



Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*Estudio de la variación genética neutral y adaptativa
en *Ctenomys* sp. (Rodentia: Ctenomyidae): los roles de
la demografía y de la historia.*



Ana Paula Cutrera

*Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencias, Área Biología*

Directoras: Dra. Cristina Busch y Dra. Eileen Lacey

Mar del Plata, Marzo de 2007

AGRADECIMIENTOS

Hay muchísimas personas que remararon junto conmigo para que este proyecto llegara a buen puerto. Pero este barco no hubiera siquiera zarpado sin la ayuda incondicional, el consejo y la inspiración que recibí de Eileen. A ella estoy más que agradecida, por haberme abierto las puertas de su laboratorio de par en par, por haberse convertido en una directora de diez para mí, por haberme dado la oportunidad de viajar y presentar nuestro trabajo pero, por sobre todo, por su amistad, que atesoro como uno de los mejores “logros” de esta tesis. For the twentieth time now... thank you so so infinitely much!

Al equipo marplatense (Dani, Ro, Facu, Mati, Sol, Cris, Marce, Aldo y Cristina) les quiero decir “gracias totales”. A Dani, por los chistes (no son malos, acordate que un artista es incomprendido en su tiempo), los consejos y la fuente inagotable de ideas; a Ro, por el apoyo incondicional durante estos 5 años (del académico y del otro, que es el que más importó), por su claridad en el momento de las “consultas” y por la amistad que creció en este tiempo. Estoy contentísima de en que estos próximos dos años vamos a poder trabajar juntas. A “los chicos” Facu y Cris, gracias por la risa y por mantenerme “alerta” en todo momento; a Sol, por el aguante y por ser una pieza fundamental del “gremio” en este lab lleno de XY; a Mati, porque este trabajo no hubiera empezado sin su ayuda enorme en el campo, donde apostábamos un heladito a ver quién capturaba más bichos...

Al equipo californiano (aunque la gente es de todo el mundo!): Gab, Julie, John, Juan, Tom, Sean, Helen, Ani, Vanessa, Caroline, Sam, Wly, Tamí, Ana Carnaval, Ricardo, Jason y Julia, Conrad, Vance y Andrea, Lauryn, Maria Soares, Maria Svensson, Maria Tonione, los Bassins, Charles, Bill y Elaine, David B, Iñigo y Cristina, David V, Jim, Ana Trujano, Emily, Ron, Alan y Tasha. Todos y cada uno de ellos colaboraron en este proyecto con condimentos varios, a saber: amistad, “tips” y entrenamiento en técnicas del laboratorio, compañía en días de extrañitis, análisis de datos, paseos por California y logística en general. En fin, gracias por hacer de California mi verdadero segundo hogar y un lugar adonde siempre querré volver. A Gab, Charles, y los Bassins quiero decirles gracias especialmente, porque en seguida me hicieron sentir parte de la familia y eso fue mi “cable a tierra” en esos meses lejos de los míos.

A la familia (Cutres y el familión!), por ser mi todo, por iluminarme el camino cuando se venía la noche, por ayudarme a acomodar los melones en el carro y por enseñarme a que “al leon hay que comérselo de a poco”... A los amigos de siempre (Ana, Dani, Mari, Maru, Gui, Lei, Yayi y Herni) por estar siempre a pesar de las ocasionales distancias, viajar conmigo y mantenerme calentito el corazón. Al gordo, él solo puede adivinar todo lo que le agradezco su empuje, su garra, su energía, su amor y su paciencia. Gracias por ayudarme a saltar del trampolín y por estar abajo para atajarme.

Y, finalmente, gracias al helado de chocolate con chispas de chocolate de Ben & Jerry's, por ayudarme a pasar varias noches lejos de casa...

Quiero agradecer enormemente a Enrique Lessa, Diogo Meyer, Marjorie Matocq, Jim Patton, David Vieites y Stephen Dobson por sus comentarios y sugerencias sobre los análisis e interpretación de los resultados de diferentes secciones de esta tesis.

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET, Beca Doctoral Mixta a APC), de parte de la National Science Foundation (DEB-0128857 a Eileen Lacey) y de la Sigma Xi Foundation (Grant-in-Aid Research Program a APC, nro. 3040073) de Estados Unidos y gracias al subsidio concedido por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica al grupo de investigación del Laboratorio de Ecofisiología de la UNMdP (FONCyT-PICT 0109846).

INDICE

RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 1: <i>Estructura genética del tuco-tuco del talar (<u>Ctenomys talarum</u>): sus implicancias en las relaciones de parentesco y los patrones de dispersión.</i>	8
CAPÍTULO 2: <i>Variación intraespecífica en el tamaño efectivo poblacional del tuco-tuco del talar (<u>Ctenomys talarum</u>): El rol de la demografía.</i>	47
CAPÍTULO 3: <i>Variación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) del tuco-tuco del talar (<u>Ctenomys talarum</u>): La influencia de la demografía sobre la selección.</i>	72
CAPÍTULO 4: <i>El rol de la demografía histórica en el modelado de la variación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) del tuco-tuco de los médanos (<u>Ctenomys australis</u>).</i>	106
CAPÍTULO 5: <i>Patrones de evolución del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el género <u>Ctenomys</u></i>	135
CONCLUSIONES	169
LITERATURA CITADA	172
APÉNDICE	204

