

**”IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE TUCO-TUCOS
(*Ctenomys spp.*) DEL CENTRO DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS A
TRAVÉS DE MARCADORES MITOCONDRIALES”**

Trabajo final de grado de la alumna

VIRGINIA DOLORES ZELADA PERRONE

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

UNNOBA

LICENCIADO EN GENÉTICA

*Reforma Universitaria
15 Junio 1918*

Carrera:

Licenciatura en genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 9 de Abril de 2021

**”IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE TUCO-TUCOS
(*Ctenomys spp.*) DEL CENTRO DE LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS A
TRAVÉS DE MARCADORES MITOCONDRIALES”**

Trabajo final de grado de la alumna

VIRGINIA DOLORES ZELADA PERRONE

Aprobado por el tribunal evaluador

.....
Dr. Matías S. Mora Dra R. Tatiana Sánchez Ing. Susana M. Pistorale

.....
Dra. Gabriela P. Fernández
Directora

.....
Dra. Ivanna Tomasco Introini
Co-directora

.....
Virginia Dolores Zelada Perrone
Alumna

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 9 de Abril de 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. El género de roedores subterráneos <i>Ctenomys</i>	6
1.2. Biología de los ctenómidos	7
1.3. Características poblacionales e importancia del género <i>Ctenomys</i>	10
1.4. Distribución de los ctenómidos	11
1.4.1. Distribución y características de las especies de <i>Ctenomys</i> citadas para la provincia de Entre Ríos	12
1.4.1.1. <i>Ctenomys rionegrensis</i>	12
1.4.1.2. <i>Ctenomys pearsoni</i>	13
1.4.1.3. <i>Ctenomys dorbignyi</i>	14
1.4.1.4. <i>Ctenomys torquatus</i>	15
1.5. Determinación de las especies a través de ADN mitocondrial	16
1.5.1. Marcador molecular mitocondrial: Citocromo b	18
1.5.2. Marcador molecular mitocondrial: Citocromo oxidasa I	18
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Trabajo de laboratorio	23
4.1.1. Obtención de datos para el gen COI	24
4.1.1.1. Extracción de ADN	24
4.1.1.2. Amplificación por PCR	24
4.1.1.3. Determinación de la concentración de ADN	25
4.1.2. Obtención de datos para el gen citocromo b	26
4.1.2.1. Extracción de ADN	26
4.1.2.2. Amplificación por PCR	26
4.2. Secuenciación de las muestras	27
4.3. Análisis de los datos	27

4.3.1. Análisis de COI	27
4.3.2. Análisis de Cit-b	29
5. RESULTADOS	35
5.1. Estimaciones de variabilidad genética	35
5.2. Análisis filogenético	35
5.3. Relaciones haplotípicas para <i>C. rionegrensis</i>	39
5.4. Análisis poblacional	41
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA	54

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Ctenomys*

Los tuco-tucos, también conocidos como tunduques u ocultos, debido a sus vocalizaciones y a su característico modo de vida subterráneo (Wilson y Reeder, 1993), son roedores subterráneos pertenecientes al orden Rodentia, suborden Hystricomorpha (Woods, 1982) y familia *Ctenomyidae*, la cual contiene un único género viviente, *Ctenomys* Blainville (1826), con 64 especies descritas (D'Elía *et al.*, 2021). La taxonomía del grupo es controvertida y dinámica, con numerosas especies cuyo estatus taxonómico ha sido cuestionado o difícil de determinar (Fernández *et al.*, 2012; Caraballo *et al.*, 2016; Mapelli *et al.*, 2017; Leipnitz *et al.*, 2018), mientras que otras han sido recientemente descritas (Freitas *et al.*, 2012; Teta *et al.*, 2019; Teta *et al.*, 2020). Según algunas estimaciones, los linajes de *Ctenomys* representan aproximadamente el 45% de todas las especies de roedores subterráneos del mundo, y las especies restantes se distribuyen entre 20 géneros (Reig *et al.*, 1990; Lacey *et al.*, 2000).

La divergencia entre las familias Ctenomyidae y Octodontidae se estima que ocurrió entre $15 \pm 2,1$ millones de años (MA) atrás (Opazo, 2005), y si bien el origen del género se remonta a entre 4 a 6 MA (Parada *et al.*, 2011; Roratto *et al.*, 2015; Upham y Patterson, 2012; 2015; Caraballo y Rossi, 2018b; Carnovale, 2020), existen evidencias de una gran diversificación de especies ocurrida hace aproximadamente 3 MA, durante el Plioceno tardío-Pleistoceno temprano, tal como lo revela el registro fósil (Reig y Quintana, 1992; Quintana, 1994; Verzi *et al.*, 2010). Reig (1989) propuso una antigüedad de 1,8 millones de años para la radiación del género *Ctenomys*, sin embargo, otros hallazgos paleontológicos indican su presencia en la región central de Argentina hace 2,4 MA (Verzi 1994; Cione y Tonni, 1995), e incluso antes, hace 3,6 MA (Verzi *et al.*, 2010).

La datación molecular basada en el gen mitocondrial del citocromo b indica que la diversificación del género tuvo lugar alrededor de 3 MA originando al menos ocho grupos de especies diferentes (Slamovits *et al.*, 2001; Parada *et al.*,

2011). Los resultados basados en las secuencias de dicho gen son congruentes con aquellos obtenidos a partir de *loci* nucleares (Castillo *et al.*, 2005).

1.2. Biología de los ctenómidos

Las especies subterráneas, como *Ctenomys* realizan todas sus actividades bajo tierra, y realizan actividades de excavación diarias. Las excursiones de forrajeo suelen limitarse a las proximidades de las aberturas de las madrigueras (del orden de 0,3 a 4 m), y pasan menos del 1% de toda su vida fuera de ellas (Lacey, 2000), aunque hay excepciones, como es el caso de *C. opimus*, que emergen de sus madrigueras durante largos períodos de tiempo, en busca de alimento y sol. Este comportamiento parecía estar influenciado por las condiciones climáticas, siendo los animales más visibles en días soleados con poco viento (O'Brian, 2020). Por el contrario, las especies fosoriales son aquellas que construyen madrigueras, pero las actividades de excavación son esporádicas y pasan una fracción sustancial de sus vidas fuera de las mismas, con largos períodos de forrajeo en el exterior (Lessa *et al.*, 2008).

Los tuco-tucos comparten con el resto de los roedores subterráneos particularidades en el tipo de excavación del sustrato: excavación con garras (braqui-excavación), excavación con dientes (dento-excavación), excavación con dientes levantando la cabeza y excavación con las extremidades posteriores (Hildebrand, 1985).

Presentan adaptaciones anatómicas y fisiológicas que se relacionan con su modo de vida subterráneo. Lessa y colaboradores (2008) sugieren que, durante la evolución temprana de los linajes que dieron lugar a los ctenómidos, los cambios en el comportamiento probablemente precedieron al origen de las adaptaciones estructurales. De esta manera, la demanda funcional habría dado como resultado cambios profundos en los atributos fisiológicos (McNab, 1979; Luna y Antinuchi, 2007).

Los hábitats subterráneos se consideran más estables y simples que los hábitats de superficie. Los tuco-tucos en particular, habitan túneles subterráneos formados por una galería principal que posee varias ramificaciones y un único nido, conocidos como tuqueras. A lo largo de las galerías se encuentran cámaras especializadas para el depósito de comida y defecación. Además, la mayoría de las especies, salvo excepciones como *C. sociabilis*, bloquean las entradas de las cuevas, de modo que se mantiene constante el microambiente en el interior de los túneles (temperatura, humedad y concentración de gases atmosféricos, entre otras variables), quedando protegidos frente a depredadores (Nevo, 1979; Altuna *et al.*, 1991; Gallardo y Anrique, 1991; Vassallo *et al.*, 1994; Busch *et al.*, 2000).

Dado que pasan la mayor parte de su vida bajo la superficie del sustrato (Nowak, 1999), su organismo se ha adaptado a soportar las condiciones de hipoxia y alta presión parcial de dióxido de carbono, características de sus sistemas de túneles (Busch *et al.*, 1989; Reig *et al.*, 1990). Estas características ambientales, propias de los nichos subterráneos, han conducido a presiones evolutivas similares que resultan en adaptaciones morfológicas, fisiológicas, de comportamiento y moleculares convergentes a la vida subterránea en todo el mundo (Lacey *et al.*, 2000; Reichman y Seabloom, 2002; Tomasco y Lessa, 2011; Pejo y Tomasco, 2020).

Las extremidades de los tuco-tucos, tanto anteriores como posteriores son cortas y musculosas, probablemente debido a que se encuentran adaptadas a la excavación (Ellerman, 1956; Nevo, 1979; Pearson, 1984; Reichman y Smith, 1990; Lessa *et al.*, 2008; Vassallo *et al.*, 2017; 2019). Además, poseen cerdas laterales en disposición de peine, característica de la cual deriva el nombre del género *Ctenomys* (*Ctenos*= peine y *mys*= ratón) (Cabrera y Yepes, 1960). Otras adaptaciones relacionadas con su tipo de vida comprenden un torso robusto y cilíndrico, cabeza grande con cuello musculoso y poco diferenciado, cola corta, abertura bucal atrás de dos incisivos y uñas fuertes (Nevo, 1979; Reig *et al.*, 1990; Nowak, 1999). Sus ojos y orejas son pequeños, pero su capacidad auditiva se encuentra muy desarrollada (Cabrera y Yepes, 1960; Schleich *et al.*, 2010; Vega-Zuniga *et al.*, 2017).

El género *Ctenomys* es fenotípicamente muy diverso, los caracteres más variables entre las especies de este género son en el color del pelaje y el tamaño corporal, que varía desde 100 gramos de peso y 220 milímetros de longitud total del cuerpo en *C. pundti* Nehring, (1900) hasta 1.100 gramos de peso y 680 milímetros de longitud total del cuerpo en machos de *C. conoveri* Osgood, 1946 (Apfelbaum *et al.*, 1991; Reig *et al.*, 1990). Las diferencias de tamaño corporal se correlacionan con sus preferencias de hábitat, ya que dependiendo del hábitat puede variar la proporción relativa de músculos, que explican el rendimiento excavador (Malizia *et al.*, 1991; Vassallo, 1993, 1998).

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). Son herbívoros generalistas, debido a las limitaciones y altos costos energéticos asociados con la búsqueda de alimentos alrededor de sus madrigueras. Estudios basados en metabarcoding revelan que consumen más del 60% de las familias de plantas que encuentran en el suelo, con preferencia por las poaceas (Lopes *et al.*, 2020). Su alimentación está basada principalmente en la fracción vegetal aérea de las plantas, como hojas y tallos, pero también consumen semillas y raíces (De Oliveira y Bonvicino, 2006). La vegetación no sólo suministra alimento sino que también afecta los patrones de ventilación y el flujo de calor dentro de los sistemas de madriguera (Busch *et al.*, 2000).

En cuanto a la reproducción, los tuco-tucos reconocen señales químicas intraespecíficas en la orina y las heces. Esto les permite identificar el estado reproductivo de los individuos del sexo opuesto y así seleccionar los que estén listos para copular (Zenuto y Fanjul, 2002; Zenuto *et al.*, 2004). El comportamiento de apareamiento depende en gran medida de las vocalizaciones (Schleich y Antenucci, 2009). Para establecer dominios territoriales en las áreas de distribución de las poblaciones emiten el característico sonido "*tuc*" que da origen al nombre común de estos animales (tuco-tucos) (Redford y Eisenberg, 1992). Si bien los ejemplares de ambos sexos son capaces de vocalizar, las hembras lo hacen con menor frecuencia, y su función sigue siendo poco conocida. En cambio, los machos utilizan sus

vocalizaciones principalmente para disminuir los encuentros con otros machos, pero también para encontrar a las hembras (Amaya *et al.*, 2016).

1.3. Características poblacionales e importancia del género *Ctenomys*

Los tuco-tucos 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. pearsoni*: $2n=56-70$; *C. perrensi*: $2n=50-58$, entre otras) (Freitas, 1994; Tomasco y Lessa, 2007). En la evolución cariotípica del género *Ctenomys* se han producido numerosos reordenamientos cromosómicos como inversiones pericéntricas (Freitas y Lessa, 1984), translocaciones robertsonianas (Reig y Kiblicky, 1969), fusiones en tándem y supresiones parciales o totales de cromosomas, y duplicaciones de segmentos eucromáticos y heterocromáticos (Gallardo, 1991; Massarini *et al.*, 1991; 2002). Si bien han sido descritas inversiones y/o traslocaciones como responsables de los cambios en el número fundamental (Ortells y Barrantes, 1994; Caraballo, 2013), y por lo tanto del surgimiento de potenciales barreras reproductivas (Caraballo, 2016), no todos los autores están de acuerdo con dicha hipótesis (Tomasco y Lessa, 2007). Su increíble ritmo de especiación (Castillo *et al.*, 2005) 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 este sentido, el género *Ctenomys* constituye un excelente modelo para poner a prueba hipótesis evolutivas y estudiar la dinámica de la evolución cromosómica y patrones de variación genética a través del tiempo y del espacio (Reig *et al.*, 1990).

Las cuevas se encuentran principalmente ocupadas por un único individuo y forman poblaciones de baja densidad (Lacey *et al.*, 2000), excepto por las hembras y sus crías hasta el estadio juvenil (Cutrera *et al.*, 2005).

Sin embargo, existen algunas excepciones al hábito solitario, siendo el caso más extremo el de *C. sociabilis* Pearson y Christie, 1985, en el cual pueden coexistir varias hembras y un macho adulto por cueva (Lacey, 2003). Otra especie que presenta un nivel de contacto social mayor es *C. rionegrensis*, con

individuos que comparten el área de actividad, pero no los nidos (Tomasco *et al.*, 2019).

Las poblaciones de *Ctenomys* se distribuyen en el espacio formando un conjunto de *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.*, 2000). Esto conlleva a la formación de poblaciones reducidas y fragmentadas, constituidas por pequeñas unidades genéticas caracterizadas por una baja variabilidad genética intrapoblacional y una alta divergencia genética interpoblacional (Lacey *et al.*, 1999; Steinberg y Patton, 2000; Fernández-Stolz *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007).

A causa de su limitada movilidad individual, la distribución en parches de sus poblaciones locales, y en general una alta dependencia al tipo de hábitat que ocupan, los roedores subterráneos conforman excelentes modelos de estudio para realizar abordajes genético-poblacionales y metapoblacionales (Mora, 2009).

1.4. Distribución de los ctenómidos

La adaptación al hábitat subterráneo con pequeñas variaciones permitió la radiación del género en múltiples especies y formas nominales con la consiguiente ocupación de nichos ambientales subterráneos en el cono sur de Sudamérica. El resultado de estos eventos es una gran distribución geográfica (Reig *et al.*, 1990). Estos se distribuyen en América del Sur desde el altiplano peruano, por debajo de los 10° de latitud sur, hasta Tierra del Fuego, y poseen representantes en Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Uruguay y Brasil, ocupando una gran diversidad de hábitats, desde el nivel de mar, hasta casi los 5.000 metros de altitud (Bidau, 2015).

1.4.1. Distribución y características generales de ctenómidos de la provincia de Entre Ríos

En el caso particular de la provincia de Entre Ríos, existe poca información sobre cuántas y cuáles son las especies que habitan la región. A continuación se detallan las especies reportadas para la misma.

1.4.1.1. *Ctenomys rionegrensis* (Langguth y Abella, 1970)

Localidad tipo: Balneario Las Cañas, boca del Arroyo Las Cañas, 7 km al sudoeste de Fray Bentos, Río Negro, Uruguay (Langguth y Abella, 1970).

