“Caracterización de la variabilidad genética en roedores del género *Ctenomys* de la región Pampeana, a partir de un fragmento de la región control mitocondrial”

Trabajo final de grado del alumno

María Luján Farace

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera**:**

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**.**

“Caracterización de la variabilidad genética en roedores del género *Ctenomys* de la región Pampeana, a partir de un fragmento de la región control mitocondrial”

Trabajo final de grado del alumno

María Luján Farace

Directora:

Dra. Gabriela P. Fernández

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

“Caracterización de la variabilidad genética en roedores del género *Ctenomys* de la región Pampeana, a partir de un fragmento de la región control mitocondrial”

Trabajo final de grado del alumno

María Luján Farace

Aprobado por el tribunal evaluador

…….. …….. ……..

…….

Dra. Gabriela Paula Fernández

Directora

…….

María Luján Farace

Alumno

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

1. **INTRODUCCIÓN……2**
   - **1.1 TAXONOMÍA DE LOS CTENÓMIDOS……2**
   - **1.2 GÉNERO *CTENOMYS*……2**
   - **1.3 BIOLOGÍA DE LOS CTENÓMIDOS……4**
   - **1.4 DISTRIBUCIÓN DE *CETENOMYS* ……7**
     - **1.4.1 DISTRIBUCIÓN EN AMÉRICA DEL SUR ……7**
     - **1.4.2 DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA……8**
     - **1.4.3 DISTRIBUCIÓN EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES……11**
   - **1.5 DIVERSIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES……13**
   - **1.6 PROBLEMÁTICA DE ESTUDIO……14**
   - **1.7 ESTUDIO FILOGEOGRÁFICO A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES DE ADN MITOCONDRIAL ……15**
     - **1.7.1 MARCADOR MOLECULAR MITOCONDRIAL: REGION CONTROL……15**
2. **HIPÓTESIS……19**
3. **OBJETIVOS……19**
   - **3.1 OBJETIVOS GENERALES ……19**
   - **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ……19**
4. **MATERIALES Y MÉTODOS……21**
   - **4.1 TRABAJO DE CAMPO ……21**
   - **4.2 ACTIVIDADES DE LABORATORIO……23**
     - **4.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN ……23**
     - **4.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS ……23**
     - **4.2.3 VERIFICACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN ……25**
     - **4.2.4 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS……25**
   - **4.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS……26**
5. **RESULTADOS……34**
   - **5.1 ANÁLISIS DE SECUENCIA ……34**
   - **5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO ……37**
   - **5.3 RELACIONES HAPLOTÍPICAS……40**
6. **DISCUSIÓN……43**
7. **CONCLUSIONES……48**
8. **BIBLIOGRAFÍA……50**
9. **RESUMEN……62**

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCIÓN

1.1 Taxonomía de los ctenómidos

Los ctenómidos son mamíferos placentarios pertenecientes al orden Rodentia; suborden Histricomorfa (Woods, 1982) ubicándose en la familia *Ctenomyidae* que contiene un único género viviente: *Ctenomys*, creado por Blainville (1826) en su descripción de *C. brasilensis (Bidau, 2006)*.

1.2 Género *Ctenomys*

Es uno de los géneros de roedores más diversos en número de especies, comprende actualmente más de 60 especies de roedores subterráneos con una amplia distribución en América del Sur (Pearson, 1959; Nowak, 1999)

El origen del género ha sido atribuido al Plioceno Superior-Pleistoceno, hace más de tres millones de años, en base a la descripción de ctenómidos fósiles en formaciones del Terciario (Formación Chapadmalalal) en la Provincia de Buenos Aires (Verzi, 2002; Verzi *et al.*, 2010). Posteriormente, a partir de una explosiva cladogénesis, se originaría el gran número de especies actuales, llegando a ser dominantes en el nicho subterráneo en la región Neotropical (Reig *et al.,* 1990; Cook y Lessa, 1998; Lessa y Cook, 1998; Mascheretti *et al.,* 2000; Castillo *et al*., 2005).

A este género pertenecen las especies de roedores comúnmente conocidos como tuco-tucos, tunduques u ocultos, debido a sus vocalizaciones y a su característico modo de vida subterráneo (Wilson y Reeder, 1993).

Los ctenómidos se caracterizan por presentar una gran diversidad cariotípica tanto interespecífica (desde 2n=10 en *C. steinbachi* hasta 2n=70 en *C. pearsoni*) como intraespecífica (por ejemplo *C. rionegrensis*: 2n=48-56; *C. perrensi*: 2n=50-58, entre otras) (Freitas, 1994). Este explosivo ritmo de especiación ha sido acompañado por una de las tasas más altas de evolución cromosómica entre los mamíferos (Reig *et al.*, 1990; Reig *et al*., 1992; Bidau *et al*., 1996).

En la evolución cariotípica de *Ctenomys* se han producido muchos reordenamientos cromosómicos como translocaciones robertsonianas (Reig y Kiblisky, 1969), inversiones pericéntricas (Freitas y Lessa, 1984), fusiones en tándem y supresiones parciales o totales, y duplicaciones de segmentos eucromátícos y heterocromáticos (Gallardo, 1991; Massarini *et al.,* 1991; Massarini *et al.,* 2002)

La vida subterránea propicia el desarrollo de adaptaciones morfológicas muy similares entre los mamíferos cavadores, originando convergencias notables aún entre clados no emparentados de regiones biogeográficas distintas (Nevo, 1979). Ejemplos de estas adaptaciones son la reducción orbitaria, la adquisición de hipsodoncia y demás adaptaciones para la excavación, como es descripto a continuación.

1.3 Biología de los ctenómidos

Estos roedores trascurren la mayor parte de su vida debajo de la superficie de la tierra por un sistema de túneles (Nowak 1999). El ecotopo subterráneo se caracteriza por ausencia de luz, bajos niveles de oxígeno y altos niveles de dióxido de carbono. (Lasey, 2000; Lessa, 1990; Nevo, 1999). Las adaptaciones morfológicas relacionadas con su tipo de vida subterránea comprenden un torso robusto y cilíndrico, cabeza grande, cola corta, abertura bucal atrás de dos incisivos y uñas fuertes. El cuello y los miembros son cortos y musculosos *(Fig1.1)* (Nevo 1979; Reig *et al.,*1990; Nowak, 1999).

Figura 1.1 Ejemplar de *Ctenomys sp. (c.f. talarum)* capturado en la localidad de Lincoln.

Los roedores fosoriales han adoptado dos estrategias fundamentales de excavación: con los incisivos ("*chisel-tooth digging*") o con los miembros anteriores

(“*scratch-digging*”) (Dubost, 1968; Lessa, 1990); las mismas pueden encontrarse combinadas, con predominio de una u otra (Lessa, 1990; Reig y Quintana, 1992; Quintana, 1994; Verzi, 2002).

A excepción principalmente de *C. sociabilis*, estos animales son mayoritariamente solitarios (Lacey, 2003), habitan cada uno en una única cueva y forman poblaciones de baja densidad (Lasey *et al*. 2000). Estas son también conocidas como tuqueras, túneles subterráneos formados por una galería principal y varias ramificaciones. Busch y Antinuchi (2000) describieron la complejidad estructural de las galerias para *C. talarum*, la cuales constan de un túnel principal de 6m de longitud, un promedio de 8 ramificaciones y un único nido. Además a lo largo de las galerías se encuentran cámaras especializadas para el depósito de comida y defecación (Nevo, 1979; Gallardo y Anrique, 1991; Altuna *et al.,* 1991; Busch *et al.,* 2000). Las bocas de las cuevas generalmente permanecen cerradas por tapones, de tal modo pueden mantener constante el microambiente en el interior de los túneles y protegerse frente a depredadores *(Fig.1.2.).*

Figura 1.2. Entrada de los túneles, donde se observa la bifurcación a las diferentes ramificaciones.

Con respecto a su alimentación, son herbívoros generalistas. Su principal aporte está dado por semillas, hojas, tallos y raíces (De Oliveira y Bonvicino, 2006). A diferencia de los demás roedores subterráneos, éstos salen de la madriguera para alimentarse de la vegetación que encuentran sobre el suelo, como hierbas y raíces (Justo *et al.,* 2003).

En cuanto a la reproducción, reconocen claramente señales químicas intraespecíficas en la orina y las heces. Esto les permite identificar el estado

reproductivo de los individuos del sexo opuesto y seleccionar compañeros a través de este tipo de señales (Zenuto y Fanjul, 2002; Zenuto, *et al.*, 2004).

El comportamiento de apareamiento de *Ctenomys* depende en gran medida de las vocalizaciones. Sólo los machos producen el característico sonido "*tuc*" que da origen al nombre común de estos animales (tuco-tucos), lo que les permite establecer sus dominios territoriales en las áreas de distribución de sus poblaciones (Redford y Eisenberg, 1992).

1.4 Distribución de *Ctenomys*

1.4.1 Distribución en América del sur

La gran diversidad de especies de ctenómidos se distribuye desde el altiplano de Perú, por debajo de los 10° de latitud sur hasta Tierra del Fuego, y poseen representantes en Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y el sureste de Brasil *(Fig.1.3).* Ocupando una gran diversidad de hábitats, desde el nivel de mar, hasta más de 5000 metros de altitud (Bidau, 2006).

Altuna (1991) correlacionó la amplia distribución y adaptación a diferentes ambientes tan dispares como praderas, desiertos, dunas y bosques tropicales a las condiciones estables de temperatura y humedad proporcionadas por la vida subterránea en cuevas.

Figura 1.3 Distribución del género *Ctenomys* en América del Sur: desde Tierra del Fuego (Argentina), hasta el Sur de Brasil y Perú, y en latitudes que van desde el nivel del mar hasta más de 4.000 metros en los Andes peruanos.