RESUMEN

Comprender cuáles son los factores que modelan la variación genética de las poblaciones naturales es uno de los objetivos fundamentales de la investigación en biología evolutiva. Para loci neutrales, el flujo génico y la deriva son las fuerzas principales que influyen en los patrones de diferenciación genética. En cambio, para loci funcionales, la selección también puede contribuir a dar forma a la variabilidad de dichas regiones del genoma. La historia de las poblaciones modela de manera fundamental la distribución y el mantenimiento de la diversidad genética dentro de un rango geográfico dado, sumándose a los efectos de los factores ecológicos y demográficos actuales. Los roedores subterráneos constituyen unos de los modelos más interesantes para poner a prueba hipótesis sobre los procesos que conducen a la diversificación evolutiva de los linajes. Presentan dos características que los distinguen: una limitada movilidad y una distribución espacial discontinua de las poblaciones locales. En particular, el género *Ctenomys* (tuco-tucos) es el que reúne la mayor cantidad de especies. *C. talarum* es una de las pocas especies que ha sido exhaustivamente estudiada en características de su ecología, demografía y comportamiento, por lo que representa una excelente oportunidad para analizar e interpretar su estructura genética poblacional. A su vez, *C. australis* y *C. talarum* constituyen uno de los escasos ejemplos de simpatria documentados para el género, brindando la posibilidad de explorar la influencia de procesos evolutivos en especies que, aunque se distribuyen en una misma área geográfica, han experimentado eventos históricos dispares. Por otro lado, la rápida diversificación en la historia temprana del género *Ctenomys*, hace que este grupo constituya un modelo de sumo interés para el estudio de la evolución de loci funcionales atravesando los eventos de especiación. Esta tesis analiza el rol relativo de la demografía actual y de los eventos históricos en el modelado de los patrones de diversidad genética neutral y adaptativa observados en poblaciones naturales de roedores subterráneos del género *Ctenomys*. Se compararon los patrones de variación genética neutral de dos poblaciones demográficamente diferentes de *C. talarum* de la Provincia de Buenos Aires: Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC). Los análisis de 12 loci de microsatélites revelaron que en ambas poblaciones, la estructuración del parentesco en el espacio fue más evidente en las hembras (apoyando un patrón de dispersión desviado hacia los machos) mientras que la estructuración genética fue más pronunciada en MC. Los estimadores de tamaño efectivo poblacional

(demográfico y genético) fueron menores para MC, la población con mayor densidad, una proporción de sexos desviada hacia las hembras y una mayor variación en el éxito reproductivo de los machos. Estas diferencias sugieren que la intensidad de la deriva génica es mayor en MC. Sin embargo, al comparar los niveles de variabilidad de loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, involucrados en la generación de la respuesta inmune) entre MC y NC, el número de alelos y los niveles de heterocigosis, así como la intensidad de selección sobre estos genes funcionales, fue mayor en MC. Probablemente este patrón se asocie con la mayor densidad (y, consecuentemente, mayor riesgo de contagio de patógenos), así como con mayor riesgo de apareamientos endogámicos. La comparación de la variabilidad de loci de MHC entre poblaciones simpátricas de *C. talarum* y *C. australis* en NC revelaron que dicha variación a nivel poblacional es mayor para *C. talarum*, mientras que la variabilidad a nivel molecular es mayor para *C. australis*. Este patrón sugiere que la selección diversificadora podría haber actuado con intensidad variable y a través de períodos de tiempos diferentes en estas especies. Los patrones actuales de variabilidad de MHC en *C. australis* parecen haber sido modelados predominantemente por los eventos demográficos recientes (expansión); sin embargo, los niveles y patrones de diversidad molecular de los exones examinados sugieren que la selección ha actuado sobre estos loci a través de tiempos evolutivos. Finalmente, los análisis filogenéticos realizados sobre loci de MHC para 18 especies del género *Ctenomys* indicaron que los linajes alélicos de MHC no siempre se ubicaron en el árbol de acuerdo a las relaciones filogenéticas de las especies en cuestión. Estos resultados, junto con la detección de codones bajo selección positiva en ambos exones de MHC, sugieren que la selección ha operado sobre estos loci en diferentes momentos de la historia evolutiva de *Ctenomys*, tanto en la historia temprana del género, incluso antes de los eventos de diversificación, como también más recientemente, promoviendo evolución convergente. Este trabajo destaca la importancia del análisis de la variabilidad genética de poblaciones naturales en especies que no son modelos de estudio tradicionales y remarca la gran cantidad de información que se obtiene al explorar genes neutrales y funcionales a la vez, en el contexto del conocimiento de los atributos demográficos históricos y actuales de las especies en cuestión. Finalmente, los resultados de esta tesis contribuyen a elucidar cuál es la importancia relativa de procesos de naturaleza neutral y selectiva en la modelación de la estructura jerárquica de la variación genética de roedores subterráneos, desde poblaciones locales a especies y en unidades taxonómicas mayores.

INTRODUCCION GENERAL

Comprender cuáles son los factores que modelan la variación genética de las poblaciones naturales es uno de los objetivos fundamentales de la investigación en biología evolutiva (Lewontin 1974, Gillespie 1991, Ford 2002). En este sentido, el destino de una variante genética dada en tiempo y en espacio es influido por la biología y las circunstancias de los organismos a través de los cuales ésta pasa, incluyendo i) la historia evolutiva de los organismos, ii) la demografía y los rasgos de historia de vida de los mismos, iii) procesos de selección (tanto actual como pasada) y el éxito reproductivo de los organismos y iv) características moleculares propias del gen, como sus tasas de mutación y de recombinación y el grado de ligamiento con otros genes (Sunnucks 2000). Claramente, estas fuerzas actúan en niveles que varían desde la especie hasta la molécula y, por lo tanto, es de fundamental interés comprender cómo dichas fuerzas han estado involucradas en la determinación de los patrones de diversidad genética que observamos en las poblaciones naturales.

Para loci selectivamente neutros, se considera que el flujo génico y la deriva genética constituyen las fuerzas principales que influyen en los patrones de diferenciación genética (Hartl y Clark 1997, Avise 2004). En cambio, para loci funcionales, la selección también puede contribuir a dar forma a la variabilidad de dichas regiones del genoma (Meyers y Bull 2002, Storz y Nachman 2003). Sin embargo, al contrario de la deriva y el flujo génico, la selección es un proceso idiosincrático, que afecta diferentes genes en diferentes formas. Finalmente, la historia de las poblaciones modela de manera fundamental la distribución y el mantenimiento de la diversidad

genética dentro de un rango geográfico dado, sumándose a los efectos de los factores ecológicos y demográficos actuales (Matocq et al. 2000).