Distribución: En Uruguay la especie habita en el sureste del departamento de Río Negro, entre el Río Negro y el Río Uruguay. En el territorio argentino se ubica en la costa del Río Uruguay, ubicado en la provincia de Entre Ríos. Trabajos previos indican la existencia de poblaciones de *C. rionegrensis* en distintas localidades de la provincia, como en Ibicuy y Paraná (Altuna *et al.*, 1986; Ortells *et al.*, 1990; Massarini, 1996; D'Elía *et al.*, 1999; Caraballo *et al.*, 2020), y se han identificado varias poblaciones de tuco-tucos en otras regiones que también podrían pertenecer a dicha especie, como Paranacito, Parque Nacional El Palmar, Ubajay, Victoria, Concordia, Colonia Yerurá (Reig *et al.*, 1966; Reig y Kiblisky, 1969; Langguth y Abella, 1970; Muzzachiodi, 2007).

Los ejemplares de esta especie son relativamente pequeños, habiendo una diferencia en el tamaño corporal entre sexos. Los machos poseen una longitud total del cuerpo que varía entre 249–273 mm, y el de las hembras varía entre 227–273 mm. También muestran una variación notable en el color del pelaje con tres morfos: melánico, agutí y dorso oscuro (D'Elía *et al.*, 1998; Wlasiuk *et al.*, 2003).

Las densidades poblacionales son altas, hasta 40 adultos por hectárea (Tassino, 2006), con múltiples animales a veces capturados en la misma entrada de la madriguera (Lessa *et al.*, 2005). Los estudios telemétricos documentaron que *C. rionegrensis* no es social, ya que los individuos no exhibieron la superposición espacial extensa ni compartieron los sitios de

anidación (Tassino *et al.*, 2011) característicos de *C. sociabilis* que viven en grupo (Lacey *et al.*, 1997; Lacey, 2000). Pero, a pesar de eso, se detectó una superposición en áreas ocupadas por adultos, lo que sugiere un patrón intermedio de uso del espacio entre los extremos de la soledad completa y la vida grupal. Además, el análisis genético de los ejemplares capturados en las mismas cuevas, muestra que no son individuos emparentados, apoyando la hipótesis de que esta especie no es estrictamente solitaria (Tomasco *et al.*, 2019). Así mismo, las pruebas de tolerancia entre individuos del mismo sexo realizadas a campo, también apoyan esta hipótesis dado que la tolerancia es mayor en esta especie (Tomasco y Lacey com. pers.) en relación a lo que ocurre en especies solitarias. En la localidad tipo, los especímenes muestran $2n = 50$ (Kiblisky *et al.*, 1977).

1.4.1.2. *Ctenomys pearsoni* (Lessa y Langguth, 1983)

Localidad tipo: Arroyo Limetas, 25 km al sureste de Carmelo, Departamento de Colonia, Uruguay (Lessa y Langguth, 1983).

Distribución: Esta especie habita en las llanuras costeras del Uruguay se distribuye a lo largo de la costa de Uruguay desde el departamento de Rocha en el este, hasta Colonia en el oeste (Tomasco y Lessa, 2007), y en parte occidental de la provincia adyacente de Entre Ríos en Argentina (Ortells *et al.*, 1990; García *et al.*, 2000; Argüelles *et al.*, 2001), distribuyéndose en ambos márgenes del río Uruguay (Caraballo, 2012). Habita en suelos arenosos costeros a lo largo del borde o cerca de las desembocaduras de los ríos (Altuna *et al.*, 1999), aunque recientemente se han reportado poblaciones más al norte, hasta aproximadamente el Río Negro (Boullosa, 2019).

Los individuos son de tamaño mediano, su longitud total es de 315–359 mm (Lessa y Langguth, 1983; González, 2001). El color del cuerpo es similar al de *C. torquatus*, la región dorsal es anaranjada y se vuelve clara hacia los costados. La porción del cuello también presenta pigmentación clara a modo de collar.

Es una especie extremadamente variable cromosómicamente, hasta ahora la más variable del género (Tomasco y Lessa, 2007; Villar *et al.*, 2014). Ha sido extensamente estudiada no sólo desde el punto de vista cromosómico, sino también molecular, y morfológico. El cariotipo de *C. pearsoni* es distintivo pero muy variable, con números diploides que varían entre $2n = 56 - 70$ en las poblaciones uruguayas (Novello y Altuna, 2002; Novello y Lessa, 1986). La población argentina de Médanos, que tiene un $2n = 70$ (García *et al.*, 2000), fue originalmente asignada a *C. torquatus*, ya que ambas especies son morfológicamente muy similares, pero una vez analizado el cariotipo, se pudo confirmar que pertenecía a *C. pearsoni* ya que estas especies presentan un cariotipo completamente distinto. Además, las poblaciones del "complejo pearsoni", es decir, aquellas poblaciones morfológicamente cercanas al ejemplar tipo de *C. pearsoni*, son cariotípicamente distintas ($2n = 56-64$; Novello y Lessa 1986), pero son molecular y morfológicamente indistinguibles entre ellas (Tomasco y Lessa, 2007).

1.4.1.3. *Ctenomys dorbignyi* (Contreras y Contreras, 1984)

Localidad tipo: Paraje Mbarigüí, Departamento Berón de Astrada, Provincia de Corrientes, Argentina (Contreras y Contreras, 1984).

Distribución: Se ha reportado que la especie habita en áreas aisladas en las provincias de Corrientes y Entre Ríos, dentro de las ecorregiones de Esteros del Iberá y Pampa de Argentina (Contreras y Contreras, 1984; Contreras y Scolaro, 1986). Estudios determinan la presencia de poblaciones en las localidades de Paraje Angostura y Mbragüi, localidad tipo de esta especie, ambas ubicadas en la provincia de Corrientes, (Contreras y Contreras, 1984; Caraballo, 2012). En la provincia de Entre Ríos, *C. dorbignyi* habita en la localidad de Paso Vera (Macheretti *et al.*, 2000).

Habita en parches arenosos lejos de los islotes boscosos que son frecuentes dentro del área de su distribución. El tamaño de la población se ve fuertemente afectado por los ciclos de lluvia anual. La densidad poblacional es baja en las poblaciones del norte y mucho más alta en las del sur.

Los ejemplares de esta especie poseen una longitud total del cuerpo que varía entre 276–323 mm. Se caracterizan por tener la región dorsal de color marrón pálido, y no poseen collar de color diferenciado. También presentan manchas postauriculares blancas, así como áreas blancas en axila y regiones inguinales (Contreras y Contreras, 1984).

El cariotipo de *C. dorbignyi* es $2n = 70$ en todas las poblaciones con una variación menor en FN (80 a 84). La similitud cariotípica con *C. pearsoni* ($2n = 70$) (García *et al.*, 2000) reforzaría el parentesco filogenético entre los dos taxones (Argüelles *et al.*, 2001).

1.4.1.4. *Ctenomys torquatus* (Lichtenstein, 1830)

Localidad tipo: Incierta. Lichtenstein (1830) escribió que el animal provenía de "las provincias del sur de Brasil a orillas del río Uruguay" (Bidau, 2015).

Distribución: Inicialmente, Reig, Contreras y Piantanida (1966) consideraron que *C. torquatus* vivía sólo en Argentina y Uruguay. Sin embargo, *C. torquatus* se distribuye desde Uruguay, al norte del Río Negro (Boullosa, 2019), hasta el sur de Brasil, en el estado de Rio Grande do Sul (Freitas, 1995), siendo la especie con mayor distribución conocida del género. Además, Freitas y Lessa (1984) notificaron la presencia de *C. torquatus* en la región oeste de Uruguay, en las localidades de Salto Nuevo, Guabiyú y El Águila, ubicadas en las inmediaciones de la provincia de Entre Ríos, por lo que podría ser posible hallar poblaciones en esta provincia.

Los ejemplares son pequeños y presentan dimorfismo sexual. Los machos son más grandes que las hembras y su tamaño varía de 222 a 315 mm. En cambio, el tamaño de las hembras varía entre 212 y 283 mm (Langguth y Abella, 1970). Se caracterizan por tener un color dorsal anaranjado parduzco que se vuelve más claro hacia los lados. Además, presentan manchas blanquecinas debajo y detrás de las orejas. La región ventral es marrón pálido-anaranjado, presentan un collar anaranjado pálido parduzco, y también poseen manchas blanquecinas en las regiones inguinal y axilar. La porción basal de pelos marrones es de

color gris oscuro, y en el caso de los pelos blanquecinos, la porción basal es de color blanco. Incluso se reportaron individuos melánicos para algunas poblaciones (Fernandes *et al.*, 2007).

Además, el cariotipo de *C.torquatus* es $2n = 40-46$, tanto para las poblaciones brasileras de Rio Grande do Sul, como para las poblaciones del norte de Uruguay.

1.5. Determinación de las especies a través de ADN mitocondrial

La molécula de ADN mitocondrial (ADNmt) consiste en material genético localizado en el interior de las mitocondrias. En animales es haploide y tiene entre 15.000 y 18.000 pb de largo, posee centenares de copias por célula (Meyer, 1993; Li y Gaur, 2000). Se encuentra compuesto por 13 genes codificantes de proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones (Awise, 2000). Muchos de éstos han demostrado ser efectivos para caracterizar la estructura genética y la historia evolutiva de las poblaciones debido a que acumulan mutaciones con una tasa mucho mayor que el ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979; Awise, 1998). Por otra parte, el ADNmt posee una tasa muy baja de transposiciones, inversiones, rearrreglos y carece de recombinación, lo que permite una mejor caracterización y seguimiento de los linajes, evitando las ambigüedades producidas por esta última (Brown, 1985).

El estudio de patrones y tasas de diversificación es de gran importancia en la biología evolutiva. Con el crecimiento de las técnicas de secuenciación de ADN, la filogenética molecular ha ganado una relevancia creciente en el estudio de las tasas de diversificación. Estas tasas están asociadas a procesos naturales como la radiación adaptativa, la selección de especies y/o la extinción, entre otros (Heard y Mooers, 2002). Una filogenia confiable es una herramienta crucial para comprender la evolución de los caracteres de comportamiento (Strier *et al.*, 2014), morfológicos (Morgan y Álvarez, 2013) o genómicos (Slamovits *et al.*, 2001).

Los métodos que usan filogenias para estimar las tasas de diversificación brindan la oportunidad de identificar grupos taxonómicos que han tenido un historial de diversificación exitoso y, en general, identificar áreas de la filogenia en las que la diversificación ha sido particularmente rápida. Estas observaciones, a su vez, pueden ayudar a identificar correlatos y posibles causas de radiaciones exitosas (Agapow y Purvis, 2002; Chan y Moore, 2002). Definir los límites entre las especies no sólo es relevante desde el punto de vista teórico, sino también para el diseño de programas de conservación y manejo de la biodiversidad (Caraballo *et al.*, 2012).

El análisis de ADNmt ha demostrado ser muy importante en los estudios de diferenciación genética debido a su tasa de evolución rápida, ausencia de recombinación y herencia (haploide) materna. Las secuencias de ADNmt son ampliamente usadas como marcadores moleculares para los estudios de macro y microevolución (Brown *et al.*, 1979). También debemos tener en cuenta que el ADNmt es más sensible a la deriva genética que los marcadores nucleares (Larmuseau *et al.*, 2010), porque su tamaño efectivo es cuatro veces menor.

Además, el atractivo del ADNmt para los estudios filogenéticos radica en su rápido tiempo de coalescencia, altos niveles de variación interespecífica y cebadores y protocolos fácilmente disponibles para amplificación y secuenciación. A pesar de estas ventajas, el ADNmt a menudo muestra altos niveles de homoplasia, como se espera por su rápida tasa de evolución (Castillo *et al.*, 2005).

Para los análisis filogenéticos los marcadores mitocondriales más ampliamente utilizados en la bibliografía para especies del género *Ctenomys* son el gen del Citocromo b (Lessa y Cook, 1998; Mascheretti *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2005; Parada *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2013) y el de la subunidad 1 de la Citocromo oxidasa (Caraballo *et al.*, 2012; Gardner *et al.*, 2014).

1.5.1. Marcador molecular mitocondrial: Citocromo b

A partir de este marcador molecular se han podido resolver las relaciones filogenéticas de numerosos grupos taxonómicos a diferentes niveles: desde órdenes y familias, hasta subpoblaciones dentro de una especie (Steuber *et al.*, 2005). En las últimas décadas se ha utilizado además, para la caracterización filogeográfica y para determinar la dinámica poblacional (Mirol *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2011; Caraballo *et al.*, 2012). Es el gen más utilizado para resolver las relaciones evolutivas entre vertebrados debido a que la tasa de evolución en posiciones silenciosas es relativamente alta y a la suficiente variabilidad genética de la secuencia primaria (Hatefi, 1985; Irwin *et al.*, 1991; Avise y Walker, 1999). Por otra parte, el hecho de que exista un gran número de secuencias disponibles para *Ctenomys* en las bases de datos genéticos, proporciona una gran ventaja a la hora de analizar relaciones evolutivas dentro del género. Estudios filogenéticos con este marcador muestran una politomía basal entre los complejos de especies de ctenómidos, que presumiblemente refleja la diversificación temprana y rápida dentro del género (Lessa y Cook, 1998; Castillo *et al.*, 2005), y sugieren que la especiación en *Ctenomys* podría haber implicado la diversificación simultánea de los linajes (Lessa y Cook, 1998; Parada *et al.*, 2011).

1.5.2. Marcador molecular mitocondrial: Citocromo oxidasa I

El gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) posee algunas características adicionales que lo hacen particularmente adecuado como marcador molecular para estudios evolutivos. En primer lugar, su participación como catalizador terminal en la cadena respiratoria mitocondrial ha sido bien estudiado a nivel bioquímico, y su tamaño y estructura parecen estar conservados en todos los organismos aeróbicos investigados (Saraste, 1990). La COI está involucrada tanto en el transporte de electrones como en la translocación asociada de protones a través de la membrana, y se ha demostrado que contiene una variedad de diferentes tipos de dominios funcionales que incluyen sitios de ligandos, componentes del canal

de protones, hélices estructurales y bucles hidrofílicos intercalados (Saraste, 1990; Gennis, 1992). Los residuos de aminoácidos en los centros de reacción, que están muy conservados, no dominan toda la molécula de COI, lo que permite una considerable variabilidad en algunas regiones. El hecho de que existan regiones altamente conservadas, y a su vez otras muy variables, y que a su vez estén estrechamente asociadas en un gen mitocondrial hace que el gen COI sea particularmente útil para estudios evolutivos (Lunt *et al.*, 1996; Caraballo, 2013).

En segundo lugar, el gen COI codifica para la mayor de las tres subunidades de la citocromo oxidasa presentes en las mitocondrias (Clary y Wolstenholme, 1985), lo que permite amplificar y secuenciar muchos más nucleótidos dentro del mismo complejo funcional, en comparación con cualquier otro gen mitocondrial (Lunt *et al.*, 1996).

Además, Hebert, Cywinska y Ball (2003) señalan que las ventajas de la utilización de COI en lugar de otros marcadores son las siguientes, amplifican en todos los Phylum de animales, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no sólo de especies cercanamente emparentadas sino también la de grupos filogeográficos dentro de una misma especie, y tendría un mayor rango de señal filogenética que otros marcadores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que Tobe, Kitchener y Linacre (2010) hallaron que, entre los mamíferos, Cit-b tiene más señal y poder discriminatorio que COI.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Considerando que en regiones cercanas al área de estudio se ha reportado la presencia de diversas especies de ctenómidos como *C. rionegrensis*, *C. pearsoni*, *C. torquatus* y *C. dorbignyi*, las poblaciones muestreadas, Ubajay y Paraje Mabragaña, pertenecientes a la provincia de Entre Ríos, corresponderán a una o varias de dichas especies.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo del trabajo es determinar los límites taxonómicos y distribucionales de los tuco-tucos del centro de la provincia de Entre Ríos utilizando los marcadores mitocondriales Cit-b y COI, y caracterizar para cada especie identificada sus patrones de variabilidad genético-poblacionales.