1.4.2 Distribución en Argentina

Como se mencionó anteriormente el género *Ctenomys* es mega diverso, incluye especies con un amplio rango de fenotipos, como un amplio rango de color

de pelaje, por ejemplo negro para *C. rionegrensis*, y blancos para *C. australis* y variación del tamaño corporal, *C. talarum* (media de peso corporal de 130 g) y *C. australis* (media de peso corporal de 380 g) se producen en parapatría a lo largo de la costa de la provincia de Buenos Aires (Contreras y Reig 1965; Apfelbaum *et al.,* 1991), entre las ciudades de Necochea y Bahía Blanca. Las diferencias de tamaño corporal se correlacionan con sus preferencias de hábitat: *C. talarum* ocupa ambos hábitats interdunares e interiores con suelos cada vez más duros, húmedos y con vegetación (Malizia et al 1991; Vassallo 1993, 1.998.); en contraste, *C. australis* se limita a un estrecho hábitat de duna costera caracterizada por suelos arenosos y baja cobertura de vegetación (Kittlein *et al.* 2004).

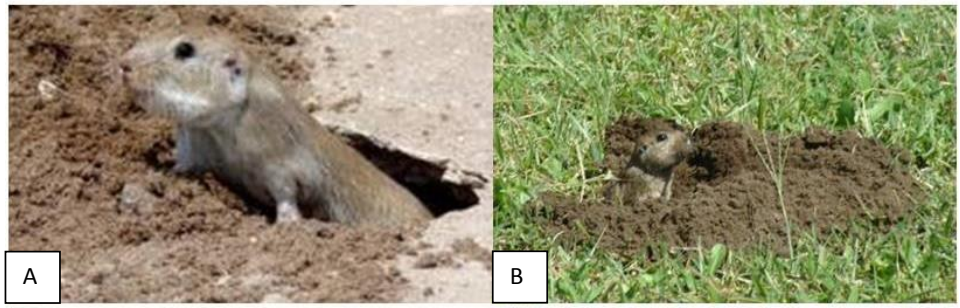


Figura 1.4. Diversidad fenotípica de *a) C. australis; b) C. talarum*

A continuación se muestra un mapa aproximado de la distribución de las especies de *Ctenomys* con respecto a las Eco-regiones Argentinas *(Fig.1.5).*

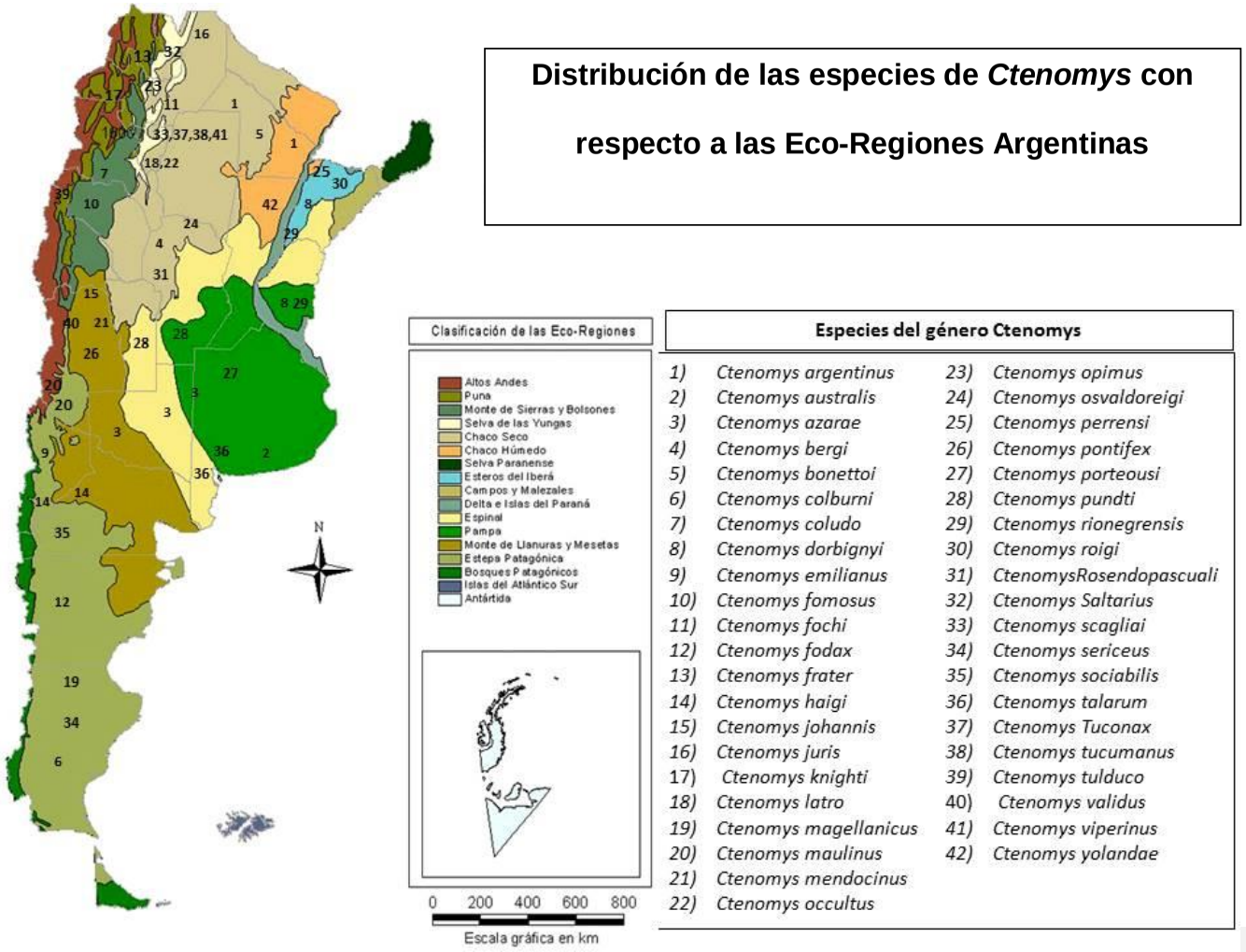


Figura 1.5 Distribución geográfica por Eco-Región de las diferentes especies de ctenómidos en Argentina

1.4.3 Distribución en la provincia de Buenos Aires

Se ha informado la presencia de tres especies pertenecientes al género *Ctenomys* en la provincia de Buenos Aires (Galliari *et al*., 1991): *Ctenomys australis*, distribuido en la costa atlántica, siendo abundante entre el río Quequén Salado y Punta Alta (Contreras y Reig, 1965)*, Ctenomys porteousi,* comprende la región centro-oeste de la provincia de Buenos Aires (Bidau *et al.*, 2008), y *Ctenomys talarum*, distribuido a lo largo de la costa de Buenos Aires pudiendo llegar hasta la provincia de Santa Fe (Woods y Kilpatrick, 2005).

Esta última especie ha sido citada en localidades del centro y centro-oeste de la provincia de Buenos Aires, pertenecientes a los partidos de Saladillo, Pehuajó, 9 de Julio y Lincoln (Galliari *et al*., 1991), aunque estas poblaciones aún no han sido exhaustivamente estudiadas para definir su ubicación taxonómica. Estudios recientes basados en el marcador molecular citocromo b apoyan la hipótesis de que los individuos de las poblaciones de Lincoln y Saladillo pertenecen a *C. talarum* (Carovale, 2014; Farace *et al.,* 2014)

A continuación se muestra un diagrama ilustrativo de dicha distribución bonaerense, como así también la ubicación de las localidades de estudio del presente trabajo, los partidos de Lincoln y Saladillo *(Fig.1.6).*

Figura 1.6. a) Distribución de ctenómidos en la provincia de Buenos Aires. Se identifican las localidades estudiadas en el presente trabajo para *C. talarum*: Cazón (CZ) y Lincoln (LN) y aquellas estudiadas por Mora y colaboradores (2013): ED, El Destino; PI, Punta Indio; CG, Cerro de la Gloria; SCL, San Clemente; PM, Punta Médanos; CPA, Estación Celpa; MC, Mar de Cobo; N, Necochea; SC, Balneario San Cayetano; R, Reta; RQS, Río Quequén Salado; SCH, Arroyo Sauce Chico; ELP, Estancia La Paloma; TOR, Tornquist; y CSZ, Coronel

Para *Ctenomys talarum* fueron descriptas tres subespecies morfológicamente similares, las cuales se distinguen sólo por la región geográfica que cada uno ocupa: *C. t. occidentalis* a lo largo de la frontera oriental de la provincia de La Pampa*; C. t. recessus* lo largo de la costa sur; y *C. t. talarum* lo largo de la costa oriental de la provincia de Buenos Aires (Justo *et al.,* 2003). Estudios más recientes de Mora y colaboradores, contribuyeron a la localización de otras poblaciones de *C. talarum* en la región bonaerense, citando la presencia de poblaciones aisladas de estos roedores en el sur, centro oeste y noreste de

Buenos Aires (Mora *et al.,* 2013). Actualmente existen grandes lagunas de conocimiento acerca de la distribución de estos mamíferos endémicos de la Argentina en la provincia de Buenos Aires.

En comparación con otras especies distribuidas en la provincia de Buenos Aires (como *C. australis*)*, C. talarum* prefiere suelos más firmes, más orgánicos, que tienden a albergar una composición más densa de vegetación (Redford y Eisenberg, 1992; Schleich y Antinuchi, 2004). Esto se contrapone al tipo de suelo que ocupa *C. australis,* el cual se distribuye en la primera línea de dunas contiguas a la playa, con muy baja cobertura vegetal (Bidau, 2006)

En cuanto a *C. porteousi*, se ha citado una pequeña población en el partido de Guaminí que ocupa una área aproximadamente 509 km cuadrados, en el centro este de la provincia (Mapelli y Kittlein, 2009; Mapelli, *et al.,* 2011, 2012).

