislamiento por distancia si la población ha ocupado su rango presente por un tiempo sustancial (Slatkin 1993).

Esto es lo que sucede en la especie *C. pearsoni*. El patrón de aislamiento por distancia es evidente al graficar el logaritmo de los valores de *Nm* entre pares de poblaciones contra el logaritmo de los valores de distancias geográficas pareadas (figura 7). Además, la pueba de Mantel mostró una correlación altamente significativa entre la matriz de distancia geográfica y la de flujo génico. Esto brinda evidencia acerca de la estabilidad de estas poblaciones en sus asentamientos actuales, debido a que debe haber

pasado el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Habría existido por lo tanto un intercambio de migrantes entre pares de poblaciones, directamente entre las adyacentes como Roosevelt y Carrasco, y en la mayoría de ellas a través de poblaciones intermedias, incluyendo aquellas no muestreadas.

Por otra parte, el equilibrio tiene consecuencias importantes sobre las estimaciones de parámetros genético-poblacionales, ya que la mayoría son derivados considerando que éste existe. Cuando estas asunciones son violadas, las estimaciones de flujo génico no son confiables, y no reflejan los niveles actuales de flujo, sino una conexión histórica entre las poblaciones.

La mayor estimación de flujo génico mayores perteneció al par Carrasco-Roosevelt, que en este sentido parece comportarse como una población única, a pesar de las diferencias cariotípicas reportadas (tabla 10). Otros valores de flujo génico alto, *Nm*>1, fueron para los pares de poblaciones del este, entre las poblaciones de Chihuahua, José Ignacio, Laguna de Rocha y Valizas. Una posible interpretación de los resultados es la colonización reciente de esta región, manteniéndose la diferenciación genética previa y el equilibrio global. Esta visión cuenta con evidencia adicional de los tiempos netos de divergencia estimados entre cariomorfos, que se discute más adelante.

Los valores de verosimilitud de modelos probados con el programa *Migrate*, así como sus estimaciones de flujo génico muestran una tendencia que coincide con el escenario anterior. Se destaca el mejor ajuste de los modelos de piedras de paso frente a los modelos de islas (Apéndice 7.3), así como estimaciones de las tasas de migración bajas para todos los pares de poblaciones. Es decir que los niveles de flujo génico son bajos o despreciables, excepto para el par de poblaciones formado por Carrasco y Roosevelt. Estos valores, sin embargo, deberían ser tomados como una tendencia, ya que no se probó la convergencia de los modelos y además los resultados se basan en un único locus (Beerli & Felsenstein 1999).

3.1.5 Estudio de la variabilidad entre cariomorfos

Uno de los resultados más interesantes de este estudio es el aportado por el AMOVA, porque resume gran parte de la información anteriormente discutida (tabla 11). El porcentaje de la variación debida a la diferenciación entre grupos cromosómicos es baja (2,3 %) y no significativa en el caso de considerar únicamente la información de frecuencias de haplotipos, mientras que es moderada (33,64%) y significativa si consideramos al mismo tiempo la distancia genética entre haplotipos. Esto se explica por el hecho que, como se nota el esquema de la figura 6, los haplotipos tienden a ser más similares dentro de grupos cromosómicos que entre ellos. En general, es mayor la diferenciación por población que entre cariomorfos.

De hecho, la mayor parte de la variación (55% sin considerar las distancias entre haplotipos y 34 % considerándola) se encuentra entre las poblaciones estudiadas, lo que muestra la gran diferenciación a este nivel, que incluye la presencia de algunos haplotipos exclusivos, consecuencia de la permanencia de las poblaciones en su distribución actual. La otra parte importante de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones, debido a la presencia en éstas de haplotipos en muchos casos bien divergentes.

Por causa de la estructura poblacional que tienen los roedores subterráneos, comúnmente se presume que la variación genética está mayormente repartida entre, mas que contenida dentro de las poblaciones (Steinberg & Patton 2000), lo que algunos trabajos empíricos corroboran (Faulkes *et al.* 1997, Patton & Smith 1990), mientras otros no (Gallardo y Palma 1992, Gallardo & Köller 1992, Apfelbaum *et al.* 1991). La comparación con los resultados obtenidos para C. *pearsoni* es difícil, porque en la mayoría de las publicaciones se trata de datos alozímicos, y además, este trabajo incluye la variación dentro de variantes cariotípicas. Es importante destacar que el patrón encontrado se aparta mucho de lo esperado según los modelos de especiación cromosómica que proponen para su evolución el pasaje de las poblaciones por una restricción en el tamaño poblacional o "cuello de botella".

Como algunas separaciones del árbol del gen normalmente preceden a la separación de las poblaciones, los tiempos de coancestría de los haplotipos son iguales o mayores al tiempo de separación de las poblaciones, es decir son una cota superior para la misma. Los resultados del programa M-DIV están corregidos para polimorfismos ancestrales en la estimación de tiempos de divergencia (Nielsen & Wakeley 2001). El tiempo de divergencia neto promedio entre todas las poblaciones es de 2,41 (medido en 2N_{ef} generaciones) (tabla 12, figura 9). El tiempo medio esperado para alcanzar la monofilia escalado de esta forma es 2, pero en todas las realizaciones puede tomar diferentes valores, y ésta es una particular. Si el mismo proceso sucediera nuevamente,

57

probablemente se obtendrían valores diferentes. Además, estos valores esperados son en ausencia de flujo génico (aislamiento estricto). En este caso, hay cierta diferenciación entre cariomorfos sin llegar a su monofilia, pero sí al equilibrio (valores de D y F_s que no se apartan significativamente de cero) y a un patrón de aislamiento por distancia. Es esperable que con el tiempo se alcance la monofila a este nivel.



Figura 9. Tiempos de divergencia netos estimados entre pares de cariomorfos. Ver tabla 12 por detalles.

Finalmente, los tiempos de divergencia netos entre los cariomorfos 2n=66-64 y las poblaciones del Departamento de Rocha son los menores (0,48, tabla 12). Esto es coincidente con las estimaciones de flujo génico más altas para estos pares de poblaciones y con la dinámica histórica que ha tenido la geografía de la región.