En conjunto, la interacción de procesos ecológicos y evolutivos determina los niveles de diversidad genética contenidos dentro de las poblaciones y el grado en el cual dichas poblaciones se encuentran estructuradas genéticamente a lo largo del rango geográfico de una especie (Matocq et al., 2000). Asimismo, poblaciones de una misma especie pueden diferir en características de sus patrones de dispersión, comportamiento de cortejo y sistema de apareamiento (Emlen y Oring 1977), las cuales determinan el grado en el que la mutación, la deriva génica y la selección influirán sobre la variación dentro y el grado de diferenciación entre dichas poblaciones.

La mayoría de las especies, debido a la naturaleza discontinua de sus hábitats, presentan una organización espacial en grupos de poblaciones locales semi-aisladas. Estas poblaciones locales, debido a su grado de aislamiento y su reducido tamaño, están sujetas a posibles eventos de extinción debido a factores demográficos estocásticos o a características efímeras de su hábitat (Hanski y Gilpin, 1991). Por lo tanto, la descripción de la estructura genética de las poblaciones es una tarea importante y necesaria no sólo desde el punto de vista de la biología de la conservación de las especies (Burgman et al., 1993) sino también en cuanto a la comprensión de la historia y el futuro potencial evolutivo de una especie y sus poblaciones (Patton et al., 1996).

Los roedores subterráneos constituyen unos de los modelos más interesantes para poner a prueba hipótesis sobre los procesos que conducen a la diversificación evolutiva de los linajes. Presentan dos características que los distinguen: una limitada movilidad y una distribución espacial discontinua de las poblaciones locales condicionada por las

características de los suelos que habitan (Nevo, 1979). Estas características han sido asociadas con la gran diversificación evolutiva de este grupo de mamíferos y, a raíz de ello, los roedores subterráneos han sido empleados para ejemplificar las condiciones geográficas que generan innovaciones evolutivas y constituyen modelos de sistemas donde la variación de caracteres ocurre entre y no dentro de las poblaciones (e.g., Lacey 2001; Wlasiuk et al. 2003; Burland et al. 2004; para una revisión del tema ver Lacey et al., 2000). A medida que los estudios mencionados se han expandido para incluir análisis de la variabilidad de loci sujetos a selección, los estudios sobre roedores subterráneos han comenzado a generar evidencia importante sobre los determinantes de la estructura genética en loci funcionales. En particular, y recientemente, los roedores subterráneos han comenzado a ser explorados en aspectos de su variabilidad inmunogenética en la forma de loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC son sus siglas en inglés), explorando las relaciones que existen entre el sistema social y la intensidad de selección que actúa sobre dicha región del genoma (Nevo 1999; Hambuch and Lacey 2002; Kundu and Faulkes 2004).

Si bien las características mencionadas anteriormente (baja movilidad y discontinuidad del ambiente) contribuyen a la diferenciación a nivel de especie en los roedores subterráneos, no todos los grupos han sufrido los mismos niveles de especiación, siendo el género *Ctenomys* (tucu-tucos) el que reúne la mayor cantidad de especies. De las 125 especies de roedores subterráneos conocidas, 56 pertenecen a este género, el cual se distribuye en una gran área del sur de Sudamérica. Las distintas especies de tucu-tucos comparten una serie de características relacionadas con sus hábitos subterráneos. Entre ellas, se incluyen una distribución espacial en parches, baja

movilidad, comportamiento territorial, tamaños efectivos poblacionales reducidos y sistemas de apareamiento socialmente estructurados (Reig et al., 1990, Lacey et al. 2000). Se ha sugerido que dichas características podrían explicar la alta heterogeneidad cariotípica que presenta este género y sus altas tasas de diversificación a nivel de especie. En cuanto a su estructura poblacional, la mayoría de las especies de *Ctenomys* estudiadas se caracterizan por la presencia de colonias semi-aisladas que ocupan un área limitada de ambiente favorable y que se encuentran separadas por grandes distancias. La densidad poblacional puede afectar la dinámica de estos demos semi-aislados y se ha sugerido que la misma varía en forma importante con el hábitat, con los ciclos climáticos y estacionalmente (Busch et al., 1989, Reig et al., 1990). En los últimos años, se ha incrementado el número de especies del género *Ctenomys* que han sido estudiadas en aspectos de su biología molecular (Rossi et al., 1995) y de su estructura genética poblacional. (*C. australis* y *C. porteusi* - Apfelbaum et al. 1991, *C. haigi* y *C. sociabilis* – Lacey et al. 1999, Lacey 2001, *C. rionegrensis* – Wlasiuk et al. 2003, *C. lami* – El Jundi y Freitas 2004, *C. flamarioni* – Fernández et al. en prensa), coincidiendo con el marcado desarrollo de técnicas moleculares (ej., microsatélites) que permiten indagar sobre la biología, la demografía y la historia de estas especies subterráneas.

La especie *Ctenomys talarum* se distribuye a lo largo de la línea costera de la Provincia de Buenos Aires, desde Magdalena hasta Necochea. Este roedor herbívoro habita sistemas de cuevas que él mismo construye y sólo realiza breves incursiones a la superficie en busca de alimento y durante la dispersión. Ambos sexos son sumamente territoriales, excepto las crías aun no destetadas que comparten la cueva con la madre (Busch et al., 1989). Como parte de un estudio a largo plazo llevado a cabo por el grupo

de investigación del Laboratorio de Ecofisiología de la Universidad Nacional de Mar del Plata sobre las estrategias ecológicas relacionadas a la adaptación al ambiente subterráneo en el género *Ctenomys*, dos poblaciones diferentes de *Ctenomys talarum* han sido analizadas en sus aspectos demográficos, de historia de vida y de comportamiento, encontrándose diferencias notorias con relación a algunos de ellos (Busch, et al., 1989; Malizia y Busch, 1991; Malizia et al., 1995; Zenuto, et al., 1999 a y b, Zenuto et al. 2002).