3.2. Objetivos específicos

- Llevar a cabo una primera caracterización de la variabilidad genética poblacional para los tuco-tucos de las localidades muestreadas (Ubajay y Paraje Mabragaña, provincia de Entre Ríos), a través de los marcadores moleculares mitocondriales Cit-b y COI.
- Inferir las relaciones evolutivas y filogenéticas entre las poblaciones de especies de este estudio, clarificando sus relaciones con otras especies del género, o en su defecto sugerir que podría tratarse de una nueva especie.
- Realizar un análisis poblacional preliminar comparando con secuencias disponibles en la base de datos genéticos Genbank que permitan inferir la historia evolutiva de la(s) especie(s) encontradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Trabajo de laboratorio

Para el análisis se utilizaron porciones de tejido de las vísceras de ejemplares almacenados, en etanol al 95% en el *freezer* a -20 °C, en el Centro de Bioinvestigaciones (CeBio) obtenidos en la campaña del 7 abril del 2019, provenientes de dos localidades ubicadas en la región central de la provincia de Entre Ríos, Estancia El Federico, Ruta Provincial 38, a 10 km al oeste de la localidad de Ubajay (31°46'33.8" S, 58°22'45.7" W) (n=3 ; ER01, ER02, ER03) y Ruta Nacional 14 (Km 175) en cercanías del Paraje Mabragaña (32°04'26.8"S 58°15'13.3"W) (n=3; ER04, ER05, ER06) (Figura 4.1).

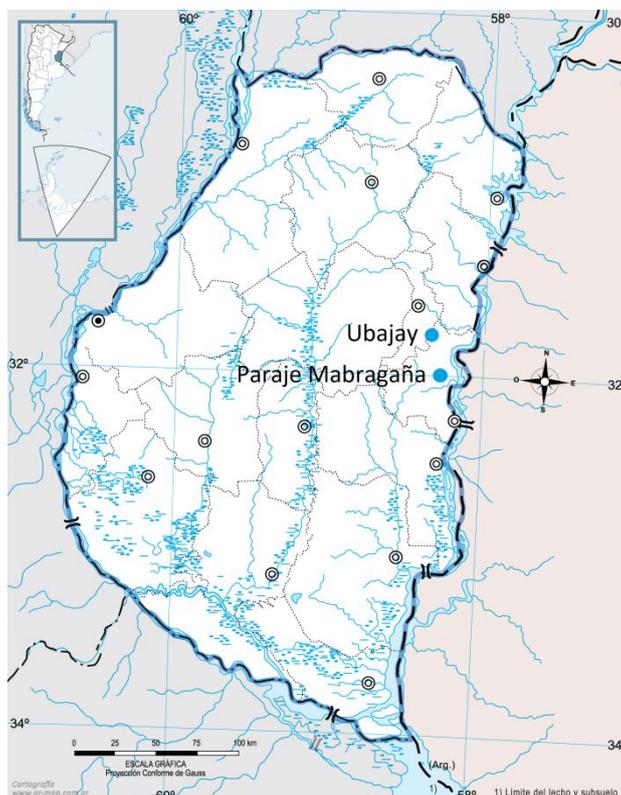


Figura 4.1. Mapa de la provincia de Entre Ríos en el que se destacan las localidades de Ubajay (31°46'33.8" S, 58°22'45.7" W) y Paraje Mabragaña (32°04'26.8"S, 58°15'13.3"W), sitios en los que fueron tomadas las muestras utilizadas para los análisis genéticos en *Ctenomys*. (Figura modificada de http://mapoteca.educ.ar/files/wp-content/mapas/entre-rios/politico-mudo/impresion/entre-rios_politico-mudo.jpg?dl)

Se analizaron dos marcadores moleculares mitocondriales: el gen de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa C (COI), y el citocromo b (Cit-b). El

primero ha sido poco usado en el género, pero es muy utilizado para barcoding, método en el que se identifican especies utilizando una sección corta de ADN de un gen específico. El segundo, es el marcador que ha sido utilizado casi exclusivamente para resolver la sistemática del género, por lo que es ineludible su uso en este trabajo. Además, una vez que se identifique la especie a la que pertenecen las nuevas poblaciones, se realizarán estudios de genética de poblaciones con este último marcador en un contexto filogeográfico.

Si bien se siguió la misma estrategia general, se utilizaron procedimientos sutilmente diferentes para cada uno de los genes examinados.

4.1.1. Obtención de datos para el gen COI

4.1.1.1. Extracción de ADN

A partir de las muestras de tejido se procedió a la extracción de ADN genómico mediante el protocolo de extracción con CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Luego se corroboró la presencia del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v (masa en volumen) teñido con bromuro de etidio. Para ello se sembraron 3 µl de cada muestra por calle con 3 µl de buffer de corrida utilizando en simultáneo un marcador de peso molecular. Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: 100 V (voltios) por 50 minutos aproximadamente. Finalmente, para visualizar las bandas de ADN se utilizó un transiluminador con luz ultravioleta.

4.1.1.2 Amplificación por PCR

Se amplificó por PCR un fragmento de la subunidad 1 del gen de la COI, de aproximadamente 720pb, con los primers LCO-1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO-2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), siguiendo el protocolo de Caraballo y colaboradores (2012), y el protocolo disponible por el

“Consortium for the Barcode of Life” (<http://www.barcoding.si.edu/protocols.html>).

La PCR se realizó con un volumen final de 20 µl de la mezcla de reacción, conteniendo entre 25 y 100 ng de ADN; MgCl₂ 1,5 mM; primer forward 0,4 pmol/µl; primer reverse 0,4 pmol/µl; dNTPs 0,4 mM, Buffer de reacción 1X; Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) 0,05 U/µl y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final. El termociclador utilizado para realizar la PCR fue el Gene Pro ThermalCycler (BioerTechnology CO., LTD).

Las amplificaciones consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos. Luego se realizaron 34 ciclos, de los cuales cada uno consta de tres fases; desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, ligado de los *primers* a la cadena molde de ADN a 47°C por 30 segundos y extensión a 74°C por 45 segundos. Y por último una extensión final a 74°C durante 5 minutos, seguido de 10 minutos a 4°C.

Los productos amplificados fueron purificados utilizando 10U de Exonucleasa I (ThermoScientific) y 1U de FastAP Fosfatasa alcalina termosensible (ThermoScientific) incubadas a 37°C por 15 minutos y luego a 85°C por otros 15 minutos para detener la reacción.

Para evaluar la eficiencia de la amplificación se realizó una 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. El gel resultante se observó bajo luz ultravioleta. Para inferir el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (*qLadder precisión*, PB-L).

4.1.1.3. Determinación de la concentración de ADN

Para poder determinar la concentración de cada muestra se tomó una fotografía de alta resolución del gel, y se analizó utilizando el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004).

Los productos de PCR con concentraciones menores a 30 ng/μl fueron reamplificados para obtener la concentración requerida para su posterior secuenciación.

4.1.2. Obtención de datos para el gen Citocromo b

4.1.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico en este caso se realizó mediante una digestión con proteinasa K, seguida de una precipitación salina de las proteínas, y del ADN con etanol (Miller *et al.*, 1988).

4.1.2.2. Amplificación por PCR

Se amplificó por PCR el gen del Cit-b completo. Se utilizó el par de *primers* NTUCO05C (5'- TAACCAAGACTAATGATAYGAAAAACC- 3'), diseñado para este fin y el *primer* TUCO14A (5'-CCAATGTAATTTTTTATAC-3') (Wlasiuk *et al.*, 2003).

Cada muestra se amplificó en 20ul de volumen final, conteniendo 10ul de Kit GoTaqHotStart (Promega), 3 ul de cada *primer* y 4 ul de dilución 1:100 de la extracción de ADN genómico.

El ciclado se realizó en un termociclador Thermo (PxEthermalcycler), con 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C de desnaturalización, 45°C de asociación y 72°C de extensión (30 segundos cada etapa), y terminado con 72°C durante 5 min.

Para evaluar la cantidad y calidad de los productos de PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa 0,8 %m/v, a 170 V durante 20 min, sembrando 2 ul de producto de PCR por carril, y se visualizaron con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Aquellos productos de PCR del tamaño esperado, sin productos secundarios y de buena calidad, fueron enviados para su secuenciación.

4.2. Secuenciación de las muestras

Seguido a esto los productos amplificados y purificados fueron secuenciados por el método Sanger utilizando el secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) de la Empresa MACROGEN, Inc., Seoul, Korea.

4.3. Análisis de los datos

4.3.1. Análisis de COI

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y corregidas utilizando el programa BioEdit (Hall, 2004). Una vez editadas, se verificó la ausencia de inserciones/delecciones que pudieran modificar el marco de lectura, para corroborar que no se estaba en presencia de un pseudogen.

Se realizó un alineamiento múltiple agregando además otras secuencias que fueron obtenidas de Genbank correspondientes a *C. pearsoni*, *C. rionegrensis*, *C. dorbignyi* y *C. torquatus*. También se utilizaron secuencias de otros grupos de *Ctenomys* definidos por Parada *et al.* (2011), en particular secuencias de *C. azarae*, *C. porteousi*, *C. australis*, *C. flamarioni*, *C. talarum*, *C. perrensi*, *C. minutus*, *C. lami*, *C. boliviensis*, *C. nattereri*, *C. ibicuensis*, *C. sociabilis* y *C. leucodon* (Tabla 4.1). Para este alineamiento múltiple se utilizó el algoritmo ClustalW del programa BioEdit (Hall, 2004).

Tabla 4.1. Secuencias de COI para diferentes especies de *Ctenomys* utilizadas para el alineamiento múltiple, con sus respectivos números de acceso al Genbank y citas.

ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO	REFERENCIA
<i>C. rionegrensis</i>	JQ341044	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. rionegrensis</i>	JX275502	Caraballo <i>et al.</i> , 2012
<i>C. rionegrensis</i>	HM544130	Tomasco y Lessa, 2011
<i>C. azarae</i>	JQ341046	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. porteousi</i>	JQ341045	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. australis</i>	JQ341043	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. flamarioni</i>	JQ341052	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. talarum</i>	JQ341049	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. torquatus</i>	JQ389070	Roratto <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. perrensi</i>	JX275505	Caraballo <i>et al.</i> , 2012
<i>C. dorbignyi</i>	JX275525	Caraballo <i>et al.</i> , 2012

<i>C. minutus</i>	HM237010	Lopes <i>et al.</i> , 2013
<i>C. lami</i>	JQ322902	Lopes y Freitas, 2012
<i>C. pearsoni</i>	KT900155	Caraballo <i>et al.</i> , 2016
<i>C. boliviensis</i>	JQ341048	Lopes <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. nattereri</i>	JQ389082	Roratto <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. ibicuensis</i>	JQ389081	Roratto <i>et al.</i> , (sin publicar)
<i>C. sociabilis</i>	HM544129	Tomasco y Lessa, 2011
<i>C. leucodon</i>	NC020659	Tomasco y Lessa, 2011

Esto nos permitió obtener árboles filogenéticos mediante los métodos de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud (MV) y *neighbor joining* (NJ), empleando los modelos de sustitución de Maximum Composite Likelihood y Tamura-Nei respectivamente, con el programa MEGAX (Kumar *et al.*, 2018). Para estimar el apoyo estadístico de cada nodo se realizó un análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 500 seudoréplicas. Un tercer tipo de abordaje filogenético se llevó a cabo a través del método de inferencia bayesiana mediante el paquete informático BEAST 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019). Para ello, previamente se estimaron los modelos de sustitución con jModelTest (Posada, 2008). El cual arrojó que el modelo que mejor ajusta es HKY+G. Se utilizó un modelo de reloj *lognormal* relajado y una tasa de ramificación *Coalescent Constant Population*. El programa Tracer 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) fue empleado para determinar la convergencia de las cadenas de Markov que se alcanzó en todas las ejecuciones. Los valores de tamaño de muestra efectivo ESS fueron superiores a 200, siendo este el límite utilizado para la confiabilidad de la calidad del muestreo de árboles que hace el análisis. Los árboles se resumieron con la opción de *Maximum Clade Credibility* (MCC) usando TreeAnnotator 2.5.2 (Bouckaert *et al.*, 2019). Y el árbol final fue visualizado en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2018).

Luego, se alinearon las secuencias en estudio solo con las de *C. rionegrensis* reportadas en Genbank (Tabla 4.2). Para analizar tanto la diversidad haplotípica como la nucleotídica, y el número de sitios polimórficos, se utilizó el programa DNASP5 (Librado y Rozas, 2009). Las relaciones haplotípicas fueron obtenidas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.* 1999) a través del programa PopART v1.7 (Leigh y Bryant, 2015).

Tabla 4.2. Secuencias de COI para *C. rionegrensis* obtenidas de Genbank. Se incluyen los respectivos números de acceso al Genbank, la localidad a la que pertenecen las muestras y los autores que las describieron.

NÚMERO DE ACCESO A GENBANK	LOCALIDAD	REFERENCIA
JQ341044	Tabaré	López <i>et al.</i> , (no publicado)
JX275502	Guarida	Caraballo <i>et al.</i> , 2012
JX275503	Tabaré	Caraballo <i>et al.</i> , 2012
HM544130	Abrojal	Tomasco y Lessa, 2011

4.3.2. Análisis de Cit-b

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas utilizando el programa Proseq3 (Filatov, 2002) corroborando los cambios y la ausencia de inserciones/deleciones, que modificaran el marco de lectura.

Estas secuencias fueron alineadas con otras previamente reportadas en Genbank (Tabla 4.3). Se incluyeron haplotipos de Cit-b analizados de poblaciones de *C. rionegrensis* estudiadas hasta el momento en la provincia de Entre Ríos y sus alrededores. Diversos indicadores de variabilidad genética, como la diversidad haplotípica y nucleotídica, y el número de sitios polimórficos, fueron estimados con el programa DNASP5 (Librado y Rozas, 2009). Las relaciones haplotípicas fueron obtenidas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.* 1999) a través del programa PopART v1.7 (Leigh y Bryant, 2015). Con el programa Arlequin (Escoffier *et al.*, 2010) se realizaron las pruebas de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y F_s de Fu (Fu, 1997), el Exact test (Fisher, 1934) para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones a partir de las frecuencias haplotípicas, para finalmente realizar un análisis de la varianza molecular (AMOVA) para evaluar si está estructurada la variación genética, y poner a prueba el posible efecto del río Uruguay como barrera geográfica.

Tabla 4.3. Secuencias de Cit-b utilizadas para la red haplotípica. Se detallan las secuencias de *C. rionegrensis* con su número de acceso a Genbank, la localidad a la que pertenecen las muestras y los autores que las describieron. PNPD=Parque Nacional Pre Delta.

NÚMERO DE ACCESO A GB	LOCALIDAD	REFERENCIA
AF119103	Las Cañas	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
AF538366	Tabaré	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538377	Tabaré	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF119104	Los Arrayanes	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
AF538367	Los Arrayanes	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538368	Los Arrayanes	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538369	Los Arrayanes	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538370	Mafalda	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538371	Mafalda	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538372	Mafalda	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF119114	El Abrojal	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
AF538373	Guarida, Mafalda y Nuevo Berlín	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538374	Chaparei	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538375	Chaparei	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF538376	Chaparei	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
AF119105	Ibicuy	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
AF119106	Paraná	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
HM544130	El Abrojal	Tomasco y Lessa, 2011
MK404659	PNPD	Caraballo <i>et al.</i> , 2020
MK404657	PNPD	Caraballo <i>et al.</i> , 2020

Para el análisis filogenético, se realizó un nuevo alineamiento múltiple en el que se incluyeron secuencias pertenecientes a otras especies de *Ctenomys*, además de otros géneros de roedores histricognatos. Se utilizaron: i) 22 secuencias de *C. rionegrensis*, entre ellas las dos secuenciadas en este trabajo ii) cuatro especies del grupo *mendocinus*, iii) 37 especies de *Ctenomys* de diferentes grupos definidos en Parada *et al.* (2011) y iv) 16 representantes de otras familias, como Octodontidae, Caviidae, Capromyidae, Echimyidae, Erethizontidae, Dasyproctidae y Thryonomyidae, también disponibles en Genbank (Tabla 4.4). Con el objetivo de estimar la filogenia y al mismo tiempo estimar los tiempos de divergencia de *C. rionegrensis* y de la colonización de esta especie en Uruguay, se utilizó en programa BEAST 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019), como se detalla a continuación.