3.2 Modo de diferenciación en C. pearsoni.

Los resultados, rechazan la hipótesis de diferenciación cromosómica clásica según la cual los reordenamientos cromosómicos deberían haberse fijado en poblaciones de tamaño muy reducido, que permitieran la fijación de variantes cariotípicas levemente deletéreas en heterocigosis. En este caso, el tamaño efectivo de las poblaciones fundantes sería muy bajo, y se alcanzaría rápidamente la monofila recíproca en el ADN mitocondrial, o al menos la monofilia de los cariomorfos derivados. Asimismo, la teoría predice que la variación genética estaría mayormente particionada entre formas cromosómicas, más que contenida dentro de las poblaciones con igual cariotipo.

En primer lugar, todas las poblaciones y cariomorfos estudiados, con excepción de la localidad Cuchilla Alta que es monomórfica, son polifiléticos en su ADN mitocondrial y la diferenciación entre cariomorfos es de baja a moderada. Además, la variación genética es similar dentro y entre poblaciones, y menor entre cariomorfos. La variación genética al tener en cuenta la distancia entre haplotipos está distribuida en forma pareja *i*) dentro de las poblaciones, que presentan haplotipos muy divergentes, *ii*) entre las poblaciones de igual cariotipo, lo que refleja una diferenciación poblacional alta y *iii*) entre cariomorfos. Si la fijación de estas formas cromosómicas hubiera estado mediada por el pasaje de cuellos de botella, esta última debería predominar frente a las dos anteriores.

Por otro lado y como se discutió anteriormente, luego de la colonización de cierta región por una especie, todas las poblaciones tienen cierta semejanza genética, haciendo que se estimen valores de flujo génico altos entre poblaciones (D'Elía *et al.* 1998). Posteriormente, la diferenciación local por deriva en presencia de bajo flujo génico conduce a un patrón de aislamiento por distancia, que ha sido alcanzado por estas poblaciones. Esto implica que estas poblaciones llevan un tiempo considerable de estabilidad. La evidencia es reafirmada además debido a que ninguna de las pruebas manejadas para detectar procesos demográficos importantes, como los involucrados en una colonización reciente, fueron significativas en todas las poblaciones. La mayoría de los modelos de especiación cromosómica incluyen en cierta medida una fase de aislamiento de demes pequeños para permitir la fijación de esos rearreglos, cuyas huella genética no se verifican en este caso.

Por lo tanto, la diferenciación cariotípica ha ocurrido sin necesidad de pasar las poblaciones por una restricción en el tamaño poblacional. Cabe preguntarse entonces, qué importancia ha tenido la estructura poblacional en la fijación de nuevos rearreglos cromosómicos, así como el rol que cumplieron o cumplen estos rearreglos en la diferenciación de las poblaciones.

Es llamativa la ausencia de monofilia a nivel del ADN mitocondial en presencia de direfencias cariotípicas fijas. Como se discutió en los párrafos anteriores, obtener estos patrones de variación es altamente improbable si los rearreglos cromosómicos fueran levemente deletéreos en herocigosis. Lo mismo sucede en caso de rearreglos cromosómicos neutros, ya que el tiempo promedio requerido para alcanzar la monofilia en éstos, al igual que para los genes autosómicos diploides, es cuatro veces mayor que para el ADN mitocondrial. Una posibilidad es invocar algún mecanismo que promueva la fijación de ciertos rearreglos particulares nuevos, como selección directamente o indirectamente sobre alguna región ligada a un nuevo rearreglo o deriva meiótica. De esta forma, la probabilidad de fijación de estos rearreglos aumentaría.

El desafío entonces es descifrar los posibles factores demográficos que puedan haber conducido al arreglo observado de los linajes mitocondriales. Un escenario posible es el siguiente. C. pearsoni ha ocupado la región, en un régimen estable de flujo génico, permitiendo la diferenciación de sus poblaciones y alcanzando un equilibrio entre flujo génico y deriva local, que se refleja en el patrón de aislamiento por distancia y las pruebas de neutralidad aplicadas que resultaron ser no significativas. La colonización de los sitios actualmente ocupados por la especie ha sido posterior a la última transgresión holocénica hace aproximadamente 5.000 a 6.000 años. Al este de su distribución, la colonización habría ocurrido más recientemente, lo que explica los tiempos netos de divergencia menores y los mayores valores de flujo génico estimados entre poblaciones / cariomorfos de la región (y posiblemente, el apartamiento de neutralidad en la población de Valizas). Algo similar puede haber sucedido entre las poblaciones de Carrasco y Roosevelt. Estos procesos de colonización, tanto los más antiguos como los más recientes, no han afectado la estabilidad regional, manteniéndose el equilibrio en sus poblaciones y el patrón de aislamiento por distancia entre ellas. Actualmente las poblaciones se mantienen en un régimen de flujo génico bajo.

Los datos paleogeográficos existentes concuerdan con esta interpretación. Desde la última transgresión del Holoceno hace 5.000 años, el nivel del mar ha descendido hasta el nivel actual en forma continua formando lo que actualmente es la costa de los Departamentos de Colonia y San José (Cavallotto *et al.* 1999). Mientras tanto en la costa atlántica, incluyendo al menos los Departamentos de Rocha y Maldonado, el nivel del mar bajó 0,7 m por debajo del actual aproximadamente entre los 3.900 y 3.600 años antes del

60

presente (García-Rodríguez 2002, García-Rodríguez & Witkowski 2003). Asimismo, existen variaciones locales reportadas, como una serie de oscilaciones de alta frecuencia del nivel del mar en Laguna Blanca, y en Laguna de Rocha dos transgresiones en los últimos 3.000 años. En la última, hace 2.500 años, el nivel del mar subió 2,5 m por encima del actual (García-Rodríguez & Witkowski 2003). La mayor semejanza dentro de los haplotipos del cariomorfo 2n=70a podría reflejar la mayor estabilidad de la región ocupada por este cariotipo, en contraste a lo sucedido en los Departamentos de Maldonado y Rocha.