1.5 Diversificación y características poblacionales

Una característica a resaltar de estos mamíferos es su baja vagilidad con restringida capacidad de dispersión. Las poblaciones de *Ctenomys* se componen por *demes* semi aislados, ocupando parches en el hábitat determinados por la dureza del suelo y el tamaño de las partículas adecuadas para la actividad fosorial (Busch *et al.,* 2007). Esto conlleva a la formación de pequeñas poblaciones fragmentadas constituidas por pequeñas unidades genéticas caracterizadas por una baja variabilidad genética intrapoblacional y una alta variabilidad genética interpoblacional (Lacey *et al*.,1999; Steinberg y Patton, 2000; Mora *et al.*, 2007).

La diversificación del grupo estaría facilitada por la acción de la deriva genética, citada como la principal fuerza evolutiva actuando sobre estos *demes* aislados, característicos de la estructura poblacional de la mayoría de las especies de tuco-tucos (Reig *et al.,* 1990; Busch *et al*., 2000; Fernández-Stolz *et al.*, 2007; Mora *et al*., 2013). En este sentido el género constituye un excelente modelo para poner a prueba hipótesis evolutivas y estudiar la dinámica de la evolución cromosómica y génica a través del tiempo y del espacio.

1.6 Problemática de estudio

Existe un área vacante en relación al conocimiento de la biodiversidad no sólo a nivel de especies, sino también de los procesos evolutivos que llevaron a la distribución de la variabilidad genética intraespecífica en estos roedores. El énfasis se pondrá en la caracterización de la variabilidad genética y la recuperación de las relaciones filogeográficas (componente intraespecífico de la variabilidad genética).

Aún no se han dilucidado los procesos evolutivos que habrían actuado sobre las poblaciones de estos pequeños mamíferos bonaerenses, modelando la distribución de sus características genéticas y morfológicas.

Los marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) han demostrado ser eficaces para develar la estructura genética de las poblaciones y su historia evolutiva (Avise 1998, Mora *et al.,* 2007).

1.7 Estudio filogeográfico a través de marcadores moleculares de ADN mitocondrial

John Avise y sus colaboradores, introdujeron el concepto de filogeografia en 1987 cuando pudieron asociar las ramas de algunos árboles de genes intraespecíficos con un patrón geográfico (Avise *et al.,* 1987).

Actualmente se define como el conocimiento y aplicación de marcadores genéticos moleculares para explorar preguntas y problemas en ecología y evolución (Hernandez *et al.,* 2007).

Avise sentó las bases que idealmente debería tener una molécula para ser utilizada en los análisis filogenéticos. Tales características colocan a la molécula de ADNmt como una excelente herramienta para la realización de estudios poblacionales.

1.7.1 Marcador molecular mitocondrial: Región control

La molécula de ADN mitocondrial consiste en material genético citoplasmático circular de ADN bicatenario, localizado en el interior de las mitocondrias. Este genoma contiene un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H (pesada) y la cadena L (liviana), debido a su diferente densidad cuando son centrifugadas en gradiente de cloruro de cesio (CsCl).

Este genoma posee alrededor de 16.500 pb y contiene información de genes que codifican para rRNA (12S y 16S), tRNAs, y genes estructurales, los cuales

codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa. (Fig.1.7).

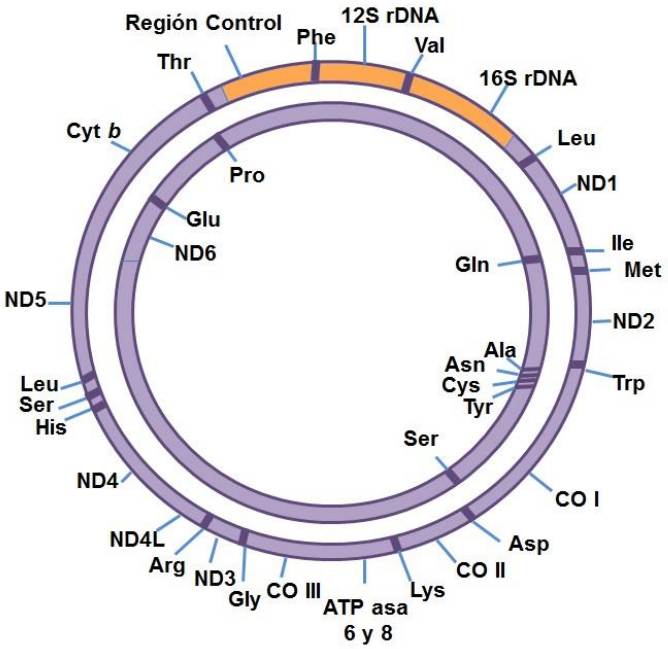


Figura 1.7 Diagrama del genoma de ADN circular bicatenario mitocondrial*.* (Modificada de Pereira, 200)

En términos filogeográficos las propiedades más importantes son su alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, su prácticamente nula recombinación, su gran variación intraespecífica, y sobre todo su herencia estrictamente materna.

De este modo la historia de los eventos mutacionales matrilineales es dilucidada a través de los diferentes haplotipos del ADNmt registrados en una población dada. Éstos pueden a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de interpretar los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupo de especies (Avise, 2000).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dadas las características comportamentales observadas para estos roedores subterráneos (alta agregación en el espacio y baja vagilidad) las poblaciones de ctenómidos estudiadas serán aisladas y de tamaño reducido, con una baja variabilidad genética intrapoblacional y una alta diferenciación genética entre poblaciones.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales:

Estudiar e identificar patrones de variabilidad genética para los tuco-tucos del noroeste de la provincia de Buenos Aires a través de un marcador genético molecular mitocondrial (región control).

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la variabilidad genética para poblaciones de tuco-tucos del noroeste de la provincia de Buenos Aires para el marcador mitocondrial región control;
2. Comparar los patrones de variabilidad genética obtenidos para estas poblaciones con los de otras poblaciones de tucos de la provincia de Buenos Aires y de otras regiones del Bioma Pampa;
3. Utilizar la información genética obtenida para poder ubicarlas taxonómicamente, ya sea dentro de alguna de las especies ya descriptas para esta región, o bien proponerlas como una nueva especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de poner a prueba las hipótesis evolutivas y de alcanzar cada uno de los objetivos propuestos se han desarrollado tres tipos actividades y metodologías: de campo, de laboratorio y análisis de los datos colectados.

4.1 Trabajo de campo

En la región noroeste de la provincia de Buenos Aires fueron realizadas 3 campañas para la identificación de las poblaciones de tuco-tucos, así como para la colecta de material biológico para su posterior análisis.

Las localidades de muestreo fueron: Lincoln (Coordenadas 34° 51´ 0 S, 61° 31´0 W), Saladillo (Coordenadas 35°38′00″S 59°46′00″O) y Cazón (coordenadas: 35°35′00″S 59°40′00″O). Realizándose un viaje de campaña para la localidad de Lincoln, y dos viajes de campaña para el partido de Saladillo.

La identificación de la presencia de los animales se hizo a través de un indicador de su actividad reciente, la acumulación de tierra fresca en la entrada de los túneles. Para cada túnel con actividad registrada se colocó una trampa Oneida Victor n°0 (Oneida Victor, Inc., Ltd., Eastlake, Ohio), de uso común para la captura de estas especies a las cuales se les colocó una cubierta de goma para evitar dañar o herir a los animales. Este procedimiento no afecta a la supervivencia ni disminuye el desempeño de los individuos. Los animales fueron liberados y devueltos a su madriguera original luego de la captura.

Como los individuos de la localidad de Cazón fueron más pequeños de lo esperado, lo cual dificultó su captura en el primer viaje de campaña, se utilizaron trampas adaptadas y cedidas por Matías Mora para la segunda campaña a dicha localidad.

Figura 4.1. a) Trampas Victor Oneida b) Trampas cilíndricas con un sistema de una única entrada. Estas últimas fueron puestas en práctica en el segundo viaje de campaña a la localidad de Cazón.

Las muestras de tejido fueron tomadas mediante el corte de una mínima porción de la cola, con tijeras previamente esterilizadas con etanol al 95% y calor en el momento de la toma de la muestra. Las posibles infecciones se previnieron mediante la aplicación nitrato de plata en aerosol (antiséptico y cicatrizante) en el sitio de corte.

El tejido fue transportado en tubos Falcon de 30 ml. con etanol al 95%. al Centro de Bioinvestigaciones (CEBIO). Las muestras fueron conservadas en *freezer* a -20°C.

En la localidad Lincoln se obtuvo un n=7 individuos y en la de Cazón un n=1 individuo, en el primer viaje de campaña. En la segunda campaña realizada al partido de Saladillo, nos encontramos con demes muy acotados, sin resultados favorables en la captura, tanto en las localidades de Cazón como de Saladillo. Para esta última localidad, se encontró que el principal punto de colecta había sido edificado, eliminando por completo a las poblaciones locales.

4.2 Actividades de laboratorio

4.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) fue realizada a través del método de extracción con NaCl (Medrano *et al.*, 1990) y las muestras de ADN, debidamente rotuladas fueron almacenadas en *freezer* a -20°C.

La verificación de la extracción fue realizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (BrEtd), sembrándose 3 µl (micro litros) de muestra junto a 3 µl de buffer de corrida por calle. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 100 V (voltios) por 50 minutos aproximadamente.

4.2.2 Amplificación de los fragmentos de interés

A través del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pares de bases (pb) de la región control mitocondrial, correspondiente a la región hipervariable 5´, comprendida entre el *locus* tRNApro y el dominio central conservado. Con esta finalidad fueron empleados los siguientes *primers:*

- *Forward*: TucoPro (5´- ACT TTC GTT TAT TGC TTA ATT - 3´; Tomasco y Lessa, 2007)
- *Reverse*: TDKD (5´- CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG -3´; Kocher *et al.*, 1989).