Tabla 4.4. Especies utilizadas para estimar filogenia y divergencia de *C. rionegrensis*, con sus respectivos números de acceso a Genbank y citas.

ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO	REFERENCIAS
<i>C.rionegrensis</i>	AF119103	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. rionegrensis</i>	AF538366	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
<i>C. rionegrensis</i>	AF538377	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2004
<i>C. rionegrensis</i>	AF119104	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. rionegrensis</i>	AF538367	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
<i>C. rionegrensis</i>	AF538368	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2004
<i>C. rionegrensis</i>	AF538369	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2005
<i>C. rionegrensis</i>	AF538370	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2006
<i>C. rionegrensis</i>	AF538371	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2007
<i>C. rionegrensis</i>	AF538372	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2008
<i>C. rionegrensis</i>	AF119114	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. rionegrensis</i>	AF538373	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2003
<i>C. rionegrensis</i>	AF538374	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2004
<i>C. rionegrensis</i>	AF538375	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2005
<i>C. rionegrensis</i>	AF538376	Wlasiuk <i>et al.</i> , 2006
<i>C. rionegrensis</i>	AF119105	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. rionegrensis</i>	AF119106	D'Elia <i>et al.</i> , 2000
<i>C. rionegrensis</i>	HM544130	Tomasco y Lessa, 2011
<i>C. rionegrensis</i>	MK404659	Caraballo <i>et al.</i> , 2020
<i>C. rionegrensis</i>	MK404657	Caraballo <i>et al.</i> , 2021
<i>C. flamarioni</i>	AF119107	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. australis</i>	AF370697	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>C. porteousi</i>	AF370682	Slamovits <i>et al.</i> , 2002
<i>C.mendocinus</i>	AF007062	Lessa y Cook, 1998
<i>C. sociabilis</i>	EU035177	Cutrera y Lacey, 2007
<i>C. argentinus</i>	AF370680	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>C. boliviensis</i>	AF007038	Lessa y Cook, 1998
<i>C. colvurni</i>	HM777474	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C. conoveri</i>	AF007055	Lessa y Cook, 1998
<i>C. coyhaiquensis</i>	AF119112	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. fodax</i>	HM777475	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C.frater</i>	AF007045	Lessa y Cook, 1998
<i>C. fulvus</i>	AF370687	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>C. goodfellowi</i>	AF007050	Lessa y Cook, 1998
<i>C. haigi</i>	AF422920	Leite y Patton, 2002
<i>C. lami</i>	HM777477	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C. latro</i>	HM777478	Parada <i>et al.</i> , 2012
<i>C. lewisi</i>	AF007056	Lessa y Cook, 1998
<i>C. magallanicus</i>	HM777479	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C. maulinus</i>	AF370703	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>C. minutus</i>	HM777481	Parada <i>et al.</i> , 2011

<i>C. nattereri</i>	HM777484	Parada <i>et al.</i> , 2012
<i>C. occultus</i>	HM777485	Parada <i>et al.</i> , 2013
<i>C. opimus</i>	AF007042	Lessa y Cook, 1998
<i>C. pearsoni</i>	AF119108	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. perrensi</i>	HM777487	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C. pundti</i>	HM777490	Parada <i>et al.</i> , 2012
<i>C. saltarius</i>	HM777493	Parada <i>et al.</i> , 2013
<i>C. scagliai</i>	HM777494	Parada <i>et al.</i> , 2014
<i>C. sericeus</i>	HM777496	Parada <i>et al.</i> , 2015
<i>C. talarum</i>	HM777497	Parada <i>et al.</i> , 2016
<i>C. torquatus</i>	AF119111	D'Elia <i>et al.</i> , 1999
<i>C. tuconax</i>	AF370684	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>C. tucumanus</i>	AF370691	Slamovits <i>et al.</i> , 2002
<i>C. erikacuellarae</i>	KJ778556	Gardner <i>et al.</i> , 2014
<i>C. ibicuensis</i>	JQ389020	Freitas <i>et al.</i> , 2012
<i>C. dorbignyi</i>	JQ389030	Freitas <i>et al.</i> , 2013
<i>C. roigi</i>	HM777492	Parada <i>et al.</i> , 2011
<i>C. steinbachi</i>	AF007043	Lessa y Cook, 1998
<i>Spalacopus cyanus</i>	AF007061	Lessa y Cook, 1998
<i>Octodon degus</i>	AM407929	Huchon <i>et al.</i> , 2007
<i>Aconaemys fuscus</i>	KC731571	Tomasco y Lessa, 2014
<i>Tympanoctomys barrerae</i>	AF007060	Lessa y Cook, 1998
<i>Cavia aperea</i>	AY382791	Spotorno <i>et al.</i> , (no publicado)
<i>Cavia porcellus</i>	AY382793	Spotorno <i>et al.</i> , (no publicado)
<i>Capromys pilorides</i>	AF422915	Leite y Patton, 2002
<i>Dactylomys dactylinus</i>	L23335	da Silva y Patton., 1993
<i>Dasyprocta leporina</i>	AF437808	Jansen van Vuuren <i>et al.</i> , 2004
<i>Echimyis didelphoides</i>	EU302705	Menezes <i>et al.</i> , (no publicado)
<i>Erethizon dorsatum</i>	FJ357428	Vilela <i>et al.</i> , 2009
<i>Galea musteloides</i>	GU082485	Dunnum y Salazar-Bravo, 2010
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	GU136721	Dunnum y Salazar-Bravo, 2010
<i>Myoprocta acouchy</i>	AF437781	Jansen van Vuuren <i>et al.</i> , 2004
<i>Octodontomys gliroides</i>	AF370706	Slamovits <i>et al.</i> , 2001
<i>Thryonomys swinderianus</i>	NC002658	Mouchaty <i>et al.</i> , 2001

Debido a la alta tasa mutacional del genoma mitocondrial y en particular para este marcador reportada previamente (Caraballo y Rossi, 2018), se partitionaron las secuencias de Cit-b, dejando por separado los codones 1° + 2° del codón 3°. La saturación de sustitución para cada partición se evaluó con el programa DAMBE (Xia y Xie, 2001). Luego se estimaron los modelos de sustitución para cada partición con jModelTest (Posada, 2008). El modelo que mejor ajusta para ambas particiones es GTR+Y+G. El análisis multicalibrado se realizó con el paquete informático BEAST 2.5 (Bouckaert *et al.*, 2019), y se

utilizó un modelo de reloj *lognormal* relajado y una tasa de ramificación *calibrated birth-death*. Todos los nodos calibrados se vieron obligados a ser monofiléticos para el análisis. Las calibraciones fósiles se basaron en estudios cladísticos recientes que involucraron taxones con representantes vivientes y fósiles (Vucetich *et al.*, 2015; Verzi *et al.*, 2016, Caraballo *et al.* 2018). En la Tabla 4.5 se describen las edades mínima y máxima asignadas a cada nodo calibrado. Para tener en cuenta la incertidumbre en las calibraciones de los nodos, las estimaciones en los tiempos de divergencia se llevaron a cabo asumiendo una distribución *lognormal*. Las edades mínimas se establecieron teniendo en cuenta el registro más antiguo del grupo.

Tabla 4.5. Calibración de los nodos. Se detallan las edades máximas y mínimas consideradas en millones de años (MA), tomadas de Caraballo (2018).

PUNTO	NODO	MA
A	<i>Octodontoidea</i>	27,2 – 41,0
B	<i>Echimyidae</i>	20,5 – 24,2
C	<i>Octodontinae</i>	6,8 – 9,0
D	<i>Aconaemys – Spalacopus</i>	5,0 – 9,0
E	<i>Octomys – Pipanacoctomys/Tympanoctomys</i>	2,0 – 4,0
F	<i>Ctenomys</i>	2,0 – 4,0

Se determinó la convergencia de las cadenas de Markov utilizando Tracer 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Los valores de tamaño de muestra efectivo ESS, al igual que con COI, fueron superiores a 200, por lo que podemos asumir que el análisis representa la distribución posterior de manera precisa, y los resultados son confiables. Para resumir los árboles se utilizó el TreeAnnotator 2.5.2 (Bouckaert *et al.*, 2019) con la opción de *Maximum Clade Credibility* (MCC). Y el árbol final fue visualizado en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2018).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Estimaciones de variabilidad genética

Las seis secuencias parciales (720 pb) obtenidas para el *locus* de COI permitieron diferenciar dos haplotipos diferentes, uno en cada una de las dos nuevas poblaciones estudiadas, Hco1 (ER01, ER02, ER03) en Ubajay y Hco2 (ER04, ER05, ER06) en Paraje Mabragaña. Ambos haplotipos difieren en dos transiciones en las posiciones 409 y 422 del fragmento analizado.

Para Cit-b, las 6 secuencias obtenidas también fueron parciales, obteniéndose 1.071pb de un total de 1.140pb. Al igual que para COI, para Cit-b también se registraron dos haplotipos, Hcb1 (ER01, ER02, ER03) en Ubajay y Hcb2 (ER04, ER05, ER06) en Paraje Mabragaña. Ambos haplotipos se diferencian por 5 transiciones que se detallan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Sitios variables encontrados para los haplotipos Hcb1 (Ubajay) y Hcb2 (Paraje Mabragaña) correspondientes al fragmento analizado del citocromo b (1.071 pb) de *C. rionegrensis*.

HAPLOTIPO	POSICIÓN				
	120	468	499	744	930
Hcb1	C	T	G	C	C
Hcb2	T	C	A	T	T

5.2. Análisis filogenético

Se observó una congruencia entre los resultados para COI obtenidos mediante las tres metodologías estudiadas, *Máxima verosimilitud* (MV), *Neighbor joining* (NJ) e *Inferencia bayesiana* (IB), por lo que sólo se muestran los resultados a través de este último método (Figura 5.1). Los resultados indican que ambos haplotipos agrupan con secuencias de *C. rionegrensis* conformando un grupo monofilético con alto valor de probabilidad posterior (1). A su vez, este clado agrupa con secuencias de *C. australis*, *C. porteousi*, *C. azarae* y *C. flamarioni*, pertenecientes al grupo mendocinus.

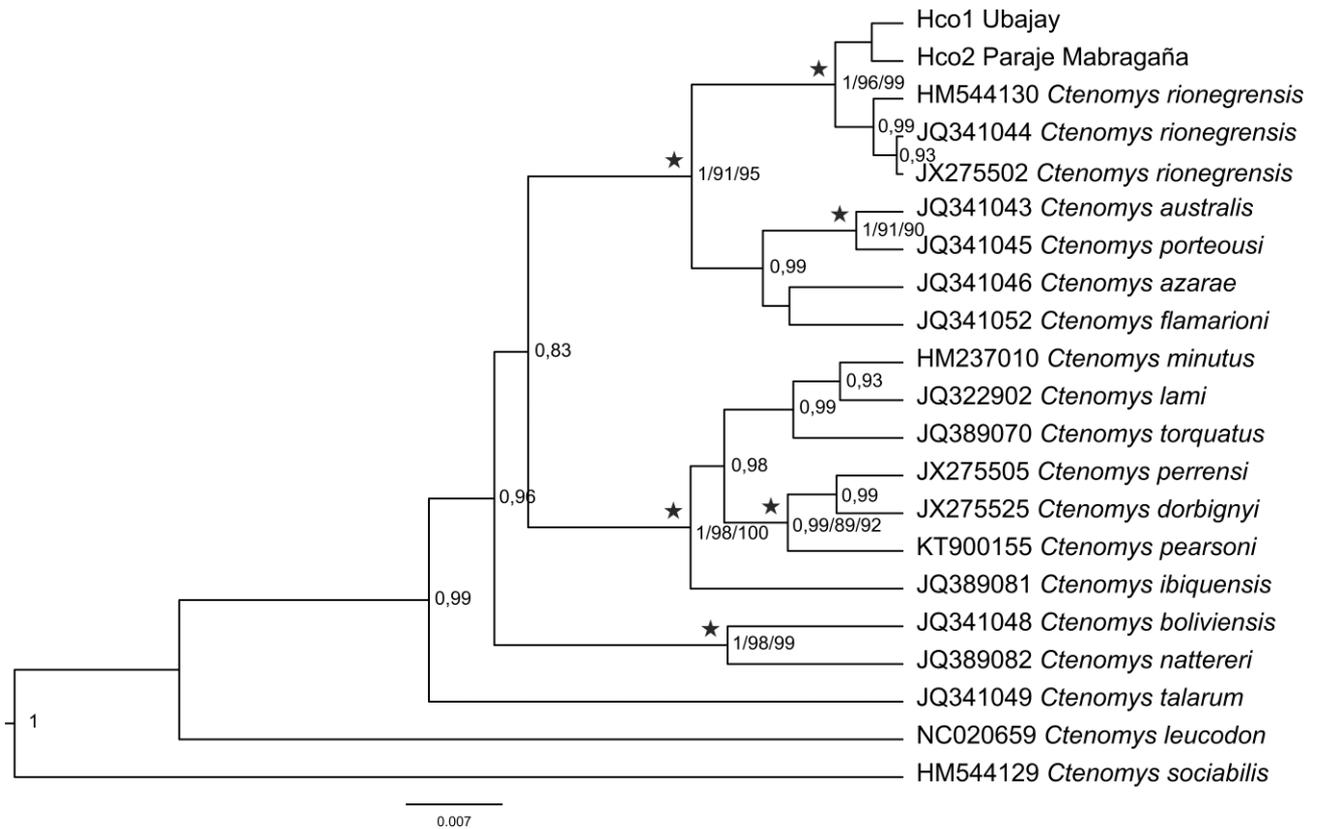


Figura 5.1. Árbol filogenético estimado por inferencia bayesiana a partir de secuencias parciales de COI. Los nodos marcados con estrellas tienen un alto apoyo estadístico (>0,8) en los análisis realizados con las tres metodologías, (*Inferencia bayesiana/ Máxima verosimilitud/ Neighbor joining*).

En el caso de Cit-b, las reconstrucciones filogenéticas también muestran que los individuos de Ubajay y Paraje Mabragaña están estrechamente relacionadas e incluidos en el clado de *C. rionegrensis*, cuya monofilia se corrobora con alto valor de probabilidad posterior (1) (Figuras 5.2 y 5.3). La asignación de *C. rionegrensis* a las poblaciones analizadas, permite ampliar la distribución de la especie, como se observa en la Figura 5.4.