A pesar de la gran cantidad de trabajos sobre distribución de la variabilidad genética en poblaciones de roedores subterráneos, sólo unos pocos estudios han incluido análisis detallados sobre la estructura genética de las poblaciones, siendo más escasos aun aquellos que combinan perspectivas genéticas y demográficas en la misma población. Por otro lado, *Ctenomys talarum* es una de las pocas especies que ha sido tan exhaustivamente estudiada en características de su ecología, demografía y comportamiento, por lo que representa una excelente oportunidad para analizar e interpretar su estructura genética poblacional. A su vez, *Ctenomys australis* y *C. talarum* constituyen uno de los escasos ejemplos de simpatria documentados para el género, brindando la posibilidad de explorar la influencia de procesos evolutivos en especies que, aunque se distribuyen en una misma área geográfica, han experimentado eventos históricos dispares (ver Mora et al., 2006, enviado). Por otro lado, la rápida diversificación verificada en la historia temprana del género *Ctenomys* (ver Cook y Lessa 1998; Lessa y Cook 1998; Mascheretti et al. 2000; Slamovits et al. 2001, Castillo et al. 2005), asociada por algunos autores con la gran diversidad cariotípica característica del género (Reig 1970; Ortells y Barrantes 1994), hace que este grupo constituya un modelo de sumo

interés para el estudio de la evolución de loci funcionales atravesando los eventos de especiación. El enfoque de esta tesis contribuye a la comprensión de la historia y el futuro potencial evolutivo de las especies y sus poblaciones y permite ampliar los conocimientos sobre la interacción de procesos ecológicos y evolutivos y su efecto en la modelación de los rasgos genéticos de una población. Por lo tanto, esta tesis doctoral tiene el siguiente objetivo general:

Analizar el rol relativo de la demografía actual y de los eventos históricos en el modelado de los patrones de diversidad genética neutral y adaptativa observados en poblaciones naturales de roedores subterráneos del género Ctenomys, las cuales constituyen un excelente modelo para poner a prueba hipótesis sobre la interacción entre los factores mencionados, la variación genética de las poblaciones naturales y los procesos evolutivos que operan sobre ellas.

Los 5 capítulos siguientes desarrollan los objetivos particulares que se desprenden del objetivo general descrito anteriormente. A continuación, se realiza un breve recorrido a través del contenido de los mismos.

En el Capítulo 1, se exploran las relaciones entre estructura genética, parentesco y dispersión en las dos poblaciones de estudio de *C. talarum* mencionadas, examinándose los patrones espaciales de similitud genética entre individuos adultos de tuco-tucos del talar. Además de proveer la primera descripción detallada de la estructura genética neutral de *C. talarum*, estos análisis brindan información sobre la relación entre dispersión y parentesco en especies solitarias de vertebrados.

En el Capítulo 2, se indaga sobre la influencia de aspectos demográficos, en particular, la proporción sexual adulta y la varianza en el éxito reproductivo de los machos, en la determinación del tamaño efectivo de las dos poblaciones de estudio de *C. talarum*. Estos análisis representan un aporte importante para comprender cuál es la

influencia que tienen los parámetros demográficos sobre el tamaño efectivo poblacional y, por lo tanto, en la estructura genética neutral de poblaciones naturales de vertebrados.

El Capítulo 3 da comienzo a la segunda etapa de esta tesis, donde se estudia la influencia de la demografía sobre la intensidad de la selección natural a través del análisis de los niveles de variabilidad de un conjunto de genes funcionales, el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en *C. talarum*. Esta sección aporta evidencia sobre el rol de parámetros demográficos actuales en la modelación de la estructura de loci funcionales, a través de la comparación de la variabilidad de genes de MHC en dos poblaciones naturales del tuco-tuco del talar.

En el Capítulo 4, se analizan comparativamente los niveles de variabilidad de dos genes del MHC en *C. talarum* y *C. australis*, empleando para dicho estudio dos poblaciones simpátricas de estas especies. A partir de este análisis, se explora el rol relativo de la selección natural y de la deriva génica asociada a eventos históricos en la determinación de la variación genética de loci funcionales en poblaciones naturales de vertebrados.

Finalmente en el Capítulo 5, se analiza la interacción y complejidad de las fuerzas que modelan la evolución de los loci de MHC en el género *Ctenomys*, examinando 18 especies de este grupo y una especie del género *Octodon*, cercanamente emparentado. Estos resultados son interpretados a la luz de las relaciones filogenéticas entre las especies analizadas, con el fin de discernir entre la acción de la selección natural sobre loci de MHC y los procesos históricos que han afectado la variabilidad genética de los tuco-tucos (i.e., eventos rápidos de divergencia en la historia temprana del género *Ctenomys*).

CAPITULO 1

ESTRUCTURA GENETICA DEL TUCO-TUCO DEL TALAR (CTENOMYS TALARUM): IMPLICANCIAS EN LAS RELACIONES DE PARENTESCO Y LOS PATRONES DE DISPERSION.

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

AGRADECIMIENTOS: A Mati por su gran ayuda durante las tareas de campo, al grupo del Evolutionary Genetics DNA Lab (MVZ-UC Berkeley), en especial a Gab, por su asesoramiento constante en la etapa de trabajo en el laboratorio y a Jim Patton y dos revisores anónimos por mejorar el presente capítulo con comentarios y sugerencias, que fueron de inmensa ayuda.

*Estructura genética del tuco-tuco del talar (*Ctenomys talarum*): sus implicancias en las relaciones de parentesco y los patrones de dispersión.*

INTRODUCCION

Conocer la distribución espacial de la variación genética provee información crítica sobre numerosos aspectos de la biología de una especie, incluyendo patrones de parentesco y de estructura social (Sugg et al. 1996, Chesser 1998, Dobson et al. 1998). En particular, debido a que la distribución espacial de los genotipos estrechamente emparentados (i.e. aquellos que comparten un ancestro común) se encuentra fuertemente influida por los movimientos que realizan los individuos (Lacey 2000, Matocq y Lacey 2004), la evidencia genética de la estructuración espacial del parentesco puede brindar información esencial sobre los patrones de dispersión de una especie (Daly y Patton 1990, Sugg et al. 1996). Por ejemplo, los análisis sobre las escalas espaciales a las cuales se evidencia un cierto grado de parentesco, pueden contribuir a estimar distancias típicas de dispersión (Matocq y Lacey 2004). Al mismo tiempo, las diferencias en la estructuración espacial del parentesco entre machos y hembras puede constituir evidencia de un patrón de dispersión sesgado de acuerdo al sexo (Gompper et al. 1998, Goudet et al. 2002). Finalmente, estimar el parentesco entre potenciales parejas reproductivas puede generar información sobre el rol que juega el evitamiento de la endogamia en la determinación de los patrones de movimientos individuales (Perrin y Mazalov 1999, 2000, Burland et al. 2004).