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl, conteniendo entre 25-100 ng de ADN; Cl_2Mg 1,5mM; primer forward 0,2 µl; primer reverse 0,2µl; dNTPs 0,2mM, Buffer de reacción 1X; Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) 0,5U y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final.

El programa ingresado en el termociclador (Gene Pro Thermal Cycler -Bioer Technology CO., LTD-) para la amplificación del fragmento de interés comprendió las siguientes condiciones de reacción:

- Desnaturalización inicial: 94ºC por 5 minutos,
- 34 ciclos de :

  - Desnaturalización a 94ºC durante 30 segundos,

  - *Annealing:* 47ºC por 30 segundos

  - Extensión a 74ºC por 45 segundos
- Extensión final: 74ºC durante 5 minutos

4.2.3 Verificación de la eficiencia de la amplificación

El resultado de la amplificación fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 100 V (voltios) por 50 minutos aproximadamente y observado bajo luz ultravioleta del transiluminador.

Para inferir el tamaño de los fragmentos amplificados fue utilizado un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L) (Fig.4.2.). El gel fue fotografiado mediante una fotografía de alta resolución, para luego poder determinar la concentración de cada muestra a través de un programa de procesamiento de imagen digital: ImageJ (Abrámoff *et al.,* 2004).

Las muestras de amplificado del *locus* región control con concentraciones menores a 30 ng fueron reamplificadas para obtener la concentración requerida para su posterior secuenciación.

4.2.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados

Los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fueron purificados a través del método enzimático, utilizando exonucleasa y fosfatasa alcalina (exo-sap) en el termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD). Las condiciones de purificación fueron las siguientes:

- 10U de Exonucleasa I (Thermo Scientific)
- 1U de FastAP Fosfatasa alcalina termosensible (Thermo Scientific)

- Posterior incubación de las muestras con las enzimas a 37ºC durante 15 minutos y luego a 85ºC por otros 15 minutos para detener la reacción enzimática.

Los amplicones fueron enviados a la Empresa MACROGEN, Inc., Seoul, Korea, junto a los *primers* empleados para la PCR para su secuenciación mediante secuenciación estándar a través del secuenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems) que utiliza un sistema de electroforesis capilar para el análisis de fluorescencia de los fragmentos de ADN marcados.

4.3 Análisis de los datos

Las secuencias obtenidas (Tabla 4.1) fueron visualizadas y corregidas usando el programa BioEdit (Hall, 2004). El alineamiento global se realizó junto a otras secuencias obtenidas del *GenBank*, pertenecientes a la región control mitocondrial de especies de *Ctenomys* a las que podrían pertenecer las poblaciones muestreadas: *Ctenomys talarum* y *C. porteousi.*

Tabla 4.1. Secuencias obtenidas (n=8) por localidad con su respectiva nomenclatura empleada para el análisis		
Localidad	*Abreviatura*	*Nomenclatura*
Lincoln	LN	*C. sp.* 1
Lincoln	LN	*C. sp.* 2
Lincoln	LN	*C. sp.* 3
Lincoln	LN	*C. sp.* 4
Lincoln	LN	*C. sp.* 5
Lincoln	LN	*C. sp.* 6
Lincoln	LN	*C. sp.* 7
Cazón	CZ	*C. sp*. 8

Para el análisis fue incluido un grupo de secuencias poblacionales obtenidas del *set* de secuencias (*pop set*) analizadas en el trabajo de Mora *et al.,* 2013, y Mora *et al.,* 2007 el cual nos brinda todas las secuencias de las poblaciones de *C. talarum* estudiadas hasta ahora en la provincia de Buenos Aires (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Haplotipos obtenidos de GenBank para *C. talarum* utilizados en el análisis filogenético y haplotípico. Se indica el número de acceso correspondiente a cada uno.

Nomenclatura	*Localidad*	*Abreviatura*	*Número de Acceso*	*Referencia*
C.ta-EF531719.1	Balneario San Cayetano	SC	EF531719.1	Mora *et al*., 2007
	Necochea	N		
C.ta-EF531739.1	Río Quequén Salado	RQS	EF531739.1	Mora *et al*, 2007
	Reta	R		
C.ta-JX297348.1	Punta Médanos	PM	JX297348.1	Mora *et al*, 2013
	San Clemente	SCL		
C.ta-JX297353.1	Tornquist	TOR	JX297353.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297354.1	Tornquist	TOR	JX297354.1	Mora *et al*, 2007
	Estancia La Paloma	ELP		
C.ta-JX297355.1	Punta Indio	PI	JX297355.1	Mora *et al*, 2013
	El Destino	ED		
C.ta-JX297357.1	Arroyo Sauce Chico	SCH	JX297357.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297358.1	Cerro de la Gloria	CG	JX297358.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297359.1	Coronel Suárez	CSZ	JX297359.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297361.1	El Destino	ED	JX297361.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297366.1	Mar de Cobo	MC	JX297366.1	Mora *et al*, 2013
C.ta-JX297371.1	Estación Celpa	CPA	JX297371.1	Mora *et al*, 2013

Para la recuperación de las relaciones filogenéticas fueron incluidos los haplotipos obtenidos para las localidades de Lincoln y Cazón (Tabla 4.1) en conjunto con los de *C. talarum* (tabla 4.2), y aquellos publicados para las otras especies de ctenómidos de provincia de Buenos Aires *C. porteousi* (tabla 4.3), y *C. australis* (Tabla 4.4), así como para el grupo de secuencias utilizado como grupo externo correspondientes a *C. torquatus*. (Tabla 4.5). El alineamiento múltiple fue logrado mediante el algoritmo ClustalX a través del programa MEGA6 (Tamura *et al*., 2013).

Tabla 4.3*Nomenclatura empleada con su respectivo número de acceso para las secuencias utilizadas de C. porteousi en el análisis filogenético*

Nomenclatura	*Acceso de GenBank (gb)*
C.p-JN196443.1	JN196443.1
C.p-JN196442.1	JN196442.1
C.p-JN196441.1	JN196441.1
C.p-JN196440.1	JN196440.1
C.p-JN196439.1	JN196439.1
C.p-JN196438.1	JN196438.1
C.p-JN196437.1	JN196437.1
C.p-JN196436.1	JN196436.1
C.p-JN196435.1	JN196435.1
C.p-JN196434.1	JN196434.1
C.p-JN196433.1	JN196433.1
C.p-JN196432.1	JN196432.1

Tabla 4.4 *Nomenclatura empleada con su respectivo número de acceso para las secuencias utilizadas de C. australis en el análisis filogenético*

Nomenclatura	Entrada de *GenBank* (gb)
C.a-DQ416740.1	DQ416740.1
C.a-DQ416739.1	DQ416739.1
C.a-DQ416738.1	DQ416738.1
C.a-DQ416737.1	DQ416737.1
C.a-DQ416736.1	DQ416736.1
C.a-DQ416735.1	DQ416735.1
C.a-DQ416734.1	DQ416734.1
C.a-DQ416733.1	DQ416733.1
C.a-DQ416732.1	DQ416732.1
C.a-DQ416731.1	DQ416731.1
C.a-DQ416730.1	DQ416730.1
C.a-DQ416729.1	DQ416729.1
C.a-DQ416728.1	DQ416728.1
C.a-DQ416727.1	DQ416727.1
C.a-DQ416726.1	DQ416726.1
C.a-DQ416725.1	DQ416725.1
C.a-DQ416724.1	DQ416724.1
C.a-DQ416723.1	DQ416723.1
C.a-DQ416722.1	DQ416722.1
C.a-DQ416721.1	DQ416721.1
C.a-DQ416720.1	DQ416720.1
C.a-DQ416719.1	DQ416719.1
C.a-DQ416718.1	DQ416718.1
C.a-DQ416717.1	DQ416717.1

Tabla 4.5 *Nomenclatura empleada con su respectivo número de acceso para las secuencias utilizadas de C. torquatus en el análisis filogenético*

Nomenclatura	Entrada de *GenBank* (gb)
C.to-JQ389107.1	JQ389107.1
C.to-JQ389106.1	JQ389106.1
C.to-JQ389105.1	JQ389105.1
C.to-JQ389104.1	JQ389104.1
C.to-JQ389102.1	JQ389102.1
C.to-JQ389101.1	JQ389101.1
C.to-JQ389100.1	JQ389100.1
C.to-JQ389099.1	JQ389099.1
C.to-JQ389098.1	JQ389098.1
C.to-JQ389097.1	JQ389097.1
C.to-JQ389096.1	JQ389096.1
C.to-JQ389095.1	JQ389095.1
C.to-JQ389094.1	JQ389094.1
C.to-JQ389093.1	JQ389093.1
C.to-JQ389092.1	JQ389092.1
C.to-JQ389091.1	JQ389091.1
C.to-JQ389090.1	JQ389090.1
C.to-JQ389089.1	JQ389089.1
C.to-JQ389088.1	JQ389088.1
C.to-JQ389087.1	JQ389087.1
C.to-JQ389086.1	JQ389086.1
C.toJQ389085.1	JQ389085.1
C.to-JQ389084.1	JQ389084.1
C.to-JQ389083.1	JQ389083.1
C.to-AY755460.1	AY755460.1
C.to-AY755459.1	AY755459.1

Los árboles filogenéticos generados a partir del alineamiento a través de las metodologías de reconstrucción filogenética, *neighbor joining* (NJ) y máxima verosimilitud (MV) fueron obtenidos empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA6 (Tamura *et al*., 2013). La determinación de los límites de confianza para la monofilia de cada nodo, fue realizada a través de un análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas.

Un tercer árbol filogenético se obtuvo con el método de inferencia bayesiana empleando el programa BEAST 1.8.1 (Drummond y Rambaut, 2007).