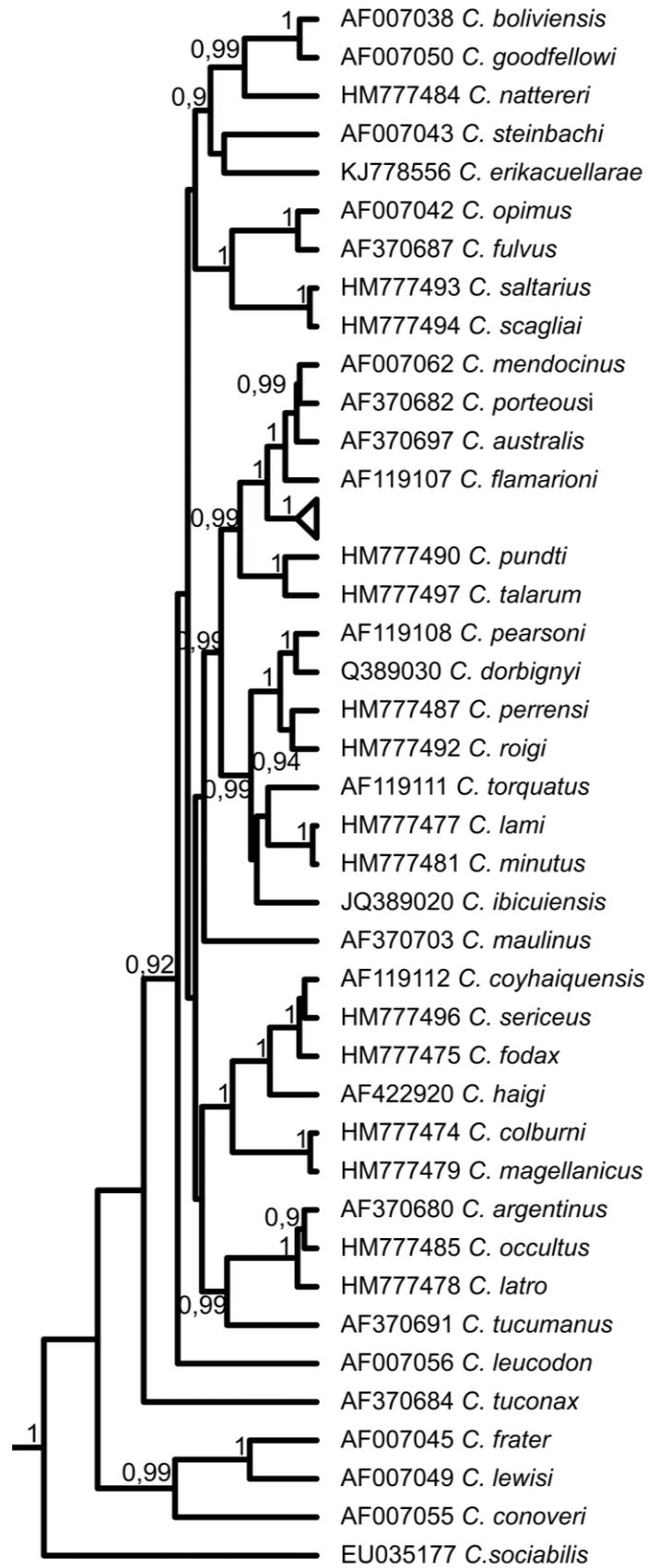


Figura 5.2. Árbol filogenético estimado por el método de inferencia bayesiana a partir de secuencias parciales de Cit-b. El nodo de *C. rionegrensis* se encuentra colapsado con un valor de probabilidad posterior máximo (1). En los nodos restantes se detallan los valores de probabilidad posterior de los nodos con un alto apoyo estadístico (>0,8).

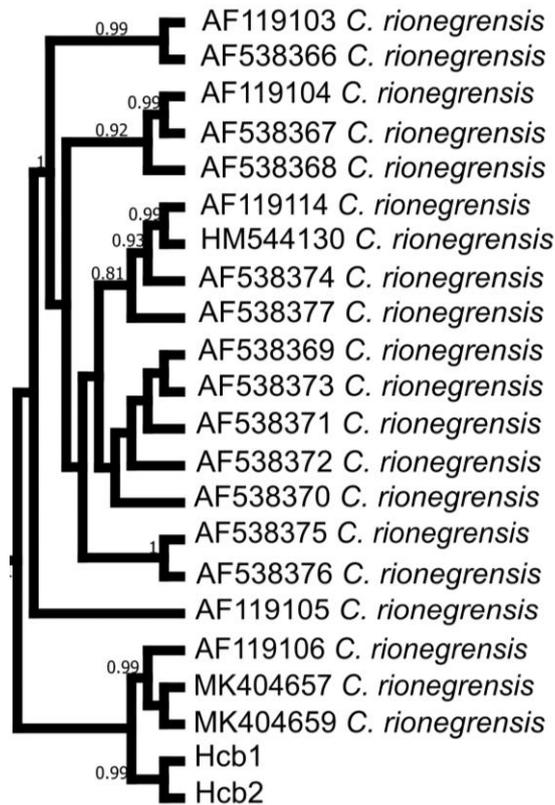


Figura 5.3. Desarrollo de la sección colapsada del árbol filogenético de secuencias parciales de Cit-b estimado por inferencia bayesiana. Se detallan los resultados del nodo correspondiente a *C. rionegrensis* incluyendo los valores de probabilidad posterior de los nodos que presentan un alto valor estadístico (>0,8).

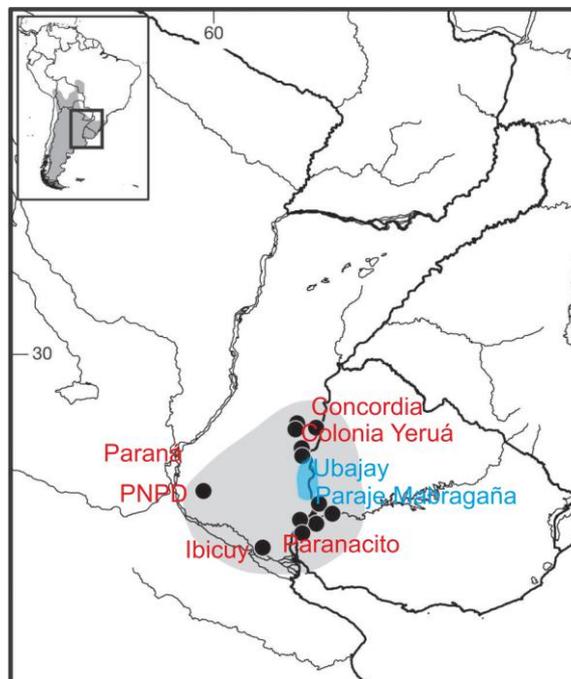


Figura 5.4. Mapa de la distribución ampliada de *C. rionegrensis*. Se muestra la distribución ampliada de la especie donde se detallan (en celeste) las localidades de las muestras en este trabajo (modificado de Bidau 2015).

5.3. Relaciones haplotípicas para *C. rionegrensis*

Dadas las relaciones filogenéticas recuperadas a través de los diferentes métodos de reconstrucción filogenética para ambos marcadores, se estimaron las relaciones haplotípicas para *C. rionegrensis*.

Se analizaron 2 haplotipos para COI provenientes de Genbank en conjunto con nuestros 2 haplotipos, obteniéndose un total de 4 haplotipos (Figura 5.5). Las relaciones filogenéticas muestran una mayor diferenciación genética entre las poblaciones argentinas y las uruguayas, teniendo una diferencia de entre 4 y 5 sustituciones. Dentro de las poblaciones uruguayas uno de los haplotipos (Hco3) es compartido por dos localidades, Tabaré y Guarida. Este se diferencia del otro haplotipo uruguayo (Hco4) en tres sustituciones. Los haplotipos argentinos (Hco1 y Hco2) solo se diferencian en 2 sustituciones.

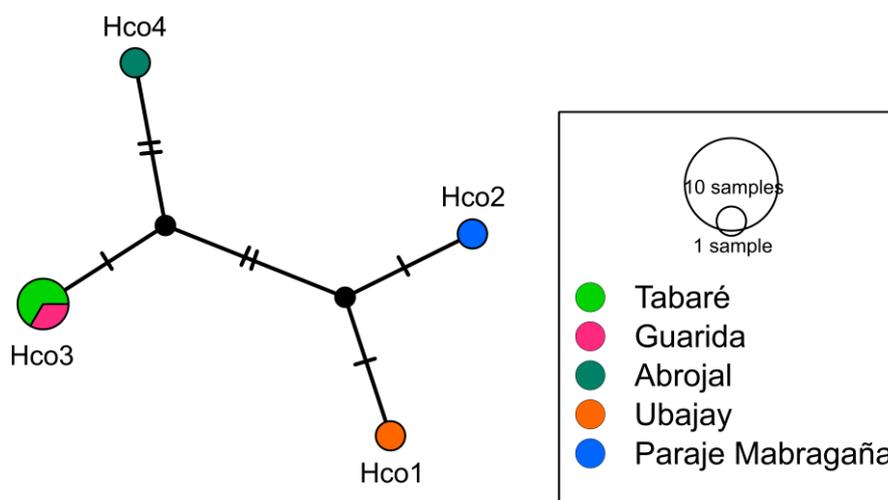


Figura 5.5. Red haplotípica obtenida a partir de 720pb del marcador mitocondrial COI para las poblaciones uruguayas y argentinas de *C. rionegrensis*. El haplotipo Hco1 pertenece a Ubajay, el haplotipo Hco2 a Paraje Mabragaña (Argentina); el Hco3 a Tabaré y Guarida, y el Hco4 a Abrojal (Uruguay).

En conjunto con los haplotipos de Cit-b disponibles en Genbank para la especie (n=21), se analizaron un total de 23 haplotipos (Figura 5.6).

De los haplotipos de Entre Ríos, los de PNPD se diferencian en al menos 7 sustituciones del resto, mientras que el haplotipo de Paraje Mabragaña presenta 9 sustituciones de diferencia. Los de Ubajay y Paraná son aún más divergentes, con 10 sustituciones. Y por último, el de Ibicuy es el más

divergente, teniendo 11 sustituciones. Esto evidencia una variación genética mayor en los haplotipos argentinos en comparación con los uruguayos. Incluso se observan algunos haplotipos estimados (aún no encontrados en la muestra), que conectarían los haplotipos argentinos con los uruguayos. Los 15 haplotipos de Uruguay están más estrechamente relacionados entre ellos, presentando entre 1 y 4 cambios a nivel de nucleótidos, que con los de Entre Ríos, con los que tiene más de 7 sustituciones. Todos son haplotipos exclusivos, salvo uno de ellos que es compartido por tres localidades uruguayas: Mafalda, Guarida y Nuevo Berlín. En la red se incluyó un haplotipo representante de una de las especies más cercanamente relacionadas (*C. famosus*) (Sánchez *et al.* 2019) y presenta 19 sustituciones que lo diferencian de *C. rionegrensis*.

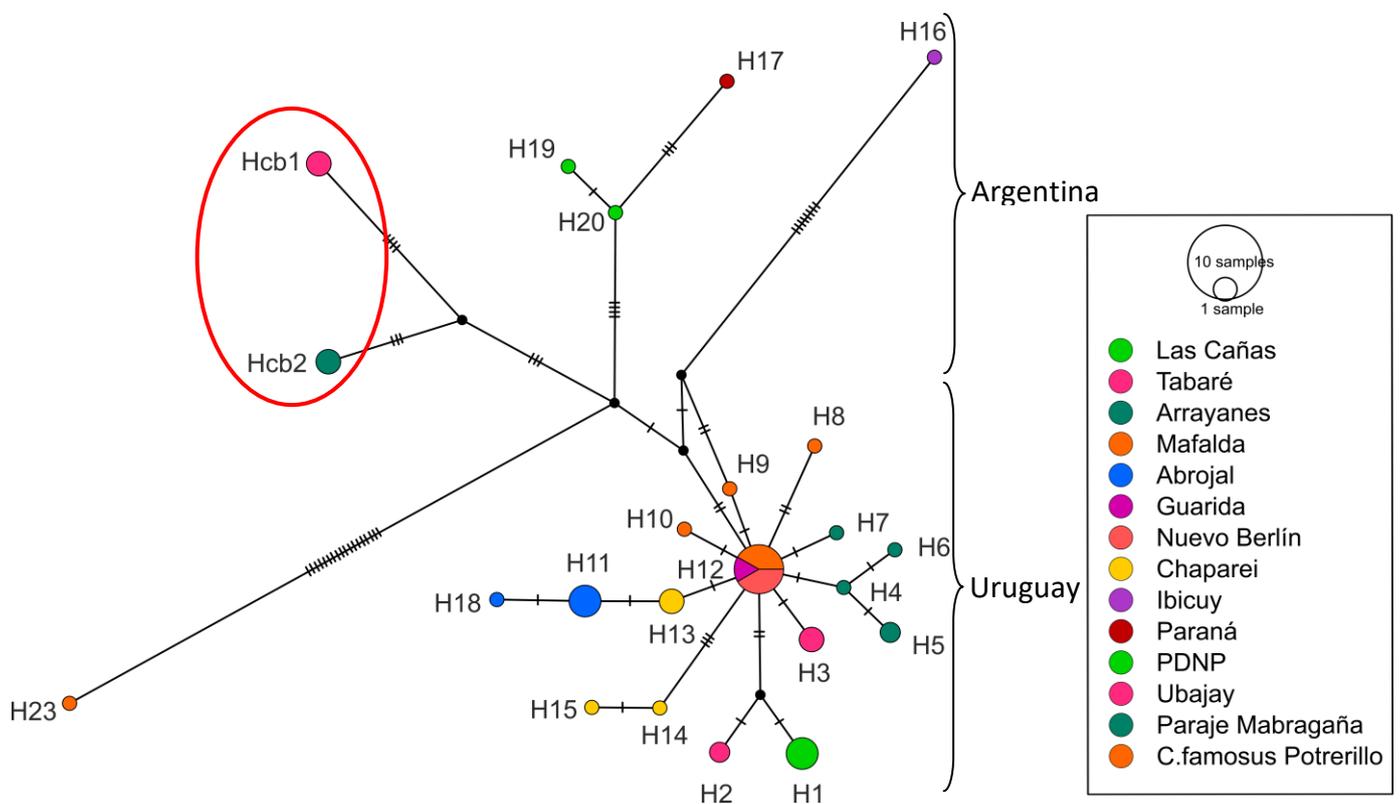


Figura 5.6. Red haplotípica obtenida a partir de 1.071pb de Cit-b mitocondrial para las poblaciones uruguayas y argentinas de *C. rionegrensis*. Los primeros 15 (H1-H15) haplotipos se nombran tal cual se mencionan en Wlasiuk *et al.*, (2003), utilizando la misma nomenclatura para los haplotipos restantes, a excepción de los haplotipos de éste trabajo. El haplotipo 1 (H1) pertenece a Las Cañas; los haplotipos H2 y H3 a Tabaré; H4, H5, H6 y H7 a Los Arrayanes; H8, H9 y H10a Mafalda; H11 y H18 a El Abrojal; H12 es compartido por tres localidades, Mafalda, Guarida y Nuevo Berlín; H13, H14 y H15 pertenecen a Chapareí; H16 a Ibicuy; H17 a Paraná; H19 y H20 al Parque Nacional Pre Delta (PNPD); Hcb1 a Ubajay; Hcb2 a Paraje Mabragaña; y el H23 se utilizó como grupo externo y corresponde a *C. famosus* de la localidad de Potrerillo (La Rioja, Argentina).

5.4. Análisis poblacional

Este análisis se pudo realizar sólo para el Cit-b, para el cual se contó con 20 secuencias de otras localidades disponibles en Genbank. Un resumen de la cantidad y distribución de haplotipos por población se encuentra en la Tabla 5.2. El número de individuos analizados por localidad varió entre 1 y 6, siendo que el número de haplotipos por localidad estuvo entre 1 y 4. Aproximadamente la mitad de las poblaciones presentaron una sola variante haplotípica, y por lo tanto no se pudieron aplicar las pruebas de neutralidad. En la red haplotípica se observa un único haplotipo compartido, entre las poblaciones uruguayas de Guarida, Nuevo Berlín y Mafalda (Figura 5.6), mientras que el resto son todos exclusivos.

Entre las poblaciones polimórficas, si bien se obtuvieron valores negativos para el D de Tajima en las poblaciones uruguayas de Arrayanes, Mafalda y Abrojal, estos no fueron significativos, como tampoco lo fue la prueba de Fu (Tabla 5.2).