Con respecto al sentido del proceso de diferenciación cariotípica, los resultados no contradicen la hipótesis planteada por Ortells *et al.* (1990). Esta propone que las formas actualmente conocidas como *C. pearsoni* y *C dorbignyi*, similares cariotípicamente con 2n=70 y NF=80, 84 u 82 (Ortells, 1990, García *et al.* 2000), representarían poblaciones "relictuales" que habrían originado en eventos independientes algunas formas de la región con menor 2n. Este cariomorfo sería el más ampliamente distribuido y el más "estable". Sin embargo, esto no estaría de acuerdo con la tendencia planteada para el género de evolucionar principalmente mediante fisiones Robertsonianas (García *et al.* 2000, Ortells 1995), con un aumento progresivo del número diploide.

En general, los modelos de especiación cromosómica hasta ahora propuestos no han prosperado (Rieseberg 2001, Spirito 1998). Además de ser criticados por la dificultad de la fijación de los nuevos rearreglos cromosómicos desventajosos en heterocigosis como se planteó en la introducción, se cuestiona de ellos: *i*) la observación que muchos rearreglos cromosómicos tienen poco efecto en la fertilidad (Sites & Moritz 1987), *ii*) la supuesta inefectividad de las diferencias cromosómicas como barreras al flujo génico (Futuyma & Mayer 1980, Spirito 1998) y *iii*) la creencia común de que las barreras precopulatorias o ecológicas surgen antes que los rearreglos cromosómicos en el proceso de especiación y por lo tanto son más probables causantes de la especiación (Schemske 2000, Schluter 1998).

Sin embargo, hay modelos que sortean esa dificultad, y que resultan en predicciones a nivel molecular bastante diferentes. Una excepción interesante y ampliamente aceptada, es el modelo de especiación mediante el cual cambios

Robertsonianos con heterosis negativa nula o despreciable conducen por acumulación a formas derivadas incompatibles (Baker & Bickham 1986).

Otra propuesta donde los rearreglos cromosómicos pueden surgir y establecerse en la población sin reducir la eficacia darwiniana de los heterocigotas que lo portan ha sido planteada en los últimos años (Rieseberg 2001), involucrando principalmente inversiones. En los modelos tradicionales, se asume que la recombinación entre cromosomas con estos rearreglos produce gametos desbalanceados o descendencia inviable y como consecuencia estableciendo una barrera reproductiva (Rieseberg 2001). Sin embargo, las inversiones podrían reducir la recombinación en la región cromosómica en cuestión e impedir el flujo génico para los cromosomas que portan el rearreglo, permitiéndolo en el resto. Lo mismo sucedería en la zona centromérica en un heterocigota Robertsoniano. Las diferencias seleccionadas se acumularán con mayor facilidad en las regiones que no recombinan y alguna de éstas (y no los reordenamientos cromosómicos en sí) causarán incompatibilidades en los híbridos, que completarán finalmente la especiación, aunque ésto puede tomar mucho tiempo (Rieseberg 2001, Rieseberg & Livingstone 2003).

Navarro & Barton (2003) muestran que las predicciones de este último modelo se cumplen, al menos en la divergencia del humano con su pariente más cercano, el chimpancé. Observan que las tasas de evolución en genes que se asientan en cromosomas que presentan un rearreglo estructural entre humano y chimpancé son el doble o triple que aquellas encontrada para genes que se encuentran en cromosomas colineales. Estos resultados son importantes por generar evidencia a favor, no sólo de una forma de especiación cromosómica más viable (Rieseberg 2001), sino también a favor de la especiación simpátrida o parapátrida, cada vez más relevantes en la Biología Evolutiva en las últimas décadas (Bush 1994, Schemske 2000, Via 2001). Según algunos autores estas alternativas promueven la diferenciación más rápidamente que la divergencia pasiva en alopatría (Kondroshov *et al.* 1998, McCune & Lovejoy 1998).

El evaluar la posibilidad estos modelos en roedores subterráneos es interesante, ya que son compatibles con la especiación simpátrida, o parapátrida, que hasta ahora parecía haber sido excluida en esos grupos (discutido en Steinberg & Patton 2000).

62

3.3 ¿Es *C. pearsoni* un caso particular dentro del género?

La idea de especiación cromosómica mediada por la estructura poblacional está fuertemente arraigada en la comunidad de investigadores que trabajan con el género *Ctenomys*. Sin embargo, las evidencias moleculares y citogenéticas no alcanzan para confirmarla. Por un lado, existen especies politípicas cromosómicamente, donde los híbridos entre estos rearreglos probablemente sean frecuentes y viables en las poblaciones naturales (Freitas 1997 y 2001, Gava & Freitas 2002, Ortells 1995) y en algunos casos se mantengan por selección (Braggio *et al.* 1999). Por otro lado, entre poblaciones/especies con diferente cariotipo se plantea la ausencia de diferenciación alozímica (Apfelbaum *et al.* 1991, Ortells & Barrantes 1994, Villar 2000), nucleotídica (Giménez *et al.* 2002, Mascheretti *et al.* 2000, y este trabajo) y en algunos casos morfológica (*C. dorbignyi* 2n=70, *C. perrensi* 2n=50 *y C. roigi* 2n=48; Ortells 1990).

Un análisis preliminar de estos resultados hace suponer que la fijación de rearreglos cromosómicos, si bien es común para ciertas especies del género (ver más adelante), no ha surgido por el pasaje de cuellos de botella de las poblaciones. Esto también cuestiona la condición de "nuevas especies" o "reservorio de variación genética única" de cada forma cromosómica de ciertas especies planteada por algunos autores (Altuna *et al.* 1999, Bidau *et al.* 1996).

Cabe preguntarse cómo surge esta variación, qué permite a este género la aparición recurrente de rearreglos cromosómicos y cómo han evolucionado los mismos. Rossi *et al.* (1995) plantearon que la heterocromatina constitutiva podría promover los reordenamientos cromosómicos. Sin embargo, algunos autores parecen no confirmarlo (Villar 2000, Novello *et al.* 1996). Más recientemente, Slamovits *et al.* (2001) hallaron una correspondencia entre las amplificaciones y deleciones recurrentes de un ADN satélite y la variabilidad cromosómica extrema entre especies cercanamente emparentadas. Es posible entonces que la amplificación, deleción y movimiento del ADN satélite promueva formación de rearreglos cromosómicos (Slamovits *et al.* 2001).