Dado el rol central que cumple la estimación del parentesco en los estudios de comportamiento social (Hamilton 1964, Sherman 1981), las relaciones entre dispersión,

parentesco y estructura genética han sido exploradas en detalle para un gran número de vertebrados sociales (e.g. monos aulladores, Pope 1992, 1998, leones, Spong y Creel 2004, ratas topo desnudas, Reeve et al. 1990, Faulkes et al. 1997). En comparación, la estructuración del parentesco en especies solitarias ha recibido considerablemente menos atención (pero ver Peacock y Smith 1997, Kraaijeveld-Smit et al. 2002). Aunque los miembros de una especie solitaria exhiben escaso solapamiento espacial e interactúan entre sí en forma poco frecuente (e.g. durante el apareamiento, Lidicker y Patton 1987), la supuesta ausencia de elementos del comportamiento social sujetos a selección por parentesco no invalida la existencia de evidentes patrones espaciales y genéticos. Por ejemplo, si las distancias de dispersión de los miembros de una especie solitaria exhiben una distribución de Poisson (Murray 1967, Koenig et al. 1996), entonces el grado de parentesco entre co-específicos debería disminuir a medida que la distancia entre ellos aumenta. Para aquellas especies que se caracterizan por una limitada vagilidad, esta tendencia debería conducir a una estructuración genética pronunciada dentro de las poblaciones, a pesar de la ausencia de interacciones sociales mediadas por parentesco entre co-específicos.

Con el fin de explorar las relaciones entre estructura genética, parentesco y dispersión en un vertebrado solitario, se examinaron los patrones espaciales de similitud genética entre tuco-tucos del talar (*Ctenomys talarum*). Como ya fuera mencionado en la introducción de esta tesis, *C. talarum* es solitario, cada adulto ocupa en forma exclusiva un sistema de túneles que él mismo construye (Pearson 1968). Con la excepción del apareamiento, los adultos presentan escaso contacto directo entre ellos y los individuos de ambos sexos responden típicamente en forma agresiva ante la presencia de co-

específicos (Busch et al. 1989, Zenuto et al. 2002). Por lo tanto, los miembros de esta especie no participan de interacciones sociales importantes, sugiriendo que la dispersión y la distribución espacial de individuos emparentados probablemente no estén influidas por procesos de selección por parentesco. Sin embargo, debido a que los roedores subterráneos se caracterizan en su mayoría por presentar baja vagilidad individual (Reig et al. 1990, Lacey et al. 2000), es probable que en *C. talarum* exista una estructuración del parentesco asociada a presiones de selección de carácter no social.

Para facilitar los análisis sobre estructura del parentesco y dispersión en esta especie solitaria, se compararon los patrones de variación genética en las dos poblaciones demográficamente diferentes de *C. talarum* que fueron mencionadas en la introducción de esta tesis: Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC). La evidencia indirecta sugiere que los patrones de movimiento individual y, por lo tanto, de estructuración del parentesco probablemente varíen tanto entre sexos como entre las poblaciones de estudio. En particular, análisis previos empleando la técnica de fingerprinting de ADN (Zenuto et al. 1999a) indican que tanto en MC como en NC, la existencia de bandas compartidas es más frecuente entre las hembras. En forma concordante, estudios a campo realizados extirpando todos los individuos de un área han revelado que mientras que en NC dichas áreas eran recolonizadas por juveniles de ambos sexos, los colonizadores en MC eran individuos de mayor madurez y fundamentalmente machos (Malizia et al. 1995). Estas observaciones llevan a formular las siguientes predicciones: i) dentro de las poblaciones, la estructuración del parentesco en el espacio debería ser más evidente entre las hembras que entre los machos; ii) entre las poblaciones, la estructuración del parentesco debería ser más pronunciada en MC. Para poner a prueba estas predicciones, se compararon los

patrones de variación de loci de microsatélites en MC y NC en varias escalas espaciales. Además de proveer la primera descripción detallada de la estructura genética de *C. talarum*, estos análisis brindan información sobre la relación entre dispersión y parentesco en especies solitarias de vertebrados.

MATERIALES Y METODOS

Poblaciones de estudio.- Las poblaciones de *C. talarum* en Mar de Cobo (37° 45' S, 57° 56' W) y en Necochea (38° 33' S, 38° 45' W), Provincia de Buenos Aires, Argentina, han sido estudiadas desde 1987 por C. Busch y colegas del Laboratorio de Ecofisiología de la Universidad Nacional de Mar del Plata (ver Busch et al. 1989). En ambas localidades, los animales se distribuyen en hábitats de dunas y pastizales costeros que están caracterizados por suelos arenosos y cuya flora se encuentra dominada por *Panicum racemosum*, *Ambrosia tenuifolia* y *Distichlis scoparia*; descripciones detalladas de los sitios de estudio son provistas por Comparatore y col. (1991, 1992). El hábitat en ambos sitios es relativamente abierto y continuo, lo cual no brinda ninguna razón a priori para predecir que la distribución espacial de los sistemas de cuevas o de los patrones de movimientos individuales debería diferir entre dichas localidades. Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC) se encuentran separadas por 150 km aproximadamente. Debido a que la franja costera que las separa no presentan poblaciones de *C. talarum* y a que las poblaciones de este roedor no ocurren hacia el interior de la provincia en esta zona (Reig 1964, Contreras y Reig 1965), la existencia de flujo génico actualmente entre dichas poblaciones es altamente improbable.