La distribución y la cantidad de haplotipos también se evaluaron por grupos (Tabla 5.2), en donde los haplotipos uruguayos conforman el grupo 1, y los entrerrianos el grupo 2. En el grupo 1 se encontraron 16 haplotipos, mientras que en el grupo 2 se encontraron 6. El grupo 1 también tuvo un valor negativo del estadístico D de Tajima, pero al igual que en el análisis por población, el valor no fue significativo. Para el estadístico F de Fu también se obtuvo un valor negativo, pero en este caso, su valor si fue significativo ($p < 0,05$), al igual que fue previamente reportado por Wlasiuk *et al*, (2003).

Tabla 5.2. Resumen de distribución de los haplotipos y prueba de neutralidad por localidad y por grupo. El número de individuos (N); el número de haplotipos encontrados (NH) número de sitios segregantes (S); Diversidad nucleotídica (π); valores del estadístico D de Tajima (D) y su valor de probabilidad; estadístico F de Fu (F) y su valor de probabilidad.

Población	N	NH	S	π	D	p	F	p
Las Cañas	5	1	0	0	0	1	-	-
Tabaré	5	2	5	3	1,69	0,98	3,53	0,93
Arrayanes	5	4	5	2,1	-0,84	0,26	-0,92	0,12
Mafalda	5	4	4	1,6	-1,09	1,08	1,41	0,06
Abrojal	6	2	1	0,3	-0,93	0,27	0,003	0,27
Guarida	5	1	0	0	0	1	-	-

Nuevo Berlín	5	1	0	0	0	1	-	-
Chapareí	5	3	5	2,8	1,12	0,82	1,22	0,70
Ibicuy	1	1	0	0	0	1	-	-
Paraná	1	1	0	0	0	1	-	-
PNPD	2	2	2	1	0	1	0	0,25
Ubajay	3	1	0	0	0	1	-	-
Paraje Mabragaña	3	1	0	0	0	1	-	-
GRUPO 1	41	16	23	3,11	-1,41	0,06	-5,81	0,01
GRUPO 2	10	6	26	8,6	0,31	0,42	1,73	0,79

La prueba de diferenciación genética entre pares de poblaciones, medida como F_{st} (Tabla 5.3), dio significativo en muchos casos, que se describen a continuación. Las Cañas, se diferencia significativamente de todas las poblaciones, a excepción de Paraná e Ibicuy. Tabaré se diferencia de la mayoría de las poblaciones menos de Ibicuy, Paraná y PNPD. Arrayanes sólo se diferencia significativamente de Abrojal, Guarida y Nuevo Berlín. Mafalda y Abrojal también se diferencian entre sí. Abrojal, a su vez se diferencia de Guarida, Paraná, PNPD, Ubajay y Paraje Mabragaña. Guarida y Nuevo Berlín se diferencian de Chapareí, PNPD, Ubajay y Paraje Mabragaña. Y por último, Chapareí de Ubajay y Paraje Mabragaña.

Tabla 5.3. Distancias genéticas medidas como F_{st} entre pares de poblaciones. Las Cañas (LC), Tabaré (T), Arrayanes (Ar), Mafalda (M), Abrojal (Ab), Guarida (G), Nuevo Berlín (NB), Chapareí (CH), Ibicuí (I), Paraná (P), PNPD, Ubajay (U), Paraje Mabragaña (PM). Los asteriscos denotan aquellos pares donde la diferenciación genética fue significativa.

	LC	T	Ar	M	Ab	G	NB	CH	I	P	PNPD	U	PM
LC	0,00 *												
T	0,61 *	0,00 *											
Ar	0,81 *	0,35 *	0,00										
M	0,83 *	0,23 *	0,29	0,00									
Ab	0,97 *	0,64 *	0,71 *	0,69 *	0,00								
G	1,00 *	0,32 *	0,42 *	-0,00	0,92 *	0,00							
NB	1,00 *	0,32 *	0,42 *	-0,00	0,92	0,00	0,00						
CH	0,77 *	0,31 *	0,36	0,21	0,51	0,30 *	0,30 *	0,00					
I	1,00	0,78	0,85	0,88	0,98	1,00	1,00	0,81	0,00				
P	1,00	0,78	0,84	0,88	0,98 *	1,00	1,00	0,80	1,00	0,00			
PNPD	0,98 *	0,77	0,83	0,86	0,96 *	0,98 *	0,98 *	0,79	0,93	0,71	0,00		
U	1,00 *	0,81 *	0,87	0,89	0,98 *	1,00 *	1,00*	0,83 *	1,00	1,00	0,96	0,00	
PM	1,00 *	0,84 *	0,89	0,91	0,98 *	1,00 *	1,00 *	0,86 *	1,00	1,00	0,97	1,00	0,00

El AMOVA (Tabla 5.4), considerando dos grupos separados por el río Uruguay, uno formado por las poblaciones uruguayas y otro formado por las argentinas, muestra que sólo el 10,70% de la varianza es explicada por la variación dentro de las poblaciones, algo más del 30% (32,64%) es explicado por las diferencias que hay entre las poblaciones dentro de un mismo grupo, y el 56,66% de la varianza se explica por las diferencias entre grupos.

Tabla 5.4. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	d.f.	Suma de los cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación
Entre grupos	1	50.881	2.83297 Va	56.66
Entre poblaciones dentro del grupo	11	76.806	1.63208 Vb	32.64
Dentro de las poblaciones	38	20.333	0.53509 Vc	10.70

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Las dos poblaciones evaluadas en la provincia de Entre Ríos, ubicadas en las localidades de Ubajay y Paraje Mabragaña, pertenecen a la especie *C. rionegrensis*. Los análisis moleculares nos han permitido no sólo confirmar la presencia de dicha especie en la región, sino también comenzar a conocer su dinámica evolutiva.

Ambos marcadores moleculares utilizados (COI y Cit-b), muestran que las secuencias de las poblaciones estudiadas se encuentran incluidas dentro del rango de variación genética de *C. rionegrensis*, formando un clado monofilético con otras secuencias previamente reportadas para dicha especie (Figuras 5.1, 5.2 y 5.3).

En la descripción original de la especie, se sugiere su presencia en la provincia de Entre Ríos, en las localidades de Concordia, Paranacito y Colonia Yerúa (Figura 5.4). Luego D'Elía y colaboradores (1999) corroboraron su presencia, que inicialmente se reducía a una pequeña región de Uruguay, en las localidades de Paraná e Ibicuy ubicadas en la provincia de Entre Ríos. Años después, Carballo y colaboradores (2020) ampliaron la distribución de esta especie al identificar su presencia en el Parque Nacional Pre-delta (oeste de la provincia de Entre Ríos, Argentina). Si bien se han evaluado diversas regiones en Uruguay (Tomasco com. pers.), no se encontró evidencia de que existan poblaciones de la especie en otras zonas del país. Por el contrario, en otras regiones de Uruguay habitan poblaciones de *C. torquatus* y *C. pearsoni* (Boullosa, 2019), las cuales se distribuyen en suelos diferentes (Tomasco com. pers.).

Este estudio reporta nuevas poblaciones y sugiere una distribución menos disyunta, que se extiende hacia el centro-Este de la provincia, en las proximidades del Parque Nacional El Palmar (PNEP) (Figura 5.4). Para un análisis más completo, es necesario contar con el muestreo de una mayor cantidad de poblaciones, que debido a la emergencia sanitaria por Sars-Cov2 ocurrida durante el transcurso de esta tesis, no se pudo realizar.

Los resultados de este trabajo indican que los linajes más antiguos de *C. rionegrensis* se encontrarían del lado argentino, expandiendo luego su territorio hacia el Uruguay. Esto es sugerido por la filogenia molecular, y también se refleja en la red de haplotipos obtenida a partir del Cit-b, en la cual se observa que los haplotipos argentinos de *C. rionegrensis* ocupan una posición basal con respecto a los uruguayos (Figura 5.3). Además de ello, los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica tomando en cuenta el grupo 2 (haplotipos argentinos) son mayores a los del grupo 1 (haplotipos uruguayos), sugiriendo una historia evolutiva más antigua para esta especie en el margen Este del Río Uruguay.

Esto permite hacer una serie de inferencias respecto a los posibles escenarios evolutivos en los cuales esta expansión puede haber sucedido. Una de ellas implica que una parte de los individuos que dieron origen a las poblaciones fundadoras orientales, tienen que haber atravesado el río Uruguay, probablemente en condiciones paleogeográficas diferentes a las observadas en la actualidad (en las que el cauce del río constituye una barrera geográfica efectiva a la dispersión de los individuos).

Esos datos se pueden complementar con las estimaciones de tiempo de divergencia obtenidas en éste trabajo a través del BEAST, que muestran que los linajes actuales de *C. rionegrensis* tienen una antigüedad aproximada de 30.000 años y que la colonización de Uruguay habría ocurrido hace unos 19.000 años atrás. Estos últimos datos coinciden con el registro paleogeográfico del Último Máximo Glacial (UMG) (Iriando y Kröhling, 1995), que tuvo su mayor intensidad entre 22.000 y 18.000 años atrás, durante el Pleistoceno Tardío (EIO2) (González, 1981; Clapperton, 1993). Este período se caracterizó por tener un clima seco y frío en la llanura pampeana, en donde el clima patagónico avanzó aproximadamente 2.000 km al noreste (Iriando y Kröhling, 1995). Sayago (1975) señala que el clima seco no se debía a la gran escasez de precipitaciones, sino al elevado poder de evapotranspiración del ambiente de llanura.

Estos procesos han sido muy bien estudiados y descritos en otras regiones geográficas, particularmente en Córdoba, donde son prácticamente sincrónicos

con el último gran avance glacial en la Cordillera de Los Andes (Iriondo y García, 1993). Los paleolagos de Salinas Grandes, Ambargasta y Mar Chiquita sufrieron una gran disminución en su volumen (Carignano, 1997a, 1999). El registro limnológico de Mar Chiquita indica un largo período de sequía asociado al UMG (Piovano *et al.*, 2002), a través del cual el lago fue reemplazado por pequeñas lagunas dispersas, bordeadas por playas y salinas (Bertoldi de Pomar, 1953).

La evidencia acumulada permite sugerir que, durante ese período, ha habido una disminución considerable del caudal del Río Uruguay durante los eventos climáticos extremos áridos, exponiendo amplias fajas de sus llanuras de inundación (Kröhling com. pers.). De esta manera, la barrera geográfica que actualmente impide la dispersión de individuos entre la provincia de Entre Ríos y Uruguay, habría desaparecido durante el Pleistoceno Tardío, permitiendo la migración de individuos desde las poblaciones de Entre Ríos hacia las de Uruguay.

Señales de este proceso de expansión poblacional también dejaron sus huellas genéticas a nivel global. Los datos de las pruebas de neutralidad muestran valores negativos y significativos del estadístico D de Tajima para toda la especie, lo que puede interpretarse como evidencia de expansión poblacional de todo el rango en los últimos 30.000 años. Asimismo, también se encontraron señales de expansión en las poblaciones a ambos lados del río Uruguay.

En relación a los procesos de diferenciación genética, las pruebas de AMOVA permiten identificar diferencias entre los grupos a ambos lados del río Uruguay. Una gran proporción de la variación se explica a través de la diferenciación entre haplotipos argentinos y uruguayos, indicando al Río Uruguay como una barrera importante al flujo génico histórico. Esto, relacionado con lo anterior, sugiere que una vez que la especie invadió el territorio actualmente ocupado en Uruguay, 19.000 años atrás, el río aumentó su caudal durante una corta fase subhúmeda intercalada en el Período Seco del Pleistoceno Superior (EIO 2) ocurrida aproximadamente 16.500–15.000 años atrás (Iriondo y Kröhling, 1995), y estas volvieron a quedar aisladas. Esto implica que probablemente las poblaciones uruguayas y las argentinas hayan evolucionado de manera

independiente, a partir del establecimiento del Río Uruguay como barrera geográfica importante como lo conocemos actualmente.

Esto se condice con los resultados obtenidos en la red haplotípica, donde se puede observar que los haplotipos argentinos son más divergentes entre sí que los uruguayos, los cuales se diferencian a través de muy pocos cambios y que presentan la forma característica de filogenia estrella (Figura 5.6). Además, en los haplotipos uruguayos, también se evidencia una expansión poblacional reciente, a través de la prueba de Neutralidad, utilizando como parámetros el F de Fu y el D de Tajima aunque este último no dio significativo, sino marginal. Dicho patrón demográfico ya había sido reportado por Wlasiuk *et al.* (2003), quienes afirman que para los marcadores neutrales, y asumiendo una tasa de mutación constante, los valores D o F significativamente negativos son una fuerte evidencia de una expansión poblacional, indicando un exceso de variantes de baja frecuencia. En el caso de los haplotipos uruguayos, y tal como lo proponen dichos autores, el haplotipo más frecuente y compartido por las poblaciones de Nuevo Berlín, Mafalda y Guarida correspondería al haplotipo ancestral, del cual derivarían el resto de los haplotipos de ese país.

Por su parte los haplotipos argentinos muestran valores de D negativos, pero no significativos. Esta débil señal de expansión podría deberse al bajo número de muestras evaluadas, por lo que un mayor muestreo en la región nos permitirá confirmar (o no) si las poblaciones argentinas también se encuentran en expansión. La mayor diversidad haplotípica de las muestras entrerrianas podría ser reflejo de una historia más profunda, de más tiempo y/o tamaños poblacionales actuales y/o pasados mayores a los uruguayos. Al ser poblaciones ancestrales, además de presentar una mayor variación, se esperaría que su distribución también fuera mayor en comparación con las uruguayas. Teniendo en cuenta que pudieron migrar hacia Uruguay a pesar de la barrera geográfica que separa ambos países, es de esperarse que al haber habitado en la región de Entre Ríos por más tiempo, las poblaciones hayan podido migrar a otras zonas.

Los resultados confirman la extensión del rango de distribución de la especie en la provincia de Entre Ríos y podría tener importantes consecuencias para su

estado de conservación, ya que el desconocimiento de las entidades taxonómicas a las que pertenecen los organismos, o su incorrecta asignación, dificulta el diseño y gestión de los planes de conservación de la biodiversidad para diferentes grupos biológicos (García *et al.*, 1997). En el caso particular de *C. rionegrensis*, tanto la IUCN, como la Lista Roja de los Mamíferos de Argentina (Tomasco y Caraballo, 2019), la consideran una especie “En Peligro” (EN) por ser endémica y de distribución muy reducida. Esto se debe a que la especie presenta un área de ocupación muy reducida, de aproximadamente 500 km², sumado a que está naturalmente fragmentada debido a que utiliza hábitats restringidos. Además, el avance de las plantaciones forestales y la agricultura conduce a una disminución continua en la calidad del hábitat, incrementando los riesgos para la especie. Asimismo, un riesgo potencial aún no evaluado, es la depredación por gatos y perros domésticos, cuya liberación en áreas naturales no está siendo controlada (Tomasco obs. pers). Otro riesgo potencial podrían ser las inundaciones extraordinarias, que si bien no existen estudios al respecto, también pueden producir fluctuaciones poblacionales (Tomasco y Caraballo, 2019).

Este resultado en sí mismo es interesante, y más aún si se tiene en cuenta la proximidad de las localidades estudiadas al Parque Nacional El Palmar. Cabe destacar que en el parque existe una población de tuco-tucos que ha sido sugerida como *C. rionegrensis*, pero también como *C. pearsoni*, por lo que se necesitan mayores estudios para una correcta determinación de la misma. Sería importante entonces evaluar las poblaciones del parque, para confirmar la presencia de la especie, por su importancia para conservarla. Sin embargo, para proponer políticas de conservación es necesario evaluar una mayor cantidad de poblaciones argentinas, como podrían ser las localidades entrerrianas de Concordia, Colonia Yerua, Paranacito y Victoria, en las cuales ya había sido mencionada presencia de *C. rionegrensis* (Bidau, 2018). Debido a la falta de evidencia cariotípica, morfológica o molecular que la sustente, dichas localidades fueron excluidas en la última evaluación de la especie (Tomasco y Caraballo, 2019), así como en el presente estudio.