Por otro lado, se ha planteado que la evolución del género se ha dirigido principalmente mediante fisiones Robertsonianas y una reducción en paralelo de la heterocromatina (García *et al.* 2000, Mascheretti *et al.* 2000, Ortells 1995). Bajo esta hipótesis, no sería el cariomorfo 2n=70 el ancestral de *C. pearsoni*. Sin embargo, forzar la interpretación de la gran variabilidad cromosómica del género, con la presencia de "grupos de especies" muy diferentes a este nivel, a una única tendencia de cambio cromosómico, parece tener poco sentido.

La semejanza citogenética de *C. pearsoni* con *C. dorbignyi* (García *et al.* 2000, Ortells *et al.* 1990), así como de otras especies del género (*C. azarae - C. porteusi* Baggio *et al.* 1999), sugieren la necesidad de una revisión exhaustiva de la sistemática del género, que carece de criterios comunes para la delimitación de las especies existentes. La identidad citogenética ha sido atribuida por algunos autores a casos de especiación reciente (Baggio *et al.* 1999). Además, existen especies reconocidas en base a las diferencias cariotípicas, a pesar de que son idénticas en otros aspectos (Ortells 1990, Ortells & Barrantes, 1994). Aunque son reconocidas como diferentes taxa, bajo un criterio biológico de especie no habría bases reales para apoyar el estatus específico de muchas de éstas (García *et al.* 2000, Ortells 1995). La asociación entre diferencias cromosómicas y el establecimiento de una especie distinta es errónea si las bases genéticas de las incompatibilidades reproductivas no son las mismas que las de los rearreglos cromosómicos en sí (Lessa 2000). Sin estudios reproductivos no se puede afirmar que los diferentes cariotipos constituyan una barrera reproductiva o que sean polimorfismos estables, o que especies aparentemente idénticas posean barreras etológicas.

Por otro lado, si la diferenciación cromosómica en el género ha estado mediada por la formación de poblaciones pequeñas aisladas, las especies incipientes con nuevos rearreglos cromosómicos tenderán a ser monofiléticas. En estas condiciones, la aplicación de un concepto filogenético de especie sería más apropiado para el género. Sin embargo, los trabajos realizados dentro de grupos de especies con alta variación cariotípica, como el que incluye a *C. pearsoni*, muestran que diferentes especies y formas cromosómicas consideradas como tales son polifiléticas (Giménez *et al.* 2002, Mascheretti et al. 2000). Una interpretación alternativa más simple sería adoptar escenarios de evolución cromosómica similares al propuesto para *C. pearsoni*, en donde la fijación de nuevos rearreglos cromosómicos es frecuente, pero no está mediada por la formación de poblaciones pequeñas y aisladas. En estos casos, la diferenciación cromosómica no permitiría, sin mas el reconocimiento de especies, ya sea según el concepto biológico (Mayr 1963) o el filogenético (Cracraft 1983).

Es posible que una revisión e integración general los resultados obtenidos durante las últimas dos décadas sobre el género conduzca a que el número de especies nominales en el mismo disminuya considerablemente. Por lo tanto, habría que evaluar si verdaderamente el caso *Ctenomys* es tan inusual, en cuanto a su diversidad cariotípica y número de especies (Cook *et al.* 2000, Cook & Lessa 1998).

También es importante notar, que hay grupos de especies que presentan mayor estabilidad cromosómica, como es el "grupo mendocinus" (*C. mendocinus, C. azarae, C. australis, C. chasiquensis, C. portensi, C. flamarioni*). Esta agrupación, ha sido apoyada por datos moleculares (D'Elía *et al.* 1999, Lessa & Cook 1998, Mascheretti *et al.* 2002), citogenéticos (Braggio *et al.* 1999, Freitas 1994, Ortells *et al.* 1995), presencia de ADN satélite (Slamovits *et al.* 2001) y morfológicos (Contreras 1996, Vittulo *et al.* 1988) y muestra números diploides relativamente estables alrededor de los 44 y 48 (Freitas 1994, Massarini *et al.* 1991, entre otros). Otras especies son extremadamente variables (como *C. pearsoni, C. minutus, C. lami y C. perrensi,* citadas por Freitas 1997 y 2001, Ortells *et al.* 1990). García *et al.* (2000) proponen la hipótesis de que la variabilidad cariotípica podría estar asociada a una inestabilidad ambiental. Sin embargo, la información en general aún no es suficiente para rechazar o aceptar esa hipótesis. Una reclasificación del género en grupos monofiléticos de especies, algunos con limitada y otros con extensa variabilidad cromosómica, podría ser un gran avance para esclarecer la sistemática del mismo.

Por lo discutido anteriormente, *C. pearsoni* no es un caso aislado diferente a lo que sucede en el resto del género. Pertenece a un grupo de especies muy variable cromosómicamente, cuya variación cromosómica no se corresponde con la variación del ADN mitocondrial, y por ende su fijación no ha sido promovida por la estructura peculiar de sus poblaciones, al menos no según el planteo tradicional. Se requiere de un estudio detallado que incluya al menos todas las especies reconocidas dentro del grupo, que pueda arrojar luz sobre mecanismos que subyacen a esta variación y resolver la posible sinonimia de muchas de estas formas.

La "clásica" asociación entre cambio cromosómico, estructura poblacional y especiación en el género *Ctenomys*, y en roedores subterráneos en general, se invoca en la introducción de la mayoría de los trabajos sobre tucu-tucus, pero no se ha evaluado de forma adecuada. Queda aún mucho camino por recorrer. Es necesario dilucidar cuáles son las bases genéticas de los cambios cromosómicos, y qué influencia tienen éstos en el proceso de especiación en sí. Para ello, la genética de poblaciones puede ser una aproximación particularmente interesante para rechazar, reformular o confirmar las hipótesis discutidas (Lessa 2000, Steinberg & Patton 2000). En particular, hace falta concentrar los esfuerzos en estudiar los grupos de especies de mayor variación cariotípica, como es el caso de *C. pearsoni* y sus especies relacionadas.