Los parámetros empleados en el análisis bayesiano fueron los de Shapiro y colaboradores (2006): un árbol de especiación Yule y un reloj molecular relajado (*uncorrelted lognormal*), la búsqueda fue realizada con el modelo HKY+I+G el modelo de sustitución SRD06, utilizando 30 millones de generaciones, tomando árboles cada mil generaciones. Las corridas independientes fueron resumidas en TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond y Rambaut, 2007); los primeros 3 mil árboles (el 10%) fueron descartados y los restantes fueron utilizados para obtener un árbol consenso en FigTree 1.3.1 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

La variabilidad genética fue estimada a través del número de sitios polimórficos, el número de haplotipos y la diversidad nucleotídica y haplotípica para la cual se utilizó el programa DNASP5 (Librado y Rozas, 2009).

A través del programa Network 4.6.1.2. (www.fluxus-engineering.com) se obtuvieron las relaciones haplotípicas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al*., 1999).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de secuencias

Una vez obtenido el alineamiento múltiple de las secuencias para el fragmento de la región control mitocondrial (390pb) pertenecientes a la localidad de Lincoln (n=7), Cazón (n=1) y secuencias de *C. talarum* obtenidas de *GenBank* (n=12) , fue analizada la variación para dicho conjunto de secuencias (n=20) (ver tablas 4.1 y 4.2). Las mismas fueron agrupadas en 13 haplotipos, uno de los cuales agrupó a las secuencias de Lincoln con un haplotipo perteneciente a la Localidad de Mar de Cobo. (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Detalle de los haplotipos obtenidos al analizar un fragmento de 390 pb de la región control mitocondrial para *Ctenomys talarum* (n=20), provincia de Buenos Aires

Haplotipo	*Frecuencia*	*Secuencias*
Hap_1	8	*C. sp.* 1; *C. sp.* 2; *C. sp.* 3; *C. sp.* 4; *C. sp.* 5; *C. sp.* 6; *C. sp.* 7; C.ta-JX297366.1
Hap_2	1	*C.sp*. 8
Hap_3	1	C.ta-JX297354.1
Hap_4	1	C.ta-JX297357.1
Hap_5	1	C.ta-JX297361.1
Hap_6	1	C.ta-JX297355.1
Hap_7	1	C.ta-JX297358.1
Hap_8	1	C.ta-JX297348.1
Hap_9	1	C.ta-JX297371.1
Hap_10	1	C.ta-JX297359.1
Hap_11	1	C.ta-JX297353.1
Hap_12	1	C.ta-EF531739.1
Hap_13	1	C.ta-EF531719.1

En este análisis se identificaron 30 sitios variables (polimórficos) para un total de 31 mutaciones, con un valor de diversidad haplotípica (Hd) de 0,853. La diversidad nucleotídica (Pi) fue de 0,011 mientras que el promedio de diferencias nucleotídicas (k) fue 4,289.

Los sitios variables para cada haplotipo se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Posiciones variables encontradas para un fragmento de 390 pb de región control, correspondientes a 13 haplotipos *C. talarum* encontrados en la provincia de Buenos Aires.

	16	54	72	91	96	99	100	104	122	123	124	125	126	131	135	149	153	171	177	179	220	226	227	236	253	284	286	337	361	384
Hap1	T	T	C	A	C	G	G	A	A	G	C	A	C	A	A	C	T	T	T	T	G	C	C	T	A	C	C	G	G	G
Hap 2	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	C	.	A	A	.	.	.	.	.	C	C	C
Hap 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
Hap 5	.	.	.	.	.	.	A	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
Hap 6	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 8	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.
Hap 9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 10	.	A	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
Hap 11	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
Hap 12	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap13	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.

5.2 Análisis filogenético

Se construyeron 3 árboles filogenéticos a partir de los métodos de máxima verosimilitud, MV *(Fig. 5.1), Neighbor Joining*, NJ e inferencia bayesiana *(Fig 5.2).*

El análisis por el método MV arrojó resultados similares al NJ (por tal motivo solo se incluye en análisis por el método MV), un clado mayor y otro menor con igual nivel de confianza *(bootstrap* 0.94*),* distinguiéndose del primero por la diferenciación en dos clados más basales a las especies *C. porteousi* y *C. australis.* Al igual que el método NJ, los individuos de la población de Lincoln son agrupados con los de la población de Mar de Cobo (JX297366.1) que poseen el haplotipo 1 realizado por el DNAsp (ver tabla 5.1)

El método bayesiano separa el conjunto de secuencias en dos clados principales, agrupando por un lado a *C. australis* y *C. torquatus* y por otro a *C. talarum* y *C. porteousi.* Al analizar los clados de *C. talarum* presenta dos clados, uno menor correspondiente a haplotipos que se encuentran en el noreste de la provincia de Buenos Aires,y uno mayor que a su vez se subdivide en dos, uno de ellos el más basal, pertenece al individuo de Cazón, lo que marca nuevamente su mayor ancestralidad con respecto a los demás del mismo grupo. En este caso las secuencias pertenecientes a los ejemplares de la población de Lincoln fueron agrupados con un haplotipo perteneciente de la población de ctenómidos de Mar de Cobo.

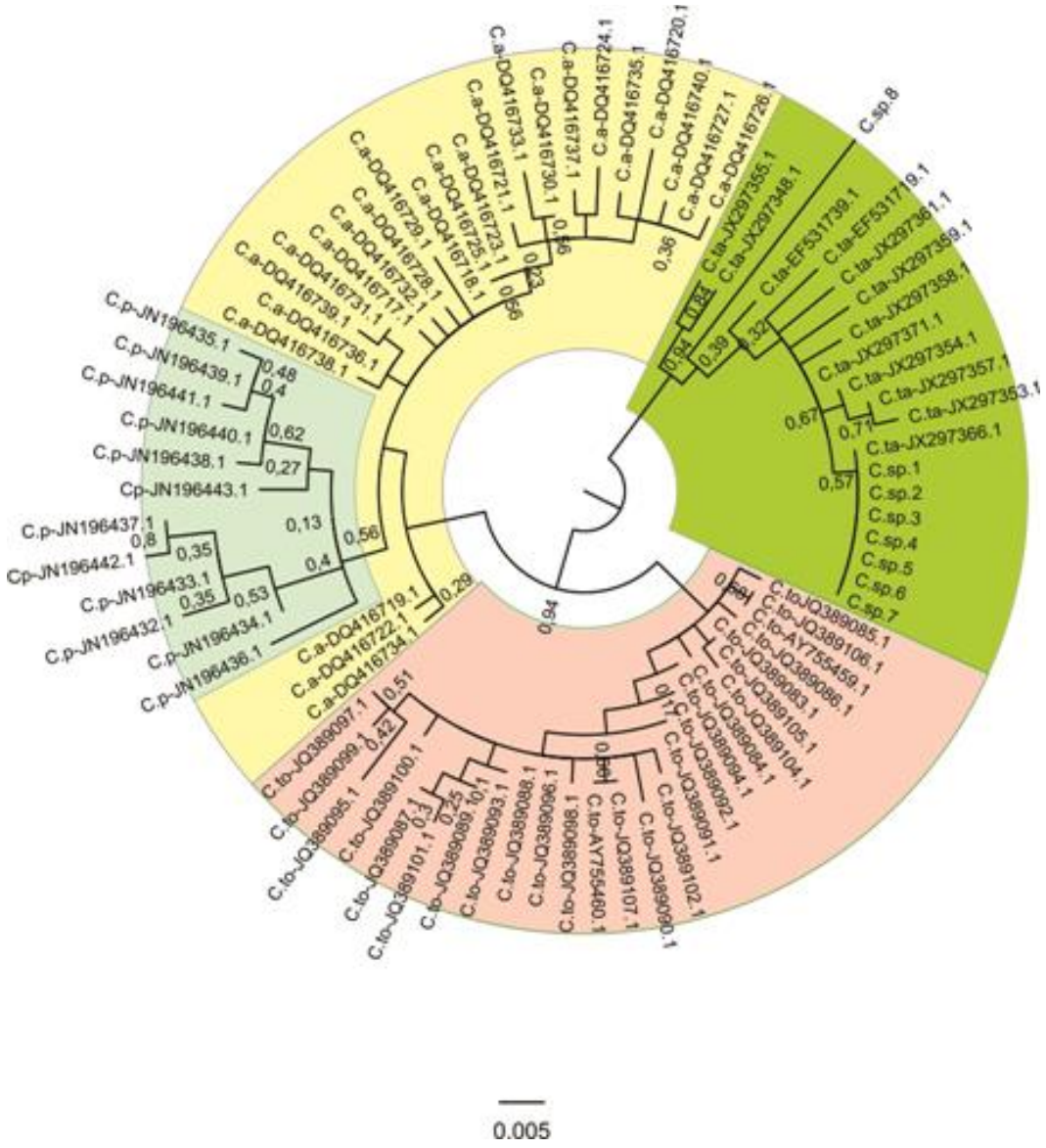


Figura 5.1 Árbol filogenético obtenido por máxima parsimonia a partir de un fragmento de 390 pb de la región control para *C. talarum, C. porteousi, C. australis y C. torquatus*