Diseño de muestreo y captura de los animales.- Con el fin de explorar los patrones de estructuración genética y del parentesco, se capturaron adultos de *C. talarum* en varias localidades espacialmente comparables por sitio de estudio. Inicialmente, se designó al azar un área de aproximadamente 2 ha. en cada sitio, como localidad focal de estudio (Fig. 1). Dicha área fue dividida en dos grillas de muestreo más pequeñas de 0,5 ha. (MC) o de 1,0 ha (NC), separadas una de otra por 150 m. aproximadamente (Fig. 1). Los

tamaños de las grillas fueron seleccionados para ser consistentes con estudios previos y actuales sobre la ecología y la demografía de *C. talarum* (Malizia et al. 1991, 1995). También se capturaron animales en dos localidades no focales, cada una de las cuales consistió en un área de 1 ha. Estas se ubicaron a 3 o 6 km. del centro de la localidad focal (Fig. 1). Para MC, los animales de la localidad de muestreo más lejana (6 km.) habían sido capturados en 1995 como parte de los análisis de paternidad realizados por Zenuto et al. (1999a).

Todos los individuos adultos presentes en cada grilla de muestreo fueron capturados. Para asegurarse de ello, se utilizaron trampas de captura viva tipo tubo de PVC que fueron ubicadas a la entrada de todas las cuevas que presentaban signos evidentes de actividad reciente (e.g., montículos de arena fresca recién extraída del interior de los túneles, tapones de arena frescos en las bocas de alimentación, etc.). La trampa era dejada en la entrada de una cueva determinada hasta que; 1) un adulto era capturado o 2) pasaban 48 hs. sin evidencia de actividad por parte de los tucos (e.g., contracción de tapones de arena en la trampa o a la entrada del túnel). Cada animal capturado fue pesado, sexado e individualmente marcado con un anillo metálico numerado ubicado en el tobillo de su pata trasera derecha. Se obtuvo una muestra de tejido no destructiva mediante la remoción del extremo distal (1-2 mm) del dedo externo de la pata trasera izquierda. Las muestras de tejido fueron conservadas en alcohol 95% hasta el momento de los análisis. Una vez que dichos procedimientos eran completados, el animal era liberado dentro de la cueva donde había sido capturado. El mismo procedimiento general de captura fue utilizado para las localidades no focales, aunque únicamente se capturaron 12 individuos por localidad (Tabla 1). Todos los

Tabla 1. Tamaños muestrales para los análisis espaciales y de estructura genética en *Ctenomys talarum*.

	Hembras					Machos				
	Localidad					Localidad				
Población										
MC	6km	3km	Focal	Grilla	Cluster	6km	3km	Focal	Grilla	Cluster
	10	6	23	13	6, 3, 3, 1	2	6	22	13	5, 1, 5, 2
				10	3, 5, 0, 1				9	0, 2, 4, 3
NC	10	5	11	6	5, 1	2	7	14	7	4, 3
				5	2, 0, 2, 1				7	2, 2, 1, 2

Se indica el número de hembras y machos adultos capturados en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC). Se establecieron dos grillas en cada una de las localidades de muestreo, cada grilla contuvo 2-4 clusters de cuevas, como fueron determinados por el SADIE. Por lo tanto, en cada línea de la tabla, la suma de adultos capturados en todos los clusters equivale al tamaño muestral de la grilla asociada

(excepto por una hembra de MC que no pertenecía a ninguno de los clusters identificados) y la suma de los adultos capturados en ambas grillas equivale al tamaño muestral de la localidad focal de muestreo asociada.