CONCLUSIONES

- La variación entre de los haplotipos de *C. pearsoni* fue alta, reflejando en parte polimorfismos ancestrales que preceden a la separación de las poblaciones.
- La reconstrucciones filogenéticas por parsimonia y por distancias establecieron el estatus monofilético de *C. pearsoni*, lo que apoya la identidad de la especie.
 Además, la proximidad con *C. torquatus* corrobora estudios anteriores basados en su semejanza morfológica, citogenética y de secuencias del gen del citocromo b con esa especie.
- No se encontró ninguna población (exceptuando Cuchilla Alta por ser monomórfica), cariomorfo, o grupo de cariomorfos monofilético. En todos los casos estos grupos son polifiléticos en su ADN mitocondrial.
- Los análisis de la variación genética por población mostraron estabilidad en todas las localidades estudiadas, sin apartamientos significativos de la neutralidad. La mayoría de los haplotipos compartidos estuvieron presentes entre poblaciones adyacentes, siendo las de los extremos de la distribución las más diferenciadas.
- La prueba de Mantel mostró una correlación significativa entre las matriz de distancias geográficas y la de flujo génico, por lo que debe haber pasado el tiempo suficiente para que las poblaciones alcancen un equilibrio entre migración y flujo génico.
- Los valores de flujo génico estimados para pares de poblaciones son bajos o nulos, con algunas excepciones como el par Carrasco-Roosevelt, que se comportan como una población única, y el grupo de poblaciones del este de Maldonado y Rocha, que tienen una relación más estrecha entre ellas.
- La variación genética está distribuida igualmente *i*) dentro de las poblaciones, *ii*) entre las poblaciones y *iii*) entre cariomorfos.

En definitiva, el conjunto de los resultados rechazan la hipótesis de diferenciación cromosómica clásica según de la cual los cariomorfos deberían haber pasado por poblaciones de tamaño muy reducido que permitieran la fijación de variantes cariotípicas levemente deletéreas en heterocigosis.

PERSPECTIVAS

El trabajo desarrollado en esta tesis intenta dilucidar los patrones de diferenciación poblacional en *C. pearsoni*, una especia extensamente estudiada en Uruguay. Asimismo, no es más que un abordaje particular, y una visión completa requiere de estudios complementarios. A continuación se plantean algunos de ellos que son la continuidad natural de este trabajo.

Por un lado, sería necesario determinar los cariotipos de *C. pearsoni* en toda su distribución, con el mayor número de ejemplares posibles, de manera de tener la posibilidad de encontrar nuevas variantes si es que las hay.

Por otro lado, el estudio genético poblacional podría ser ampliado en gran medido incluyendo otros marcadores no ligados. A pesar de las ventajas presentadas por el ADN mitocondrial para esta clase de estudios, el reparto diferencial de polimorfismos ancestrales entre eventos de especiación, podría llevar a una incongruencia entre el árbol del gen y el árbol de las especies (Li 1997). Además, las estimaciones de tiempos de divergencia y tasas de migración entre poblaciones y cariomorfos mejorarían considerablemente con mas loci no ligados (Beerli & Felsenstein 1999).

Una posibilidad sería trabajar con loci microsatelitales. Los microsatélites son secuencias de ADN genómico no codificante, altamente variable, y que aportarían mayor resolución para descifrar la diferenciación de las poblaciones. Algunos oligos diseñados para su amplificación (Lacey *et al.* 1999) ya han sido probados con éxito (Tomasco, obs. pers.) en la especie. Otra alternativa es la utilización de mutaciones puntuales o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) distribuidas ampliamente en el genoma, que han surgido recientemente como marcadores genéticos muy valiosos para revelar la historia evolutiva de las poblaciones (Brumfield *et al.* 2003).

Finalmente, sería interesante ampliar las muestras de *C. torquatus*. De esta forma, poder confirmar la relación filogenética entre ésta y *C. pearsoni* y poner a prueba la monofila recíproca entre ambas. Un esfuerzo similar, pero más a largo plazo sería establecer las relaciones con otras especies relacionadas como *C dorbignyi*, idéntica citogenéticamente.

BIBLIOGRAFÍA
- Altuna CA. 1983. Sobre la estructura de las construcciones de *Ctenomys pearsoni* Lessa y Langguth, 1983 (Rodentia, Octodontidae). Resumen. *Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales Montevideo*, 3:70-72.
- Altuna CA. 1991. Microclima de cuevas y comportamiento de homeostasis de una población del grupo *Ctenomys* pearsoni del Uruguay (Rodentia, Octodontidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica. Uruguay* (2ª época) 6:35-46.
- Altuna CA & EP Lessa. 1985. Penial mophology in uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 66(3):483-488.
- Altuna CA, Bacigalupe L & S Corte. 1998. Food-handling and feces reingestion in *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae). *Acta Theriologica*, 43: 433-438.
- Altuna CA & S Corte. 1987. Glándula perineal de *Ctenomys pearsoni* y *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Brenesia*, 28:33-39.
- Altuna CA, Francescoli G & I Izquierdo. 1991. Copulatory pattern of *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) from Balneario Solís, Uruguay. *Mammalia*, 55:316-318.
- Altuna CA, Francescoli G, Tassino B & I Izquierdo. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología*, 7: 47-54.
- Altuna CA, Izquierdo I & B Tassino. 1992. Estructura de sistemas de cuevas y disponibilidad de forraje en una población de *Ctenomys* (cariomorfo Solís) (Rodentia, Octodontidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* (2ª época), 7:3940.
- Altuna CA, Izquierdo I & B Tassino. 1993. Análisis del comportamiento de excavación en dos poblaciones del complejo C. pearsoni (Rodentia, Octodontidae). Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época), 8:275-282.
- Altuna CA, Ubilla M, Novello AF & C. Sambarino. 1988. Caracterización y variación en dos poblaciones alopátridas del complejo Ctenomys pearsoni (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. Resumen. V Reunión Iberoamericana de Conservación y Zoología de Vertebrados, 23.
- Anderson S, Yates TL & JA Cook. 1987. Notes on Bolivian mammals. 4. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the easten lowlands. *American Museumm Novitates*, 2891: 1-20.
- Aquadro CF & BD Greenberg. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103:287-312.
- Avise JC. 2000. Phylogeography. The historical and formation of species. Harvard University Press, USA.
- **Baker RJ & JW Bickham**. 1986. Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 83:8245-8248.