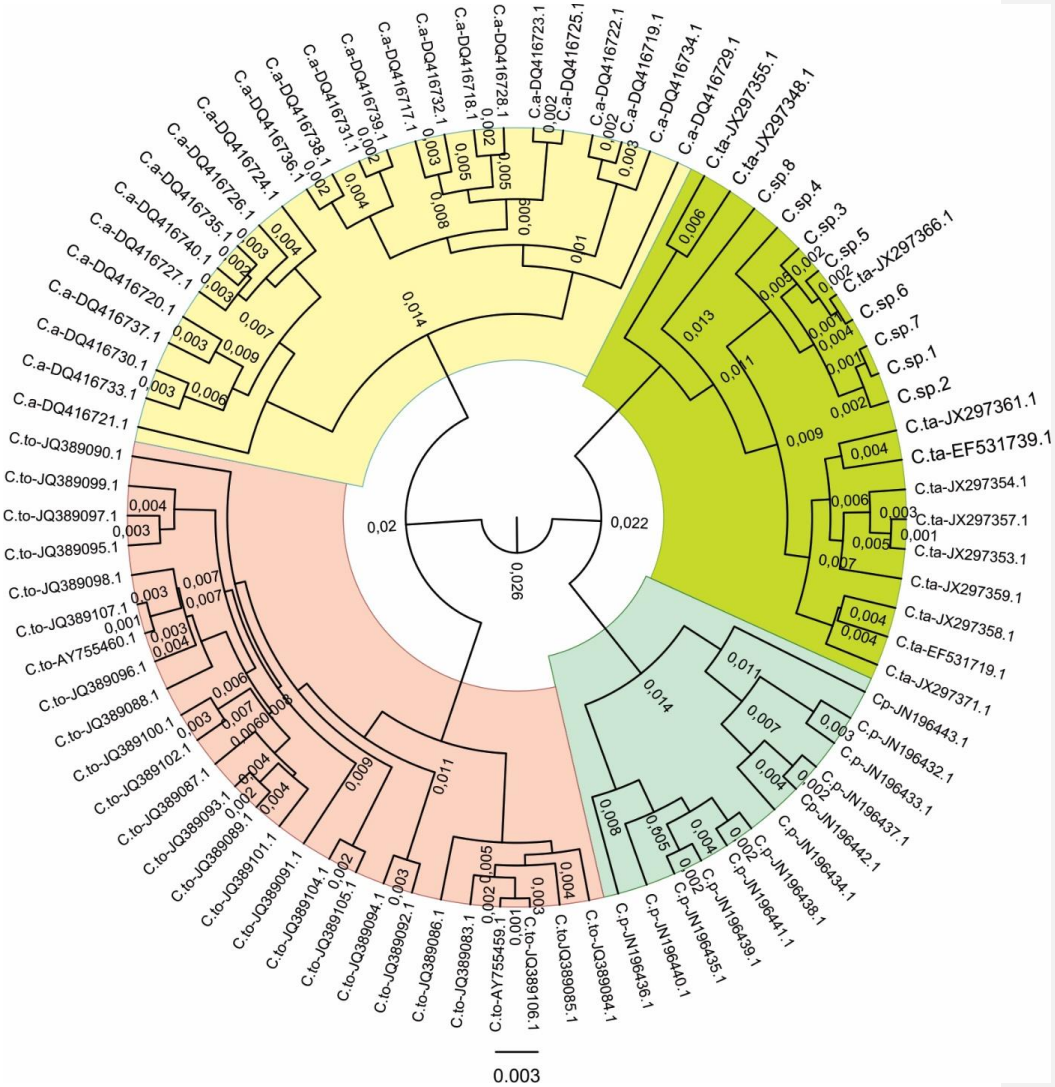


Figura 5.2 Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana a partir de un fragmento de 390 pb de la región control para *C. talarum, C. porteousi, C. australis y C. torquatus*

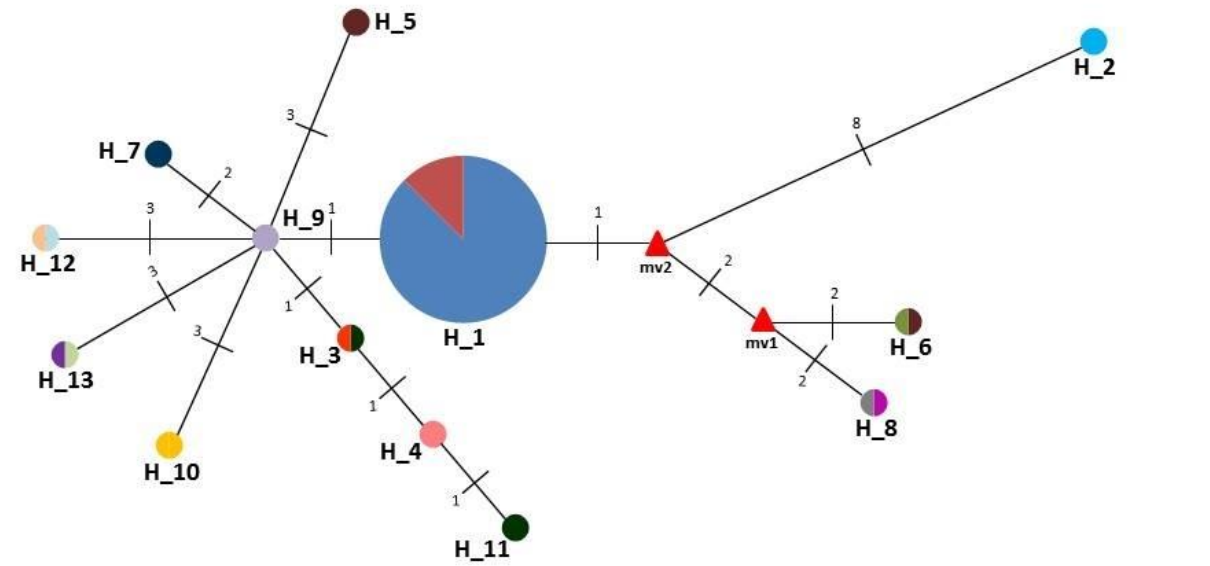
5.3 Relaciones haplotípicas

Los análisis realizados con Network para las relaciones haplotípicas (a partir de un abordaje de parsimonia) son congruentes con los resultados mostrados anteriormente *(Fig. 5.3).*

El haplotipo con mayor frecuencia es el H1, compartido con las poblaciones de Lincoln y Mar de Cobo. De allí a partir de una única mutación se desprende el haplotipo H9, presente en la población de tuco-tucos de la Estación Celpa. Este haplotipo da origen a 8 haplotipos más: los haplotipos H5, H10, H11, H12 y H13 se diferencian de H9 a través de 3 mutaciones, mientras que los haplotipos H2 y H4 se diferencian a través de 2 mutaciones. El haplotipo H3 se diferencia del H9 y del H4 por una sola mutación y por dos mutaciones del H11. .

El haplotipo H2 presente en la localidad de Cazón es el más divergente, diferenciándose de H1 a través de 9 mutaciones, sugiriendo tratarse de un polimorfismo ancestral, al igual que en los árboles previamente analizados.

Los haplotipos H6 y H8, correspondientes a El Destino y Punta Indio, y San Clemente y Punta Médano respectivamente, divergen por 4 mutaciones.


H_5
H_2
H_7
H_9
H_12
H_1
mv2
mv1
H_6
H_8
H_13
H_3
H_4
H_10
H_11
3
2
3
1
1
8
2
2
2
3
3
1
1
1
Arroyo Sauce Chico
Balneario San Cayetano
Cazón
Cerro de la Gloria
Coronel Suárez
El Destino
Estación Celpa
Estancia La Paloma
Lincoln
Mar de Cobo
Necochea
Punta Indio
Punta Médanos
Reta
Río Quequén Salado
San Clemente
Tornquist

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Las poblaciones de tuco-tucos del noreste de la provincia de Buenos Aires, en particular aquellas pertenecientes a los partidos de Saladillo y Lincoln, no han sido ampliamente estudiadas para definir su ubicación taxonómica y menos aún su variabilidad genética en relación a otras poblaciones de la provincia.

Galliari y colaboradores (1991) han citado *C. talarum* en estas localidades a partir de sus características morfológicas, remarcando la falta de un estudio exhaustivo para ubicar taxonómicamente a estas poblaciones como dicha especie.

Trabajos previos realizados con *citocormo b* (Carnovale*,* 2014; Farace *et al.,* 2014) arrojaron una primera aproximación de la ubicación taxonómica de las poblaciones de Lincoln y Cazón; sugiriendo que ambas pertenecerían a *C. talarum.*

El presente trabajo aporta nuevos conocimientos para estas poblaciones, con un enfoque filogeográfico al compararlos con otras poblaciones de la provincia de Buenos Aires estudiadas hasta el momento.

Los estudios para el marcador región control fueron coincidentes con los realizados para *citocromo b,* todos los individuos de la población de Lincoln se agruparon en un único haplotipo, lo que corrobora la hipótesis de la baja variabilidad genética intrapoblacional. Los resultados son coherentes al compararlos con el contexto del paisaje del lugar de la colecta, el cementerio municipal Lincoln, donde se observó una marcada situación de aislamiento y de hábitats fragmentados debido a la infraestructura y actividad humana.

Sorprendentemente cuando se compararon las secuencias y se obtuvieron los haplotipos, el total de la población de Lincoln fue reunida junto con un haplotipo de la población de la localidad de Mar de Cobo del trabajo de Mora y colaboradores (2013), en un único haplotipo H1.

Dado el marcador molecular utilizado creemos poco probable que la homología observada entre ambas secuencias se deba a homoplasia sino a una ancestralidad común.

Una explicación para que dos poblaciones de regiones geográficas tan distantes compartan el mismo haplotipo está dado por la propia evolución geomorfológica de la provincia de Buenos Aires.

En este sentido los principales cambios climáticos que se produjeron en la región pampeana durante el Pleistoceno y Holoceno influenciaron en las fluctuaciones de las trayectorias demográficas de las poblaciones de *C. talarum*.

Con respecto al Pleistoceno en la Pampa parece haber sido en su mayoría árido y frío, con cortos períodos de humedad (Quattrocchio *et al*., 2008; Tonni *et al*., 1999), donde la aridez y la actividad eólica intensiva podrían haber evitado la propagación de hábitats húmedos con pastizales (León y Anderson 1973; Tonni *et al.,* 1999). La transición Pleistoceno-Holoceno en la provincia de Buenos Aires se caracteriza por el aumento de la estabilidad y la formación del suelo, lo que sugiere una mayor humedad relativa y condiciones climáticas más cálidas en comparación al Pleistoceno (Rabassa, 1987).