Estos análisis ayudarían a conocer si las poblaciones realmente son menos disyuntas, como se ha sugerido anteriormente, así como evaluar si existe

conectividad entre las mismas. Si bien el ADNmt nos da una idea de la conexión histórica entre las poblaciones, para evaluar el flujo génico actual entre las mismas, se podrían utilizar marcadores variables como los microsatélites. De haber conectividad entre las poblaciones, podríamos asumir que el flujo génico contribuiría a prevenir la estructuración, la fragmentación y la pérdida de la variabilidad causada por la deriva genética principalmente en poblaciones pequeñas. Este conocimiento es fundamental para la toma de decisiones en conservación, así como para el diseño de estrategias de conservación y manejo de la especie.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

A partir de la información genética obtenida para los marcadores mitocondriales analizados (COI y Cit-b) podemos confirmar la presencia de poblaciones de *C. rionegrensis* en las localidades de Ubajay y Paraje Mabragaña, ubicadas en la provincia de Entre Ríos.

Para que los resultados sean aún más completos sería importante estudiar las poblaciones a nivel morfológico y realizar comparaciones con las poblaciones uruguayas para poder conocer la variabilidad completa de la especie.

A partir de las estimaciones de tiempo de divergencia podemos inferir que inicialmente *C. rionegrensis* habitaba en la provincia de Entre Ríos y luego, debido a cambios producidos por fenómenos climáticos, pudo migrar y expandir su distribución hacia Uruguay.

Es posible que, al igual que las poblaciones de Uruguay, las de Entre Ríos también se encuentren en expansión. En el futuro, con la obtención de un mayor número de individuos y poblaciones, se podrían realizar inferencias más robustas.

Para conocer los patrones de dispersión y colonización territorial, es necesario realizar un enfoque multidisciplinario, que permita integrar dimensiones espaciales, temporales, filogenéticas y paleoclimatológicas para realizar inferencias sobre los procesos evolutivos subyacentes.

Dado que *C. rionegrensis* es una especie citada como En Peligro, conocer su distribución y sus características genéticas, es de vital importancia para el diseño de estrategias de conservación y manejo eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abrámoff, M. D., Magalhães, P. J. y Ram, S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11: 36-42.
- Agapow, P. M. y Purvis, A. 2002. Power of eight tree shape statistics to detect non-random diversification: A comparison by simulation of two models of cladogenesis. *Systematic Biology* 51: 866–872.
- Altuna, C. A., Novello, A. F. y Lessa E. P. 1986. Notas sobre la morfología espermática de *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia, Octodontidae) del Uruguay. *Brenesia*, 24: 397–401.
- Altuna, C. A. 1991. Microclima de cuevas y comportamiento de homeostasis en *Ctenomys pearsoni* del Uruguay (Rodentia, Octonidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 6: 35-46
- Altuna, C. A., Francescoli, G., Izquierdo, G. y Tassino, B. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida: el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología* 7: 47-54.
- Amaya, J., Areta, J., Valentinuzzi, V. y Zufiaurre, E. 2016. Form and function of long-range vocalizations in a Neotropical fossorial rodent: The Anillaco Tuco-Tuco (*Ctenomys* sp.). *PeerJ*. 4. 10.7717/peerj.2559.
- Apfelbaum L. I., Massarini A. I., Daleffe L. E. y Reig O. A. 1991. Genetic variability in the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 19: 467-476.
- Argüelles, C. F., Suárez, P. y Giménez M. D., Bidau C. J. 2001. Intraspecific chromosome variation between different populations of *Ctenomys dorbignyi* (Rodentia, Ctenomyidae) from Argentina. *Acta Theriologica* 46: 363–373.

- Avise, J. C. y Walker, D. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 992-995.
- Bandelt, H. J., Foster, P. y Rohl, A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 3-48.
- Bertoldi de Pomar, H. 1953. Contribución al Conocimiento del Origen de la Laguna Mar Chiquita de la Provincia de Córdoba. Tesis Doctoral (inérita), Universidad Nacional de Córdoba (inérita), 149 p. Córdoba.
- Bidau, C. J., Gimenez, M. D. y Contreras J. R. 1996. Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). *Mendeliana*, 12: 25-37.
- Bidau, C. J. 2006. Familia Ctenomyidae. En *Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución*, eds. Barquez, R. M., Díaz, M. M. and Ojeda, R. A. 212– 31. Tucumán: Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, 359 pp.
- Bidau, C. J. 2015. Familia Ctenomyidae Lesson. En *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*, eds. Patton, J. L., Pardiñas, U. F., D'Elía, G. University of Chicago Press, Chicago, pp. 818–877.
- Bidau, C. J. 2018. *Ctenomys rionegrensis*. The IUCN red list of threatened species 2018: e.T136635A22193418. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-.RLTS.T136635A22193418.en>.
- Bouckaert, R. R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M. y Gavryushkina, A. 2019. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*.15 (4): e1006650.

- Boullosa, N. 2019. Avances en el estudio de los tucu-tucos (*Ctenomys* – *Ctenomyidae*) en Uruguay: filogeografía y transcriptómica. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Busch, C., Malizia, A. I., Scaglia, O. A. y Reig, O. A. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 70: 204-208.
- Busch, C., Antinuchi, C. D., del Valle, J. C., Kittlein, M. J., Malizia, A. I., Vassallo, A. I. y Zenuto, R. R. 2000. Population Ecology of Subterranean Rodents. En: *Life Underground - The Biology of Subterranean Rodents*, eds. Lacey E. A., Patton J. L., Cameron G. N. The University of Chicago Press, pp. 183-226.
- Brown, W. M., George, M. J. R. y Wilson, A. C. 1979. Rapid Evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 1967-1971.
- Burgin, J. C., Colella, J. P., Kahn, P. L. y Upham, N. S. 2018. How many species of mammals are there?. *Journal of Mammalogy*, 99: 1-14
- Cabrera, A., Yepes, J. 1960. Los ocultos o tucu-tucos (Familia *Ctenomyidae*) En *Mamíferos Sud Americanos*, pp. 38-43.
- Caraballo, D. A., Abruzzese, G. A. y Rossi, M. S. 2012. Diversity of tucu-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) in the Northeastern wetlands from Argentina: Mitochondrial phylogeny and chromosomal evolution. *Genética*, 140:125-136.
- Caraballo, D. A. 2013. Evolución de un complejo de especies de *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino: filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN satélite. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

- Caraballo, D. A., Tomasco, I. H., Campo, D. H. y Rossi, M. S. 2016. Phylogenetic relationships between tuco-tucos (*Ctenomys*, Rodentia) of the corrientes group and the *C. pearsoni* complex. *Mastozoologia Neotropical*, 23: 39-49.
- Caraballo, D. A. y Rossi, M. S. 2018. Spatial and temporal divergence of the torquatus species group of the subterranean rodent *Ctenomys*. *Contributions to Zoology*, 87(1):11-24.
- Caraballo, D. A., López, S. L., Carmarán, A. A y Rossi, M. S. 2020. Conservation status, protected area coverage of *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae) species and molecular identification of a population in a national park. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde*, 100: 33 - 47
- Carignano, C. 1997a. Caracterización y Evolución, durante el Cuaternario Superior, de los ambientes geomorfológicos extra serranos en el Noroeste de la Provincia de Córdoba. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba (inédita), 207 p. Córdoba.
- Carignano, C. 1999. Late Pleistocene to recent climate change in Córdoba Province, Argentina: geomorphological evidence. *Quaternary International*, 57/58: 117–134.
- Carnovale, C.S. 2020. Ctenómidos de la Región Pampeana: análisis filogenético y filogeografía de la especie *Ctenomys talarum*. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.
- Castillo, A. H., Cortinas, M. N. y Lessa, E. P. 2005. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy*, 86: 170–179.

- Chan, K. M., y Moore, B. R. 2002. Whole-tree methods for detecting differential diversification rates. *Systematic Biology*, 51: 855–865.

- Clapperton, C. 1993. Quaternary Geology and Geomorphology of South America. *El sevier*, Amsterdam, 534 pp.

- Clary, D. O. y Wolstenholme, D. R. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 252-271.

- Contreras, J. R., y Ch. de Contreras, A. N. 1984. Diagnósis preliminar de una nueva especie de “Anguyá - tutú” (género *Ctenomys*) para la provincia de Corrientes, Argentina (Mammalia, Rodentia). *Historia Natural*, 4:131– 32.

- Contreras, J. R. y Scolaro, J. A. 1986. Distribución y relaciones taxonómicas entre los cuatro núcleos geográficos disyuntos de *Ctenomys dorbignyi* en la Provincia de Corrientes, Argentina (Rodentia, Ctenomyidae). *Historia Natural*, 6: 21– 30.

- Cutrera, A. P., Lacey, E. A. y Busch, C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology*, 14: 2511-2523.

- D’Elía, G., Lessa, E. P. y Cook, J. A. 1998. Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 63: 285– 96.

- D’Elia, G., Lessa, E. P. y Cook, J. A. 1999. Molecular Phylogeny of Tucos-Tucos Genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) Evaluation of the mendocinus Species Group and the Evolution of Assymmetric Sperm. *Journal of Mammalian Evolution*, 6: 19-38

- D'Elía, G., Teta, P. y Lessa, E. P. 2021. A short overview of the systematics of *Ctenomys*: Species limits and phylogenetic relationships. En *Tuco-Tucos, An Evolutionary Approach to the Diversity of a Neotropical Subterranean Rodent*, pp.17-41

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

- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

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

- Ellerman, J. R. 1956. The subterranean animals of the world. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 35: 11-20.

- Esposti, M. D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. y Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143: 243-271.

- Excoffier, L., Smouse, P. E., y Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.

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

- Fernandes, F. A., Fernández- Stolz, G. P. Lopes, C. M. y T. R. O. de Freitas. 2007. The conservation status of the tuco - tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4):839–47.

- Fernandes, F. A., Gonçalves, G. L. Ximenes, S. S. F. y T. R. O. de Freitas. 2009. Karyotypic and molecular polymorphisms in *Ctenomys torquatus* (Rodentia: Ctenomyidae): taxonomic considerations. *Genética* 136: 449–59.

- Filatov, D. A. 2002. Proseq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2: 624-624

- Fisher, R. A. 1934. Statistical methods for research workers, 5th edn. Oliver & Boyd, Edinburgh

- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-29

- Freitas, T. R. O y Lessa, E. P. 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. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 67: 193-198.

- Freitas, T. R. O. 1995 b. Geographic distribution and conservation of four species of the genus *Ctenomys* in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 30: 53-59.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetica*, 147: 915-925.
- Gallardo, M. 1991. Karyotypic evolution in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 72(1):11-21.
- Gallardo, M. H. y Anrique, J. A. 1991. Populational parameters and burrow systems in *Ctenomys maulinus* brunneus. *Medio Ambiente*, 11: 48-53.
- García, L., Ponsà, M., Egozcue, J., y García, M. 2000. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69: 103-120.
- García, J. J., Ojeda, R., Fraga, R., Diaz, G., Baigun, R. 1997. Libro rojo. Mamíferos y aves amenazados de la Argentina - SAREM. Asociación Ornitológica del Plata. Parques Nacionales.
- Gardner, S. L., Salazar-Bravo, J. y Cook, J. A. 2014. New Species of *Ctenomys* Blainville 1826 (Rodentia: Ctenomyidae) from the Lowlands and Central Valleys of Bolivia. Faculty Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology, pp. 722.
- Gennis, R.B. 1992. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* a brief review of progress to date. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101: 184-187.
- Gómez Fernández, M. J., Gaggiotti, O. E. y Mirol, P. M. 2012. The evolution of a highly speciose group in a changing environment: Are we

- witnessing speciation in the Iberá wetlands?. *Molecular Ecology*, 21: 3266-3282
- González, M., 1981. Evidencias paleoclimaticas en la Salina del Bebedero, San Luis. VIII Congreso Geológico Argentino, Actas 3: 411-438, San Luis.
 - González, E. M. 2001. *Guía de campo de los mamíferos de Uruguay. Vida silvestre*. Montevideo: Sociedad Uruguaya para la Conservación de la Naturaleza, 339 pp.
 - Hall, T. 2004. BioEdit 6.0.7. Department of Microbiology, North Carolina State University. From <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
 - Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1-9.
 - Hatefi, Y. 1985. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorilation System. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 1015-69.
 - Heard, S. B. y Mooers, A. O. 2002. Signatures of random and selective mass extinctions in phylogenetic tree balance. *Systematic Biology*, 51: 889-897.
 - Hebert, P. D. N., Cywinska, A. y Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512): 313-321.
 - Hernández-Baños, Escandón, B. E., Cortés-Rodríguez, M. G., García, M. N. y Deras, G. 2007. En Filogeografía de Aves Mexicanas, eds. 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.

- Hildebrand, M. 1985. Digging in Quadrupeds. En *Functional Vertebrate Morphology*, eds. Hildebrand, M., Bramble, D., Liem, K., Wake, D. Harvard University Press, Cambridge and London, pp. 83-109.
- Hill, J. E. 1935. The cranial foramina in rodents. *Journal of Mammalogy*, 18:121-29.
- Iriondo, M. y García, N. 1993. Climatic variations in the Argentine plains during the last 18.000 years. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101: 209-220.
- Iriondo, M.H. y Kröhling, D. 1995. El Sistema Eólico Pampeano. Comunicaciones. Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino". Santa Fe. (Nueva Serie), 5(1):1-68.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. y Wilson, A. C. 1991. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Justo, E., De Santis, L. y Kin, M. 2003. *Ctenomys talarum*. *Mammalian Species*, 730: 1-5.
- Kerley, G. I. H., Whitford, W. G. y Kay, F. R., 2004. Effects of pocket gophers on desert soils and vegetation. *Journal of Arid Environment*, 58: 155-66.
- Kiblicky, P., Brum- Zorrilla, N. Pérez, G. y Sáez, F. A. 1977. Variabilidad cromosómica entre diversas poblaciones uruguayas del roedor cavador del género *Ctenomys* (Rodentia- Octodontidae). *Mendeliana*, 2: 85-93.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549
- Lacey, E. A., Maldonado, J. E., Clabaugh, J. P. y Matocq, M. D. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco - tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology*, 8:1754-1756.
- Lacey, E. A., Braude, S. H. y Wieczorek, J. R. 1997. Burrow sharing by colonial tuco - tucos (*Ctenomys sociabilis*). *Journal of Mammalogy*, 78:556-62.
- Lacey, E. A., Patton, J. L. y Cameron, G. N. 2000. Life undergrounds: the biology of subterranean rodents, University of Chicago Press. Chicago USA 440 pp.
- Lacey, E. A. y Wieczorek, J. R., 2003. The ecology of sociality in rodents: a *Ctenomys* perspective. *Journal of Mammalogy*, 84:1198-1211.
- Lande, R. 1995. Breeding plans for small populations based on the dynamics of quantitative genetic variance. En Population Management for Survival and Recovery, eds. Ballou, J. D., Gilpin, M., Foose, T. J. Columbia University Press, pp. 318-340.
- Langguth, A. y Abella, A. 1970. Las especies uruguayas del género *Ctenomys*. *Comunicaciones Zoológicas del Museo Historia Natural de Montevideo*, 10: 1-27.
- Lara, N., Sassi, P. y Borghi, C. E., 2007. Effect of herbivory and disturbances by tuco tucos (*Ctenomys mendocinus*) on a plant community in the southern Puna Desert. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, 39: 110-116.
- Larmuseau, M. H. D, Raeymaekers, J.A.M, y Hellemans, B. 2010. Mitochondrial discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. *Heredity*, 105: 532-542