- **Beerli P & J Felsenstein.** 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152:763-73.
- **Berlocher SH.** 1998. Origins: A brief history of Research on Speciation. En Endless forms: species and speciation. Howard, D. J. Howard and S. H. Berlocher eds. 3-15. Oxford University Press, Oxford.
- **Bickham JW, Patton & TR Loughlin.** 1996. High variability for control-region sequences in a marine mammal: implications for conservation and biogeography of steller sea lions. *Journal of Mammalogy*, 77: 95-108.
- Bidau CJ, Giménez MD & JR Contreras. 1996. Especiación cromosómica y la conservación de la variablidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Mendeliana*, 12:25-37.
- Braggio E, Giménez MD, Contreras JR, E Justo & CJ Bidau. 1999. Karyotypic variation in populations of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) from La Pampa Province (Argentina). *Cariologia*, 52:131-140.
- **Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA & SV Edwards.** 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in the inferences of population history. Trends in Ecology and Evolution, 18:249-256.
- Busch C, Antinuchi CD, del Valle JC, Kittlein MJ, Malicia AI, Vasallo AI & RR Zenuto. 2000. Population ecology of subterranean rodents. En A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents. Pp. 183-226. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- **Bush, G.** 1994. Sympatric speciation in animals: new wine in old bottles. *Trends Ecology and Evolution*, 9:285-288.
- Cavallotto JL, Violante RA & G Parker. 1999. Historia evolutiva del Río de la Plata durante el Holoceno. Actas del XIV Congreso geológico argentino (Salta), 1: 508-511.
- **Contreras JC.** 1996. Acerca de la distribución geográfica de la morfología espermática en el género *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Nótulas faunísticas*, 88:1-5.
- **Contreras JR & CJ Bidau.** 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. pp 22. Fundación Bartolomé Hidalgo.
- **Contreras JR & ACh De Contreras.** 1984. Diagnosis preliminar de una nueva especie de "anguyatutu" (género *Ctenomys*) para la provincia de Corrientes, Argentina (Mammalia, Rodentia). *Historia Natural* (Corrientes), 4:131-132.
- Cook JA, Anderson S & TL Yates. 1990. Notes on Bolivian mammals. 6. The genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) in the easten highlands. *American Museum Novitate*, 2980:1-27.
- Cook JA, Lessa EP & EA Hardly. 2000. Paleontology, Phylogenetic Patterns, and Macroevolutionary Processes in Subterranean Rodents. En E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents. Pp. 322-369. University of Chicago Press, Chicago, USA. 449 pp.

Cracraft J. 1983. Species concept and speciation analysis. Current Ornithology, 1:159-187.

- D'Elía G. 1996. Posición filogenética y dinámica poblacional del roedor subterráneo Ctenomys rionegrensis.
 Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.
- D'Elía G, Lessa EP & JA Cook. 1998. Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia Octodontidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63:285-296.
- D'Elía G, Lessa EP & JA Cook. 1999. Molecular Phylogeny of Tuco-tucos, Genus Ctenomys (Rodentia: Octodontidae): Evaluation of mendocinus Species Group and the Evolution of Asimentric Sperm. Journal of Mammalian Evolution, 6:19-37.
- D'Elía G, Ubilla M & CA Altuna. 1992. Características discriminantes y morfofuncionales de la pelvis en poblaciones de Ctenomys (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época), Vol. 7: 41-42.
- **Excoffier L & PE Smouse.** 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular parsimony. *Genetics*, 136:343-59.
- Faulkes CG, Abbott DH, O'Brien LL, Roy MR, Wayne RK & MW Brubord. 1997. Micro and Macrogeographical genetic structure of colonies of naked mole-rats *Heterocephalus glaber*. *Molecular Ecology*, 6: 615-628.
- **Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- **Fitch WM.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20:406-416.
- **Francescoli G.** 1999. A preliminary report on the acustic communication in uruguayan *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): basic sounds types. *Bioacustics*, 10: 203-218.
- Francescoli G. 2001. Vocal signals from Ctenomys pearsoni pups. Acta Theriologica, 46: 327-330.
- **Francescoli G.** 2002. Geographic variation in vocal signals of *Ctenomys pearsoni*. Acta Theriologica, 47: 35-44.
- Freitas TRO. 1994. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Octodontidae) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. *Cytogenetics and cell genetics*, 67:193-198.
- Freitas TRO. 1997. Chromosome polymorphism in *Ctenomys* minutus (Rodentia Octodontidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20:1-17.
- Freitas TRO. 2001. Tuco-tucos (Rodentia, Octodontidae) in Southern Brazil: *Ctenomys lami* spec. nov. Separated from *C. minutus* Nehring 1887. *Studies of Neotropical Fauna and Environment*, 36:1-8.