La edafogénesis holocénica con ciclos independientes de formación de dunas (Isla *et al*., 2001; Mora *et al*., 2006), habría permitido la expansión poblacional de los tuco-tucos a estos nuevos hábitats favorables.

Posiblemente la población de Lincoln constituye una evidencia para apoyar la hipótesis de que las poblaciones costeras se podrían haber originado a partir de la parte central de la provincia de Buenos Aires, posiblemente en diferentes momentos y siguiendo las riberas de los ríos (Mora *et al*., 2013).

Examinando las conexiones hidrográficas observamos que el Rio Salado que comunica el noroeste con el noreste de la provincia de Buenos Aires podría haber facilitado la dispersión de los tuco-tucos entre Lincoln y Mar de Cobo.

Cuando analizamos la población de Cazón, localidad ubicada en el centro de la provincia encontramos un haplotipo altamente divergente (9 mutaciones de diferencia con el haplotipo más cercano) por lo que podría tratarse de un polimorfismo ancestral, aparentemente perdido en otras poblaciones. Esto puede ser explicado a través del fuerte aislamiento geográfico de la población de Cazón y/o el déficit actual de muestreos para esta región de estudio. Tal vez como muchas otras de las poblaciones actuales de *C. talarum*, la población de Cazón sea un relicto de una distribución histórica más amplia.

El avance de las fronteras urbana y rural está teniendo un impacto negativo sobre las poblaciones silvestres de ctenómidos en general. Esto fue puesto en evidencia en la localidad de Saladillo, luego de 4 meses del primer viaje de prospección, donde se observó edificación en el sitio en el cual había sido

identificada la presencia de tuco-tucos. De hecho la extinción local ya fue reportada en otras poblaciones de *C. talarum* en el centro sur de la provincia de Buenos Aires (Quinta, 2004; Mora *et al*., 2007; Mora *et al*., 2013).

Los resultados del presente trabajo apoyarían el escenario evolutivo propuesto para las poblaciones de *C. talarum* por Mora y colaboradores (2013), pero faltaría un muestreo más exhaustivo de la provincia para poder confirmarla.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

A partir de la información genética obtenida para la región control mitocondrial se ha confirmado la ubicación taxonómica de los individuos de las poblaciones de Lincoln y Cazón a la especie *C. talarum*.

Con respecto a la población de la localidad de Lincoln podemos confirmar la hipótesis de baja variabilidad genética intrapoblacional en poblaciones aisladas de ambientes fragmentados. La presencia de un haplotipo compartido (H1) entre dos poblaciones geográficamente tan distantes como Lincoln y Mar de Cobo, nos lleva a inferir la existencia de estabilidad demográfica que le permitiría a ese haplotipo permanecer a lo largo del tiempo evolutivo de esta especie.

En cuanto a la población de Cazón podemos confirmar una gran divergencia con respecto a las poblaciones estudiadas, verificándose la presencia de polimorfismos ancestrales

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Niegel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18:489-522.

Avise, J.C. 2000. Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, EUA.

Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. Molecular Ecology, 7, 771–779.

Altuna, C.A. 1991. Microclima de cuevas y comportamiento de homeostasis en Ctenomys pearsoni del Uruguay (Rodentia, Octonidae). Boletin de la Sociedad Zoologica del Uruguay, 6:35-46

Abrámoff, M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International, 11(7):36-42.

Apfelbaum LI, Massarini AI, Daleffe LE, Reig OA (1991) Genetic variability in the subterranean rodents Ctenomys australis and Ctenomys porteousi (Rodentia: Octodontidae). Biochemical Systematics and Ecology, 19, 467–476.

Bandelt H. J., Foster P., Rohl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 16:37-48.

Bidau C. J, Gimenez M. D, Contreras J. R. (1996) Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del gé- nero Ctenomys (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). Mendeliana 12: 25-37.

Bidau, C.J. 2006. Ctenomyidae. En: R.M. Barquez, M.M. Díaz & R.A. Ojeda (eds.), *Mamíferos de Argentina, sistemática y distribución*, pp 212-231, SAREM.

Bidau, C.J. 2006. Familia Ctenomyidae. En: Barquez, R.M., Díaz, M.M., Ojeda, R.A. (Ed.). Mamíferos de Argentina Sistemática y Distribución. Sociedad Argentina para el estudio de los mamíferos (SAREM), Argentina. Pp 212-231.

Bidau C., Lessa E., Ojeda R. 2008. *Ctenomys porteousi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>.

Busch C., Antinuchi C. D., del Valle J. C., Kittlein M. J., Malizia A. I., Vassallo A. I., Zenuto R.R. 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. In: Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents (Lacey E. A., Patton J. L., Cameron G. N., eds.). The University of Chicago Press, pp. 183-226.

Castillo H. A., Cortinas M. N., Lessa E. P. 2005. Rapid Diversification of South American Tuco-tucos (*Ctenomys, Rodentia*: Ctenomyidae) Contrasting Mitochondrial and Nuclear Intron Sequences. J Mamma,l 86:170-179.

Carnovale C. S. 2014. Determinación de la variabilidad genética en roedores subterráneos del género *Ctenomys* del noroeste de la provincia de Buenos Aires. Trabajo final de grado, Licenciatura en Genética, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA)

Contreras J. R., O. A. Reig. 1965. Datos sobre la distribución del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) en la zona costera de la provincia de Buenos Aires comprendida entre Necochea y Bahía Blanca. Physis,25:169-186

Cook J. A. , Lessa E. P. 1998. Are rates of diversification in subterranean South American Tuco-Tucos (*Genus Ctenomys Rodentia: Octodontidae*) unusually high? Evolution, 52:1521-1527.

De Oliveira, J. A., Bonvicino, C. R. 2006. Ordem Rodentia. En: Mamíferos Do Brasil (Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, W. A., Lima, I. P., eds.), pp 347-400.

DUBOST, G. 1968. Les mamiferes souterrains. Revue d'Écologie et de Biologie du Sol., 5:99-133.

Drummond A. J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology, 7:214.

Farace, M.L., Carnovale, C.S., Acosta, D.B., Figueroa, C.E., Sagua, M.I., Merino, M.L., Fernández, G.P. Variabilidad genética y caracterización taxonómica para una población de *Ctenomys* (Rodentia-Ctenomyidae) de la localidad de Lincoln, Buenos Aires, a través de marcadores moleculares mitocondriales. Póster presentado en: XXVII Jornadas Argentinas de Mastozoología de la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos; 4-7 Noviembre 2014. Esquel, Chubut.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39:783-791.

Fernández-Stolz, G. P., Stolz, J. F. B., Freitas, T. R. O. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae) in southern Brazil. Journal of Mammalogy, 88(4):935-945

Freitas, T.R.O and E.P. Lessa. 1984. Cytogenetics and morphology of Ctenomys torquatus (Rodentia: Octodontidae). Journal of Mammalogy, 65:637-642.

Freitas T. R. O., 1994. Geographical variation of heterochromatin in *Ctenomys flamarioni* (*Rodentia: Octodontidae*) and its cytogenetic relationship with other species of the genus. Cytogenet Cell Genet, 67:193-198.

Gallardo, M., 1991. Karyotypic evolution in Ctenomys (Rodentia, Ctenomyidae). Journal of Mammalogy, 72(1):11-21.

Gallardo M.H. and Anrique J.A. (1991) populational parameters and burrow systems in Ctenomys Maulinus brunneus. Medio Ambiente 11:48-53

Galliari C.A., Berman W. D., Goin, P. J. 1991. Mamíferos. En: Situación ambiental de la provincia de Buenos Aires (López H. L., Tonni E. P. eds.). CIC, La Plata, 5:1-35.

Hall T. 2004. BioEdit 6.0.7. Department of Microbiology, North Carolina State University. From http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

Hernández-Baños, B.E. Escandón, M.G. Cortés-Rodríguez, M.N. García Deras, G. 2007. Filogeografía de Aves Mexicanas en Eguiarte, L. Souza, V. Aguirre X. 2007. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

Isla F.I., Cortizo L.C., Turno Orellano H.A., 2001. Dinámica y evolución de las barreras medanosas, provincia de buenos aires, Argentina. Revista Brasileira de Geomorfología, 2 (1), 73–83

Justo, E., L. De Santis, M. Kin. 2003. Ctenomys talarum. *Mammalian Species* , No. 730: pp. 1-5.

Kittlein M.J., Vassallo A.I., Mora M.S., de Durana F., Ricciardulli M.G., Tizón F.R. , 2004. Dunas del Sureste Bonaerense. In: Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal En Las Pampas Y Campos de Argentina, Uruguay Y Sur de Brasil (eds Bilenca D, Miñarro F), pp. 76–77. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina

Kocher T. D, Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F., Wilson A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6196-6200.

Lacey, E. A., J. E. Maldonado, J. P. Clabaugh, And M. D. Matocq. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tucotucos (Rodentia: Ctenomyidae). Molecular Ecology 8:1754–1756.

Lacey E.A., J.L. Patton and G.N. Cameron 2000. Life undergrouns: the biology of subterranean rodents, University of Chicago Press. Chicago USA 440 pp.

Lacey E. A., Wieczorek J. R., 2003. The ecology of sociality in rodents: a ctenomyid perspective.Journal of Mammalogy 84:1198–1211.

Leon, R., AND D. Anderson. 1973. El l´ımite occidental del pastizal pampeano. Tuexenia 3:67–82.

Lessa E. P., Cook J. A. 1998 The Molecular Phylogenetic of Tuco-Tucos (*genus Ctenomys Rodentia: Octodontidae*) Suggests an Early Burst of Speciation. Mol Phylogenet Evol, 9:88-99.