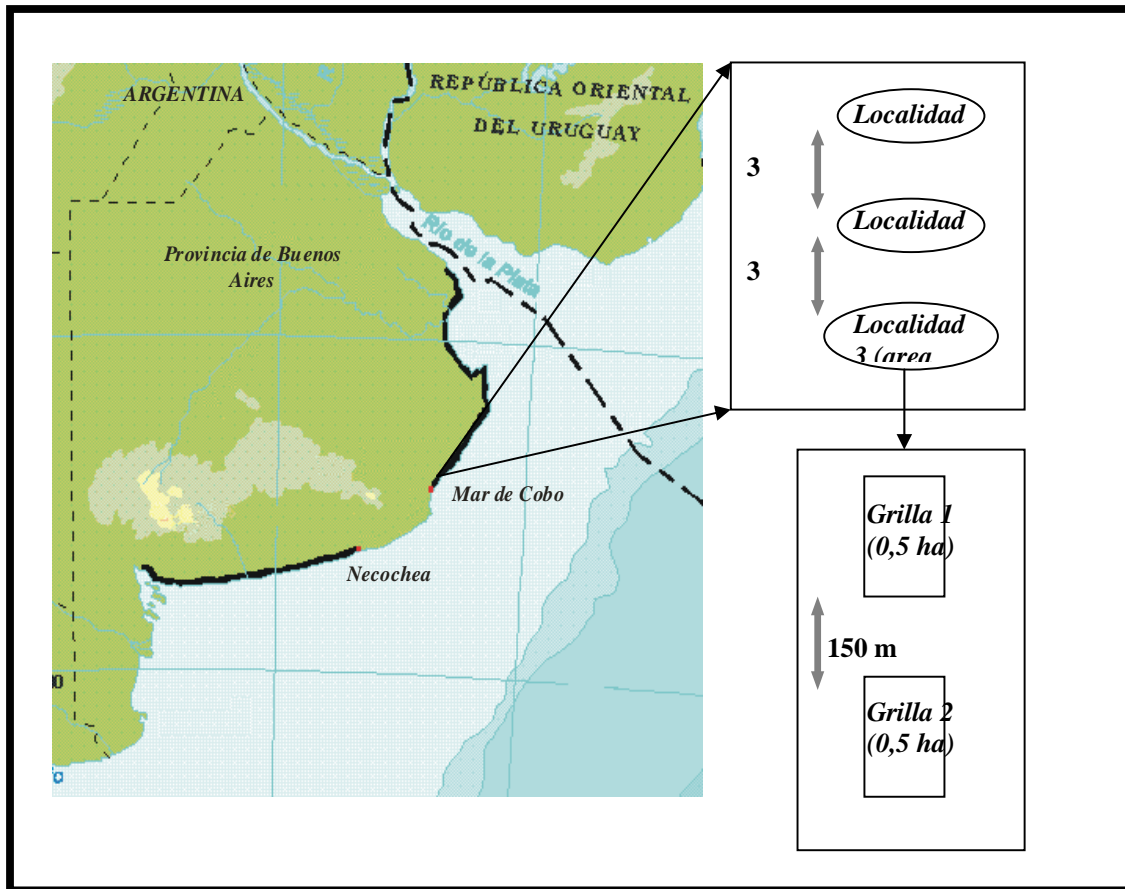


FIGURA 1. Poblaciones de estudio de *Ctenomys talarum* en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las áreas oscuras delineadas indican la distribución costera de *C. talarum*. Cada sitio de estudio contenía una localidad de muestreo focal y dos localidades de muestreo adicionales, situadas a 3 km y 6 km del área focal. Cada área focal contenía dos grillas de muestreo de 0,5 ha (MC) y 1,0 ha (NC), las cuales estaban separadas por aproximadamente 150 m.

procedimientos llevados a cabo en el campo se realizaron conforme a lo estipulado por la American Society of Mammalogists (ASM guidelines for the capture, handling, and care of mammals, Animal Care and Use Committee 1998).

Análisis de microsatélites.- Se analizaron la totalidad de las muestras de tejido colectadas de los adultos capturados en cada población de estudio. El ADN genómico de alto peso molecular fue extraído de las muestras de tejido mediante el uso de un kit de extracción (QIAGEN, Crawley, West Sussex, UK). Se estudió la variabilidad genética de 12 loci de microsatélites; 5 de estos loci fueron aislados de *C. haigi* (Lacey et al. 1999) y los restantes 7 fueron aislados de *C. sociabilis* (Lacey 2001). Estos loci fueron escogidos para los análisis en base a su habilidad para producir productos de PCR bien resueltos para *C. talarum*; la variabilidad alélica de dichos loci no fue establecida previamente al desarrollo de este trabajo. Las amplificaciones por medio de PCR fueron llevadas a cabo de acuerdo a Lacey (2001). Los productos de amplificación fluorescentemente marcados fueron corridos electroforéticamente en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 4% en un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Como standard de tamaño (números de pares de bases) se empleó Tamra GS350 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) corriéndose este en todas las calles del gel. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados y los genotipos fueron asignados mediante el uso de los paquetes de software GENESCAN 2.0 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, California).

Los cálculos de frecuencias alélicas, análisis de desequilibrio por ligamiento y tests de Hardy-Weinberg fueron realizados mediante el uso de GENEPOP 3.4 (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/index.htm>; Raymond y Rousset 1995).

Análisis de distribución espacial.- Con el fin de examinar las distribuciones espaciales de los animales capturados en las grillas focales de muestreo, se consideró la ubicación de la entrada de la cueva en la cual el individuo fue capturado como un estimador puntual de la localización de la cueva de este animal. El área media que ocupa un sistema de túneles de *C. talarum* es de 5-10 m² (Antinuchi y Busch 1992), lo cual representa < 1% del área de las grillas de muestreo empleadas en este estudio. Debido a esta diferencia relativa en el tamaño de las áreas y dado que los sistemas de cuevas de *C. talarum* típicamente no se solapan entre sí (Pearson et al. 1968), se consideró que los lugares de captura proveen estimadores razonables del sitio donde residía cada animal.

Con el objetivo de determinar si la proximidad espacial era influida por el sexo, se examinaron las distancias al vecino más cercano entre hembras, entre machos y entre individuos de ambos sexos para la totalidad de los individuos capturados en las grillas de muestreo focales. Las distancias entre vecinos fueron calculadas como la distancia lineal (m) entre sitios de captura de dos animales dados (distancias euclídeas calculadas con el software PopTools; Hood 2004). El mismo procedimiento fue utilizado para determinar si la proximidad en el espacio era influida por el nivel de parentesco. Específicamente, se compararon las distancias al vecino más cercano dentro de cada sexo y entre sexos para diferentes categorías: i) individuos cercanamente emparentados (ver más adelante) y ii) todos los individuos del sexo apropiado (ej. Hembras cercanamente emparentadas vs. todas las hembras). Las distancias al vecino más cercano para diferentes sub grupos de individuos fueron comparadas utilizando procedimientos estadísticos standard para comparar las medias de dos muestras.

Aunque estos análisis permitieron evaluar si combinaciones particulares de individuos ocurren más frecuentemente en proximidad espacial, éstos no permitían estimar la distribución general de los sistemas de cuevas en el espacio. Para determinar si los sistemas de cuevas se distribuían en forma agrupada, se empleó el software SADIE (Perry 1995) para generar un índice de agregación (I_a) para las cuevas de cada una de las grillas de muestreo. Este programa determina la distancia media (D) que los puntos de captura deberían ser movidos para alcanzar una distribución regular de los mismos. Los desvíos de una distribución regular son evaluados mediante la comparación de este valor medio con los valores de distancia a la distribución regular (E_a) calculados para 100 distribuciones de individuos generadas aleatoriamente. Aquellas proporciones de la distancia observada sobre la generada aleatoriamente (D/E_a) mayores que 1 son consideradas indicativas de una distribución espacial agregada. Dentro de cada grilla de muestreo, los clusters de cuevas fueron identificados mediante “initial-to-final (IAF) plots” generados por el software SADIE.

Análisis de la estructuración del parentesco.- Como un primer paso hacia la caracterización de la estructura del parentesco en cada población de estudio, se calcularon los coeficientes de parentesco de a pares (r) entre individuos en cada una de las áreas de muestreo focales empleando el software KINSHIP 5.0 (Queller and Goodnight 1989). Para determinar si los valores de r para un determinado grupo de individuos (ej. machos residentes en una misma grilla) eran mayores a lo esperado dados los niveles background de similitud genética en las poblaciones de estudio, se compararon los estimadores de r para los animales en cuestión con un estimador de la media de nivel de parentesco entre pares de individuos del sexo y escala espacial apropiados (ej., todos los machos

residentes en la misma área focal de muestreo) calculados a partir de 100 distribuciones generadas al azar de estimadores de r como se implementa en las subrutinas de RESAMPLE (con reemplazo) y MONTECARLO del PopTools (Hood 2004). Aquellas medias de r observadas que caían fuera del intervalo de confianza del 95 % calculado para los individuos seleccionados al azar fueron consideradas significativamente distintas del nivel background de parentesco. La relación entre el coeficiente de parentesco (r) y la distancia geográfica entre individuos fue examinada mediante la correlación producto-momento de Pearson, como se implementa en STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.).