- Leigh, J. W. y Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110-1116.
- Leipnitz, L., Fornel, R., Ribas, L., Kubiak, B., Galiano, D. y Freitas, T. 2020. Lineages of Tuco-Tucos (Ctenomyidae: Rodentia) from Midwest and Northern Brazil: Late Irradiations of Subterranean Rodents Towards the Amazon Forest. *Journal of Mammalian Evolution*, 27: 161-176.
- Lessa, E. P., y Langguth, A. 1983. *Ctenomys pearsoni*, n. sp. (Rodentia, Octodontidae), del Uruguay. *Resúmenes y Comunicaciones de las Jornadas de Ciencias Naturales del Uruguay*. (Montevideo) 3: 86-88
- Lessa, E. P. y Cook, J. A. 1998. The molecular phylogenetics of tuco - tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 88-99.
- Lessa, E. P., Wlasiuk, G. y Garza, J. C. 2005. Dynamics of genetic differentiation in the Rio Negro Tuco - tuco (*Ctenomys rionegrensis*) at the local and geographical scales. En *Mammalian diversification: from chromosomes to phylogeography*, ed. E. A. Lacey, P. Myers. *Universidad de California Scholarship Online* pp. 153-73.
- Lessa, E. P., Vassallo, A. I, Verzi, D.H. y Mora, M.S. 2008. Evolution of morphological adaptations for digging in living and extinct ctenomyid and octodontid rodents. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95: 267-283
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Lopes C. M., De Barba, M., Boyer, F., Mercier, C., Galiano, D., Busnello Kubiak, B., Maestri, R., Silva da Silva Filho, P. J., Gielly, L., Coissac, E., Freitas, T. R. O. y Taberlet, P. 2020. Ecological specialization and niche

- overlap of subterranean rodents inferred from DNA metabarcoding diet analysis. *Molecular Ecology*.
- Luna, F. y Antinuchi, C. D. 2007. Energy and distribution in subterranean rodents: sympatry between two species of genus *Ctenomys*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147: 948-954.
 - Lunt, D. H., Zhang, D. X., Szymura, J. M. y Hewlitt, O. M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3): 153-165.
 - Malizia A. I, Vassallo A. I. y Busch C. 1991 Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriologica*, 36: 87-94.
 - Mapelli, F., Mora, M., Lancia, J., Gomez Fernandez, M., Mirol, P. y Kittlein, M. 2017. Evolution and phylogenetic relationships in subterranean rodents of *Ctenomys mendocinus* species complex: effects of Late Quaternary landscape changes of Central Argentina. *Mammalian Biology*, 87: 130-142
 - Mascheretti, S., Mirol, P. M., Giménez, M. D., Bidau, C. J., Contreras, J. R., y Searle, J. B. 2000. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (Ctenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 70: 361-376.
 - Massarini, A. I., Barros, M. A., Ortells, M. O. y Reig, O. A. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia, Octodontidae). *Genética*, 83: 131-144.
 - Massarini, A. I. 1996. Análisis cromosómico de *Ctenomys rionegrensis* de Ibicuy (Pcia. de Entre Ríos). En Actas de las XI Jornadas Argentinas de Mastozoología, p. 59, San Luis.

- Massarini, A., Mizrahi, D., Tiranti, S., Toloza, A., Luna, F., y 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
- McNab, B.K. 1979. The influence of body size on the energetic and distribution of fossorial mammals. *Ecology*, 60: 1010-1021.
- Mirol, P. M., Mascheretti, S. y Searle, J. B. 2000. Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence. *Heredity*, 84(5): 538-547
- Mora, M. S., Lessa, E. P., Cutrera, A. P., Kittlein, M. J. y 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. 2009. Biología metapoblacional del tuco-tuco de las dunas (*Ctenomys australis*): efectos de la estructura espacial del hábitat sobre la ecología y genética poblacional. *Mastozoología Neotropical*, 16(2): 512-513
- Mora, M. S., Cutrera, A. P., Lessa, E. P., Vassallo, A. I., D'Anatro, A. y 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.
- Morgan, C. C. y Álvarez, A. 2013. The humerus of South American caviomorph rodents: Shape, function and size in a phylogenetic context. *Journal of Zoology*, 290: 107-116.
- Müller, L., Gonçalves, G., Cordeiro-Estela, P., Marinho, J. R. y Althoff, S. 2013. Código de barras de ADN de roedores de Sigmodontinae:

- identificación de reservorios de fauna de zoonosis. PLoS ONE 8, e80282.
- Muzzachiodi, N. 2007. Lista comentada de las especies de mamíferos de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Fundación de Historia Natural Félix de Azara y Universidad Maimónides, Buenos Aires.
 - Nevo, E., 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10: 269-308.
 - Novello, A. F., y Lessa, E. P. 1986. G-band homology in two karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 55: 43-48.
 - Novello, A., y Altuna, C. 2002. Cytogenetics and distribution of two new karyomorphs of the *Ctenomys pearsoni* complex (Rodentia, Octodontidae) from southern Uruguay. *Mammalian Biology*, 67: 188-92.
 - Nowak, R. M. 1999. Walker's mammals of the world. The Johns Hopkins University Press 2715.
 - O'Brien, S., Tammone, M., Cuello, P. y Lacey, E. 2020. Facultative sociality in a subterranean rodent, the highland tuco-tuco (*Ctenomys opimus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 129: 918-930.
 - Opazo, J. 2006. A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi). *Molecular phylogenetics and evolution*, 37: 932-937.
 - Ortells, M. O., Contreras, J. R. y Reig, O. A. 1990. New *Ctenomys* karyotypes (Rodentia: Octodontidae) from north-eastern Argentina and from Paraguay confirm the extreme chromosomal multiformity of the genus. *Genética*, 82: 189-291.

- Ortells, M. O. y Barrantes, G. E. 1994. A study of genetic distances and variability in several species of the genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) with special references to a probable causal role of chromosomes in speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53:189-208.

- Parada, A., D'Elfa, G., Bidau, C. J. y Lessa, E. P. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 92: 671-682

- Pearson, O. P. 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonian, southern Argentina. *Journal of Zoology*, 202: 225-237.

- Pejo, M., y Tomasco, I. H. 2021. Adaptive evolution of β -globin gene in subterranean in South America octodontid rodents. *Gene*, 772, 145352.

- Piovano, E., Damatto Moreira, S. y Ariztegui, D. 2002. Recent environmental changes in Laguna Mar Chiquita (Central Argentina): A sedimentary model for a highly variable saline lake. *Sedimentology*, 49: 1371-1384.

- Posada, D. 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.

- Quintana, C.A. 1994. Ctenomidos primitivos (Rodentia, Octodontidae) del Mioceno de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, (Sección Geológica)*, 89:19-23

- Rambaut, A. 2018. FigTree. Version 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software-figtree/>.

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. y Suchard, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 675: 901-904.
- Redford, K. y Eisenberg, J. 1992. Mamíferos del Neotrópico, Volumen 2, El Cono Sur: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. Chicago y Londres: La University of Chicago Press.
- Reichman, O. J. y Smith, S. C. 1990. Burrow and burrowing behavior by mammals. En *Current Mammalogy*, eds. Genoways, H.H. Plenum Press, New York and London, pp. 197-244.
- Reichman, O. J. y Seabloom, E. W., 2002. The role of pocket gophers as subterranean ecosystem engineers. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 44-49.
- Reig, O. A., Contreras, J. R. y Piantanida, M. J. 1966. Contribución a la elucidación de la sistemática de las entidades del género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). *Contribuciones Científicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Zoología*, 2(6): 297-352.
- Reig, O. A., y Kiblicky, P. 1969. Chromosome multiformity in the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae), a progress report. *Chromosoma*, 28: 211-244
- Reig, O. A. 1989. Karyotypic repatterning as one triggering factor in cases of explosive speciation. En *Evolutionary biology of transient unstable populations*, eds. Fontdevila A. Springer, Berlin, pp 246-289
- Reig, O. A., Busch, C., Ortells, M. O. y Contreras, J. L. 1990. An overview of evolution systematic population biology and molecular biology in *Ctenomys*. En *Biology of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*, eds. Nevo, E. and Reig, O. A. New York, Allan Liss, pp 422

- Reig, O. A., Massarini, A. I., Ortells, M. O., Barros, M. A., Tiranti, S. I. y Dyzenchauz, F. J. 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 Quintana, C. A. 1992. Fossil ctenomyine rodents of the genus *Eucelophorus* (Caviomorpha: Octodontidae) from the Pliocene and early Pleistocene of Argentina. *Ameghiniana*, 29: 363-380
- Sánchez, T., Tomasco, I. H., Díaz, M. M y Barquez, R. M. 2019. Contribution to the knowledge of the rare “Famatina tuco-tuco”, *Ctenomys famosus* Thomas 1920 (Rodentia: Ctenomyidae). *Mammalia*, 83(1): 11-22.
- Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23: 331-366.
- Sayago, J. M. 1975. Geomorfología aplicada del valle de San Alberto (Provincia de Córdoba). Universidad Nacional de Córdoba. Tesis Doctoral (inérita), 131 p. Córdoba.
- Schleich, C. y Antenucci, D. 2009. Sound transmission and burrow characteristics of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). *Acta Theriologica*, 54: 165-170.
- Schleich, C.E., Vielma, A., Glösmann, M., Palacios, A.G. y Peichl, L. 2010. Retinal photoreceptors of two subterranean tuco-tuco species (Rodentia, Ctenomys): morphology, topography, and spectral sensitivity. *Journal of Comparative Neurology*, 518(19):4001-4015
- Slamovits, C. H., Cook, J. A., Lessa, E. P. y Rossi, M. S. 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 Evolution*, 18: 1708-1719.
- Slamovits, C. H. 2002. Filogenia molecular y dinámica del ADN satélite: su relación con la evolución de los roedores tuco-tucos (*Ctenomys*, Octodontidae). Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
 - Smith, M. F. y Patton, J. L. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: Evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution*, 6: 89-128.
 - Steinberg, E. K. y Patton, J. L. 2000. Genetic structure and the geography of speciation in subterranean rodents: opportunities and constraints for evolutionary diversification. En *Life underground: the biology of subterranean rodents*, eds. E. A. Lacey, G. Cameron, J. L. Patton. University of Chicago Press, Chicago, Illinois pp. 301-331
 - Steuber, S., Abdel-Rady, A. y Clausen, P. H. 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitology Research*, 97: 247-254.
 - Strier, K. B., Lee, P. C. y Ives, A. R. 2014. Behavioral flexibility and the evolution of primate social states. *PlosOne*.DOI: 10.1371/journal.pone.0114099
 - Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
 - Tassino, B. 2006. Estructura poblacional y biología reproductiva del tucutucu de Río Negro (*Ctenomys rionegrensis*): relaciones entre el comportamiento y los procesos evolutivos. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.

- Tassino, B., Garbero, I. E., Altesor, R. P. y Lacey, E. A. 2011. Space use by Río Negro tuco- tucos (*Ctenomys rionegrensis*): excursions and spatial overlap. *Mammalian Biology*, 76: 143-47.

- Teta, P., D'Elía, G. y Opazo, J. 2020. Integrative taxonomy of the southernmost tucu-tucus in the world: differentiation of the nominal forms associated with *Ctenomys magellanicus* Bennett, 1836 (Rodentia, Hystricomorpha, Ctenomyidae). *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Säugetierkunde*.

- Teta, P. y D'Elía, G. 2020. Uncovering the species diversity of subterranean rodents at the end of the World: three new species of Patagonian tuco-tucos (Rodentia, Hystricomorpha, *Ctenomys*). *PeerJ* 8:e9259 <https://doi.org/10.7717/peerj.9259>

- Tobe, S. S., Kitchener, A. C. y Linacre, A. M. T. 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed *comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes*. *PLoS ONE* 5 (11), e14156.

- Tomasco, I. H. y Lessa, E. P. 2007. Phylogeography of the tuco-tuco *Ctenomys pearsoni*: mtDNA variation and its implication for chromosomal differentiation. En *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*, eds. Kelt, D. A., Lessa, E., Salazar-Bravo, J. A., Patton, J. L. University of California Publications in Zoology, pp. 859-882.

- Tomasco, I. y Lessa, E. 2011. The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61: 64-70.

- Tomasco, I. H. y Caraballo, D. A. 2019. *Ctenomys rionegrensis*. En Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción, eds. SAyDS–SAREM. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- Tomasco, I. H., Sánchez, L., Lessa, E. P. y Lacey, E. A. 2019. Genetic analyses suggest burrow sharing by río negro tuco-tucos (*Ctenomys rionegrensis*). *Mastozoología Neotropical*, 26(2): 430-439.
- Travi, V. H. 1983. Etología de *Ctenomys torquatus* Lichtenstein, 1830 (Rodentia- Ctenomyidae) emTaim, Rio Grande do Sul, Brasil. Tesis de maestría. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Upham, N. S., y Patterson, B. D. 2012. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63 (2): 417 – 429.
- Upham, N. y Patterson, B. 2015. Evolution of the caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree of living genera. En *Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution*, pp.63-120.
- Vassallo, A. L. 1993. Habitat shift after experimental removal of the bigger species in sympatric *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Rodentia: Octodontidae). *Behaviour*, 127: 247-263.
- Vassallo, A. I., Kittlein, M. J. y Busch, C. 1994. Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 75: 725-732.
- Vassallo, A. L. 1998. Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology*, 244: 415-427.

- Vassallo, A. I., Becerra F., Echeverría, A. I., Buezas, G. N., Rocha-Barbosa, O. y Chagas, K. 2017. Morfología funcional de los sistemas mandibular y locomotor en roedores caviomorfos. *Morfología de Vertebrados. Conceptos, métodos y grupos de investigación en Argentina*, 285 – 310.
- Vassallo, A. I., Becerra, F., Echeverría, A., Díaz, A., Longo, M., Cohen, M. y Buezas, G. 2021. Analysis of the Form-Function Relationship: Digging Behavior as a Case Study. *Journal of Mammalian Evolution*, 28: 1-16.
- Vega-Zuniga, T., Medina, F., Marín, G., Letelier, J., Palacios, A., Němec, P., Schleich, C. Y Mpodosis, J. 2017. Selective binocular vision loss in two subterranean caviomorph rodents: *Spalacopus cyanus* and *Ctenomys talarum*. *Scientific Reports*, vol. 7
- Verzi D. H., Olivares A. I. y 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.
- Verzi, D. H., Olivares, A. I., Morgan, C. C. y Álvarez, A. 2016. Contrasting phylogenetic and diversity patterns in Octodontoid rodents and a new definition of the family Abrocomidae. *Journal of Mammalian Evolution*, 23: 93-115.
- Villar, S., Martínez, S. y Novello, A. 2014. G-banding patterns of the genus *Ctenomys* from Uruguay (Rodentia Ctenomyidae): high karyotype variation but chromosome arm conservation. *Caryologia*, 67: 178 - 184.
- Vucetich, M. G., Arnal, M., Deschamps, C. M., Pérez, M. E. y Vieytes, E. C. 2015. A brief history of caviomorph rodents as told by the fossil record. In *Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution*, eds.

- Vassallo, A. I., Antenucci, D. 1st ed. SAREM Series A, Buenos Aires. pp 11-62
- Xia X y Xie Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.
 - Weir, B. J. 1974b. Reproductive characteristics of hystricomorph rodents. En *The biology of hystricomorph rodents*, eds. Rowlands I. W. and Weir, B. J. pp. 265-301.
 - Wilson, D. E. y 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.
 - Wlasiuk, G., Garza, J. C. y Lessa, E. P. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco - tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution*, 57: 913-26.
 - Woods, C. A. 1982. The history and classification of the South American Hystricognath reflections on the far away ond long ago. En *Mamalian Biology in South America*, eds. Mares M. A. and Genoways H. H. University of Pittsburg, Linesville, pp 377-392.
 - Zenuto, R. y Fanjul, M. 2002. Olfactory Discrimination of Individual Scents in the Subterranean Rodent *Ctenomys talarum* (Tuco-Tuco). *Ethology*, 108: 629-641.
 - Zenuto, R., Fanjul, M. y Busch, C. 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.