Lessa, E.P., 1990. Morphological evolution of subterranean mammals: integrating structural, functional, and ecological perspectives. Pp. 211-230. En: Evolution of

Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels (Nevo, E. y O.A. Reig, eds.). Wiley-Liss.

Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25:1451-1452

Malizia AI, Vassallo AI, Busch C (1991) Population and habitat characteristics of two sympatric species of Ctenomys (Rodentia: Octodontidae). Acta Theriologica, 36, 87–94.

Massarini, A.I.; M.A. Barros, M.O. Ortells, and O.A. Reig. (1991). Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of Ctenomys species from Central Argentina (Rodentia, Octodontidae). Genetica, 83:131-144.

Massarini, A., Mizrahi, D., Tiranti, S., Toloza, A., Luna, F., & Schleich, C. E. (2002). Extensive chromosomal variation in Ctenomys talarum talarum from the Atlantic coast of Buenos Aires Province, Argentina (Rodentia: Octodontidae).*Mastozoología Neotropical*, *9*(2), 199-207

Mascheretti S., Mirol P. M., Giménez M. D., Bidau C .J., Contreras J. R., Searle J. B. 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (*Ctenomyidae Octodontoidea*) based on mitochondrial cytochrome b sequences. Biol J Linn Soc., 70:361-376.

Mapelli, F.J. & Kittlein, M.J. 2009. Influence of patch and landscape characteristics on the distribution of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. Landscape Ecology, 24:723–733.

Mapelli, F. J., Mora, M. S., Mirol, P. M., Kittlein, M.J. 2011. Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. Journal of Zoology, 286: 48–57.

Mapelli, F. J., Mora, M. S., Mirol, P. M., Kittlein, M.J. 2012. Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi.* Conservation Genetics, 13:165-181.

Medrano J. F., Aesen E., Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. Biotechniques, 8:43.

Mora, M. S., Lessa, E. P., Cutrera, A. P., Kittlein, M. J., Vassallo, A. I. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. Molecular Ecology, 16:3453–3465.

Mora, M. S., E. P. Lessa, M. J. Kittlein, AND A. I. Vassallo. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent Ctenomys australis in sand-dune habitats: evidence of population expansion. Journal of Mammalogy 87:1192–1203

Mora M. S., Cutrera A. P., Lessa E. P., Vassallo A. I, D'Anatro A., Mapelli F. J. 2013. Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): integrating demographic and habitat histories. Journal of Mammalogy, *94*(2): 459-476.

Nevo, E., 1979. Adaptative convergence and divergence of subterranean mammals. Annual Review of Ecology and Systematics, 10:269-308.

Nevo, E., 1999. Mosaic Evolution of Subterranean Mammals. Regression, Progression, and Global Convergence. Oxford University Press. 413 pp

Nowak RM 1999. Walker's mammals of the world. Hopkins J (ed) Londres University Press.

Pearson R. 1959 Biology of subterranean rodents *Ctenomys* in Peru. Memorias del Museo de Historia Natural "Javier Prado", 9:1-56.

Pereira S.L., 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics Genetic and Molecular Biology vol.23, n.4, pp. 745-752.

Quattrocchio, M. E., A. M. Borromei, C. M. Deschamps, S. C. Grill, And C. A. Zavala. 2008. Landscape evolution and climate changes in the Late Pleistocene–Holocene, southern Pampa (Argentina): Evidence from palynology, mammals and sedimentology. Quaternary International 181:123–138.

Quintana, C.A. 1994. Sistemática y anatomía funcional del roedor Ctenomyinae Praectenomys (Caviomorpha: Octodontidae) del Plioceno de Bolivia. Revista Técnica YPFB, 15:175-185.

Rabassa, J. 1987. The Holocene of Argentina, a review. Quaternary of South America and Antarctic Peninsula 5:269–291

Redford, K., J. Eisenberg. 1992. Mamíferos del Neotrópico, Volumen 2, El Cono Sur: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. Chicago y Londres: La University of Chicago Press.

Reig, O.A., and P. Kiblisky, 1969. Chromosome multiformity in the genus Ctenomys (Rodentia, Octodontidae), a progress report. Chromosoma, 28:211-244

Reig O. A., Busch C., Ortells M. O., Contreras J. L. 1990. An overview of evolution systematic population biology and molecular biology in *Ctenomys*. In: Nevo E. and

Reig O. A. (eds) Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels. New York, Allan Liss, pp 422

Reig O.A., Massarini A.I., Ortells M.O., Barros M.A., Tiranti S.I. and F.J. Dyzenchauz (1992) New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus Ctenomys (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. Mammalia 56: 603-623.

Reig, O.A. y C.A. Quintana. 1992. Fossil ctenomyine rodents of the genus Eucelophorus from the Pliocene

Shapiro, B., Rambaut, A., Drummond, A. J. 2006. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. Molecular Biology and Evolution, 23:7-9

Schleich, C., C. Antinuchi. 2004. Prueba de Orientación magnética en un talarum solitario subterráneo Ctenomys roedores. (Rodentia: Octodontidae) Etología, 110: 485-495.

Steinberg, E. K., And J. L. Patton. 2000. Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. Pp. 301–331 in Life underground: the biology of subterranean rodents (E. A. Lacey, G. Cameron, and J. L. Patton, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12):2725-2729

Tonni, E. P., A. L. Cione, and A. J. Figini, 1999. Predominance of arid climates indicated by mammals in the Pampas of Argentina during the late Pleistocene and Holocene. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 147:257–281

Vassallo AI (1993) Habitat shift after experimental removal of the bigger species in sympatric Ctenomys talarum and Ctenomys australis (Rodentia: Octodontidae). Behaviour, 127, 247–263.

Vassallo AI (1998) Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus Ctenomys (Caviomorpha: Octodontidae). Journal of Zoology, 244, 415–427.

Verzi D. H. 2002. Patrones de evolución morfológica en *Ctenomyinae* (Rodentia: *Octodontidae*). Mastozoología Neotropical, 9:309-328

Verzi, D. H., Olivares, A. I., Morgan, C. C. 2010. The oldest South American tuco-tuco (Late Pliocene, northwestern Argentina) and the boundaries of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). Mammalian Biology, 75: 243-252.

Wilson D. E., Reeder D. M. 1993. Mammals species of the world A Taxonomic and Geographic Reference. Smithsonian Institution Press and The American Society of Mammalogists. 1206 pp.

Woods C.A. 1982 The history and classification of the South American Hystricognath rodents reflections on the far away ond long ago. In: Mares M.A. and Genoways H.H. (eds) Mamalian Biology in South America. University of Pittsburg, Linesville, pp 377-392.

Woods C. A., Kilpatrick C. W. 2005. Infraorder Hystricognathi. In: D. E. Wilson and D. M. Reeder (eds), Mammal Species of the World, pp. 1538-1599. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA

Zenuto, R., M. Fanjul. 2002. Olfactory Discrimination of Individual Scents in the Subterranean Rodent Ctenomys talarum (Tuco-Tuco). *Ethology*, 108: 629-641.

Zenuto, R., M. Fanjul, C. Busch.2004. Use of Chemical Communication by the Subterranean Rodent Ctenomys talarum (Tuco-Tuco) During the Breeding Season. *Journal of Chemical Ecology* , 30 (11): 2111-2126.

RESUMEN

9.RESUMEN

El género *Ctenomys*, uno de los más diversos en número de especies, constituye un grupo de roedores que han llegado a ser dominantes en el nicho subterráneo de la región Neotropical. El origen del género ha sido atribuido al Plioceno Superior-Pleistoceno, hace más de tres millones de años a partir de una explosiva cladogénesis, en la que se originaría el gran número de especies actuales.

Estos roedores trascurren la mayor parte de su vida debajo de la superficie de la tierra dentro de un sistema de túneles. Se caracterizan por su baja vagilidad, lo que conlleva a la formación poblaciones fragmentadas constituidas por pequeñas unidades genéticas, con una baja variabilidad genética intrapoblacional y una alta variabilidad genética interpoblacional.

Se han reportado poblaciones de *Ctenomys talarum* a lo largo de la costa de la provincia de Buenos Aires y, más recientemente, en localidades del centro y centro-oeste de dicha provincia. Su presencia en los partidos de Saladillo y Lincoln ha sido reportada en base a características morfológicas, planteando la necesidad de estudios más detallados para definir su ubicación taxonómica.

Para el presente trabajo se muestrearon dos poblaciones de ctenómidos pertenecientes a las localidades de Lincoln y Cazón (partido de Saladillo).

Los análisis filogenéticos y haplotipicos se realizaron a partir de un fragmento de 390 pb de la región control del ADN mitocondrial utilizando

secuencias de las poblaciones muestreadas así como de un grupo de secuencias generadas en estudios anteriores para las diferentes poblaciones de *C. talarum* estudiadas hasta el momento.

Los árboles filogenéticos obtenidos a través diferentes metodologías (*neighbour joining*, máxima parsimonia y análisis bayesiano) apoyan los resultados obtenidos en estudios anteriores, indicando que los individuos de las poblaciones de Lincoln y Cazón pertenecen a la especie *C. talarum.*

En el análisis haplotípico se obtuvieron 13 haplotipos, uno de los cuales (H1) fue compartido por dos poblaciones de regiones geográficas distantes, Lincoln (centro-oeste) y Mar de Cobo (litoral). Esta coincidencia podría estar dada por la propia edafogénesis de la provincia de Buenos Aires y apoyaría la hipótesis de que las poblaciones costeras se habrían originado a partir de la parte central de la provincia de Buenos Aires.

El haplotipo encontrado para el individuo de la población de Cazón (H2) fue altamente divergente (9 mutaciones de diferencia con el haplotipo más cercano) por lo que podría tratarse de un polimorfismo ancestral.

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Espacio Después: 10 pto, Sin salto de página anterior