- Freitas TRO & EP Lessa. 1984. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia-Octodontidae). *Journal of mammology*, 65:637-642.
- **Fu YX.** 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Futuyma DJ & GC Mayer. 1980. Non-allopatric speciation in mammals. Systematic Zoology, 29: 254-271.
- Gallardo MH & N Köller. 1992. Genetic divergence in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomiydae) from the Andes of Chile. *Journal of Mammalogy*, 73:99-105.
- Gallardo MH, N Köller & C Araneda. 1995. Bottleneck effects in local populations of fossorial *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomiydae) affected by vulcanism. *Heredity*, 74: 638-646.
- Gallardo MH & RE Palma. 1992. Intra and Interspecific Genetic Variability in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 20:523-534.
- García I, Ponsa M, Egozcue J & M García. 2000. Comparative chromosomal análisis and phylogeny in four Ctemonys species (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69:103-120.
- **García-Rodríguez F.** 2002. Estudio paleolimnológico de Lagunas de Rocha, Castillos y Blanca, Sudoeste del Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.
- García-Rodríguez F & A Witkowski. 2003. Infering sea level variation from relative percentages of Pseudopodosira kosugii in Rocha Laggon, SE Uruguay. *Diatom. Research*,18:49-59.
- Gava A & TRO Freitas. 2002. Characterization of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 83:843-851.
- Giménez MD, Mirol PM, Bidau CJ & JB Searle. 2002. Molecular análisis of populations of *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with high karyotypic variability. *Cytogenetic and genome research*, 96: 130-136.
- **González EM.** 2001. Guía de campo de los mamíferos del Uruguay. Introducción al estudio de los mamíferos. Vida Silvestre. pp. 1-339. Montevideo.
- Hasegawa M, Kishino H & T Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution, 22:160-74.
- Hedrick PW. 1981. The establishment of chromosomal variants. *Evolution*, 35:322-332.
- Hoelzel AR, Hancock JM & GA Dover. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. Molecular Biolology and Evolution, 8:475-93.
- Irwin DM, Kocher TD & CA Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32:128-144.

- Kiblisky P, Brum-Zorrilla N, Perez G & FA Saez. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia-Octodontidae). *Mendeliana*, 2(2):85-93.
- Kimura M. 1953. "Stepping-stone" model of population. Annu. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan, 3:62-63.
- King M. 1993. Species evolution: the role of chromosomal change. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kingman JFC. 1982. On the genealogy of large populations. Journal of Applied Probability, 19:27-43.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca F & AC Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceeding of the Natural Academy of Science*, U.S.A., 86:6196-200.
- Kondrashov A S, LY Lampolski & SA Shabalina. 1998. On the sympatric origin of species by means of natural selection. En D. J. Howard and S. H. Berlocher eds. Endless Forms: Species and Speciation. Pp 90-98 Oxford University Press, Oxford.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP & MD Matocq. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology*, 8:1754-6.
- Lacey EA, JL Patton & GN Cameron. 2000. Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents. University of Chicago Press, Chicago, USA. 449 pp.
- Langguth A & A Abella. 1970a. Especies uruguayas del género Ctenomys. Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo, 10:1-27.
- Langguth A & A Abella. 1970 b. Sobre una población de tuco-tucos melánicos (Rodentia: Octodontidae). Acta Zoológica Lilloana, 28:101-108.
- Lara MC, Patton JL & MN da Silva. 1996. The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 5:403-13.
- Lessa EP. 2000. The Evolution of Subterranean Rodents: A Syntesis. En Population ecology of subterranean rodents. En E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents. Pp. 389-420. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Lessa EP & JA Cook. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Biology and Evolution*, 9:88-99.
- Lessa EP & A Langguth. 1983. Cteomys pearsonin. sp. (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. Resumen. Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naurales., Montevideo, 3: 8-86.
- Lichtenstein H. 1830. Darstellung neuer oder wenig bekannter Säugethiere. Berlín (citado por D´Elía 1996)
- Maniatis T, Frisch EF & J Sambrook. 1992. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold spring Harbor. N. Y.

- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Mascheretti S, Mirol PM, Giménez MD, Contreras JR, Bidau CJ & JB Searle. 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys*, based on mitochondrial cytochromeb. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70:361-376.
- Massarini AI, Barros MA, Ortells MO & OA Reig. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotype differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia: Octodontidae). *Genetica*, 83:131-144.
- Massarini AI, Barros MA, Ortells MO & OA Reig. 1995. Variabilidad cromosómica en *Ctenomys* talarum (Rodentia: Octodontidae) de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 68: 207-214.
- McCune AR & NR Lovejoy. 1998. Relative Rates of Sympatric and Allopatric Speciation in Fishes: Test Using DNA Sequence Divergence between Sister Species and among Clades. En Endless Forms: species and speciation. DJ Howard & SH Berlocher eds. 172-185. Oxford University Press, Oxford.
- Miller SA, Dikes DD & HH Polesky. 1988. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16:215.
- Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. Cambridge, Mass. Belknap Press.
- Navarro A & NH Barton. 2003. Chromosomal speciation and molecular divergence: accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science*, 300:321-4.
- **Nehring A.** 1887. Über eine *Ctenomys*-Art aus Rio Grande do Sul (Süd Brasilien). *Sitzungsb Ges Naturf Fr*,4: 45-57.
- **Nei M**. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- **Nevo E.** 1979. Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual review of ecology and systematics*, 10:269-308.
- Nielsen R & J Wakeley. 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. Genetics, 158:885-96.
- **Novello AF & CA Altuna.** 2002. Cytogenetics and distribution of two new karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae) from southern Uruguay. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 67:188-192.
- Novello A, Cortinas MN, Suárez M & H Musto. 1996. Cytogenetics and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Uruguay. *Chromosome Research*, 4:335-339.
- Novello AF & EP Lessa. 1986. G-band homology in two Karyomorph of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia: Octodontidae) of Neotropical fossorial rodents. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 51: 378-380.

- Novello A, Lessa E, Sambarino C & S Monzón. 1990. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Uruguay. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 55:43-48.
- **Ortells MO.** 1995. Phylogenetic analysis of G-banded Kariotypes 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.
- Ortells MO & Barrantes GE. 1994. A study of genetic distances and variability in several species of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) with special reference to a probable causal role of chromosomes in speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53:189-208.
- Ortells MO, Contreras JR & OA Reig. 1990. New *Ctenomys* kariotypes (Rodentia, Octodontidae) from northeastern Argentina and froma Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genetica*, 82: 189-201.
- Patton JL & MF Smith. 1990. The evolutionary dynamics of the pocket gopher *Thomomys bottae*, with emphasis on California populations. *Univ. California Publ. Zoology*, 123:1-161.
- Pearson O. 1959. Biology of subterranean rodents, *Ctenomys*, in Peru. Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado", 9:1-56.
- **Reig OA.** 1970. Ecological notes on the fossorial octodontid rodent *Spalacolpus cyanus* (Molina). *Juornal of Mammalogy*, 51:592-60.
- **Reig OA.** 1989. Kariotypic pattering as one triggering factor in cases of explosive speciation. Pp. 246-289. En Evolutionary Biology of Transient Unstable Popolations. A. Fontdevila Ed. Berlin, Springer-Verlag.
- **Reig OA, Bosch C, Contreras JR & MO Ortells.** 1990. An overview of evolution, systematics, population bilogy, cytogenetics, and molecula biology in *Ctenomys*. En Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular level. Pp. 71-96. Nevo E; Reig OA; Liss AR eds. New York.
- Reig OA & P Kiblisky. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Chromosoma*, 28: 211-244.
- Reig OA, Ortells MO, Massarini AI, Barros MA, Tiranti S & A Dichenhausz. 1992. New Karyotypes and C-Banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia*, 56:603-623.
- **Rieseberg LH.** 2001. Cromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7):351-358.
- Rieseberg LH & K Livingstone. 2003. Chromosomal speciation in primates. Science, 300:267-8.
- **Rogers JS.** 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII. *The University of Texas Publication*, 7213: 145-153.
- Rossi MS, Redi CA, Viale G, Massarini Al & E Capanna. 1995. Chromosomal distribution of the major satellite DNA of South American rodent of the genus *Ctenomys*. *Cytogenetics and cell genetics*, 69: 179-184.

- Sage RD, Contreras JR, Roig VG & JL Patton. 1986. Genetic variation in South American burrowing rodents of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomiydae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 51:158-172.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & HA Erlich. 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-91.
- Saitou N & M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4:406-25.
- Sanguinetti CJ, ED Neto & AJG Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17:915-918.
- Schemske DW. 2000. Understanding the origin of species. Evolution, 54:1069-1073.
- Schluter D. 1998. Ecological causes of speciation. En D. J. Howard and S. H. Berlocher eds. Endless Forms: Species and Speciation Pp.114-129. Oxford University Press, Oxford.
- Schneider S, D Roessli & L Excoffier. 2000. Arlequin (vers. 2.000): a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sites JW & C Moritz. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematcs Zoology*, 36:153-174.
- Slamovits CH, Cook JA, Lessa EP & MS Rossi. 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(9):1708-19.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236:787-792.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution, 47:264-279.
- Spirito F. 1998. The Role of Chromosomal Change in Speciation. En Endless Forms: species and speciation. DJ Howard & SH Berlocher eds. Pp. 320-329. Oxford University Press, Oxford.
- Steinberg EK & JL Patton. 2000. Genetic Structure and the Geography of Speciation in Subterranean Rodents: Opportunities and Constraints for Evolutionary Diversification. Pp. 301-331. En E.A. Lacey, J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. Life Underground: the Biology of Subterranean Rodents. University of Chicago Press, Chicago, USA
- Swofford D. 2000. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), 4.0. Sinauer Associates, Sunderland.
- Swofford D, Olsen GJ, Wadell PJ & DM Hills. 1996. Phylogenetic Inference. En Molecular Systematics. DM Hillis, C. Moritz & BK Mable eds. 407-515. Second edition. Sinauer Associates, Publishers. Sunserland Massachusetts, USA.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics, 105:437-460.
- **Tajima F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

- **Tassino B.** 1999. Ecología nutricional de un roedor herbívoro subterráneo: *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & DG Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-82.
- Ubilla M & CA Altuna. 1987. Morfología diferencial y dismorfismo sexual en la pelvis de *Ctenomys pearsoni* Lessa & Langguth, 1983 y *C. rionegrensis* Langguth & Abella, 1970 (Rodentia, Octodontidae). *IHERINGIA* Ser. Zool., Porto Alegre, 66: 33-42.
- Via S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends Ecology and Evolution*,16: 381-390.
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD & AC Wilson. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceeding of the Natural Academy of Science*, U S A, 86(23):9350-4.
- Villar S. 2000. Caracterización citogenética y alozímica de poblaciones de *Ctenomys* del Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.
- Vittulo AD, Roldan ER & MS Merani. 1988. On the morphology of spermatozoa of tuco-tucos, *Ctenomys* (Rodentia): New data and its implications for the evolution of the genus. *J. Zool.* (London.), 215:675-683.
- Vrba ES. 1989. Levels of selection and sorting with special reference to the species level. En Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Pp. 111-167. Harvey, P.H. & Partridge, L. eds. Oxford University Press.
- Vrba ES & SJ Gould. 1986. The hierarchical expansion of sorting and selection: sorting and selection cannot be equated. Paleobiology,12:217-228.
- White MJD. 1968. Models of speciation. Science, 159:1065-1070.
- William J, Ballard O & M Kreitman. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trend in Ecology and Evolution*, 10:485-488.
- Wlasiuk G, Garza JC & EP Lessa. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Río Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution*, 57:913-926.
- Woods C.A. 1982. The history and classification of the South American Hystricognath rodents: reflections on the far away and long ago. En Mammalian Biology in South America. Pp. 377-392 Mares, M.A. y Genoways, H.H. eds. University of Pittsburgh, Linesville.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16:97-159.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. Genetics, 28:114-138.
- Wright S. 1978. Models of speciation. San Fransisco: WH Freeman & Comp.



8.1 Ejemplares colectados

Ejemplares de *C. pearsoni* colectados para este estudio y depositados en la colección de tejidos del Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias.

Limetas (34° 09´ 00´´ S, 58° 05´ 30´´ W): EV1437, EV 1438, EV 1439, EV 1450, EV 1451, EV 1452, EV 1453, EV 1454, EV 1455, EV1456, EV 1457, EV 1458, EV 1459, EV 1460, EV 1461, EV 1462

Arazatí (34° 33´ 00´´ S, 57° 00´ 00´´ W): EV 1470, EV 1471, EV 1472 y EV 1473