Como una forma alternativa de caracterizar la estructura del parentesco, se evaluó la prevalencia de individuos cercanamente emparentados dentro de cada área de muestreo focal. Específicamente, se empleó KINSHIP 5.0 para identificar los pares de individuos cuyo grado de similitud genotípica fuera consistente con la de un parentesco de primer o segundo orden ($r \geq 0.25$). Dada la hipótesis específica de un cierto grado de parentesco, la versión de KINSHIP 1.2 utiliza los valores de r observados, las frecuencias alélicas en la población de estudio y los genotipos de los pares de individuos en cuestión para calcular la probabilidad de que dichos animales representen la relación de parentesco propuesta en la hipótesis. Sólo aquellos pares de individuos identificados como parientes de primer o segundo orden al nivel de $P \leq 0,05$ fueron incluidos en los análisis posteriores. Para cada localidad focal de muestreo, el porcentaje de pares de una composición de sexos dada (ej. pares hembra-hembra) que eran parientes cercanos ($r \geq 0.25$) fue evaluado tanto dentro como a través de todas las grillas de muestreo.

Análisis de subestructura genética.- Se espera que una estructura de parentesco significativa a una escala espacial dada facilite la diferenciación genética a escalas

espaciales mayores (Steinberg y Patton 2000). Para explorar el grado de diferenciación genética entre las unidades espaciales examinadas en este trabajo, se emplearon estimadores de dos estadísticos de F de Wright (1931): el índice de fijación (F_{ST}) y el coeficiente de endogamia (F_{IS}). Los estimadores de F_{ST} y F_{IS} y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% fueron generados por el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). Para ambas poblaciones de estudio, el F_{ST} fue estimado para machos, hembras y para todos los individuos en las siguientes escalas espaciales: entre clusters de cuevas en la misma grilla de muestreo, entre grillas de la localidad de muestreo focal y entre localidades de muestreo. En forma similar, para ambas poblaciones, el F_{IS} fue estimado para machos, hembras y todos los individuos dentro de los clusters de cuevas, dentro de las grillas y dentro de localidades de muestreo.

Como una forma alternativa de caracterizar la estructura genética, evaluamos el grado de subdivisión poblacional en diferentes escalas espaciales utilizando análisis de la varianza molecular (AMOVA), como es implementado en el ARLEQUIN (Schneider et al. 2000). La significancia de la subestructura genética detectada en cada escala espacial fue determinada utilizando el procedimiento de permutación contenido en ARLEQUIN. El grado de correlación entre genotipos a diferentes escalas espaciales fue examinado empleando estimadores jerárquicos de Φ , los cuales son análogos a los estadísticos F de Wright (1931). Dentro de cada población de estudio, la subestructura genética fue examinada a las siguientes escalas espaciales: dentro de la grilla de muestreo, entre grillas dentro de la localidad de muestreo y entre localidades de muestreo de la misma población de estudio.

Finalmente, se calcularon los valores del índice de asignación (AI) para machos y hembras en nuestras poblaciones de estudio empleando el FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). Los índices de asignación determinan la probabilidad de que un genotipo individual ocurra en la población de la cual fue obtenido (Farve et al. 1997). Cuando la dispersión es frecuente (ej., los individuos muestreados representan una mezcla de animales natales e inmigrantes), el valor medio de AI para una población debería ser bajo y la varianza alrededor de dicha media debería ser alta. De acuerdo a esto último, en una población donde la dispersión se encuentra sesgada con respecto al sexo, el valor medio de AI debería ser menor y la varianza debería ser mayor para el sexo que se dispersa más frecuentemente. Para los análisis de este trabajo, cada localidad de muestreo de las poblaciones de estudio (focal, 3km y 6 km) fue considerado como una población “diferente”.

Análisis estadísticos.- Los tests de Mantel fueron realizados utilizando el procedimiento de aleatorización de matrices contenido en PopTools 2.5 (Hood 2004). Los valores de P para los resultados del test de Mantel fueron determinados como se describe en Sokal y Rohlf (1995). Los análisis estadísticos restantes fueron realizados en el STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc.). Se emplearon procedimientos paramétricos a menos que la distribución de los datos no lo permitiera. De aquí en adelante, las medias se reportan ± 1 SD.

RESULTADOS

Variación de microsatélites.- No se detectó evidencia de desequilibrio por ligamiento entre los loci analizados (todos los $P > 0,05$). Sin embargo, se detectaron desvíos significativos del equilibrio de Hardy-Weinberg para 4 loci ($P < 0.0004$, α corregido por Bonferroni = 0.004). Un solo locus se desvió significativamente de los valores esperados en ambas poblaciones. Los loci restantes se desviaron significativamente en una única población. Los procesos que pueden causar desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg incluyen selección, subestructura poblacional (ej. efecto Wahlund, Hartl y Clark 1997) y la presencia de alelos nulos. Sin embargo, otros análisis de estos loci que incluyeron comparaciones de genotipos de pares conocidos de padres-hijos (ver detalle en capítulo 2), no revelaron evidencia de la existencia de alelos nulos, sugiriendo que el apartamiento de las condiciones de equilibrio se debe a otros factores.

Los valores de F_{ST} y F_{IS} proveen información, respectivamente, sobre el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones y del apartamiento de la situación de apareamiento al azar (Weir y Cockerham 1984, Cockerham y Weir 1987). Por lo tanto, aquellos loci de microsatélites que se desviaron del equilibrio Hardy-Weinberg no fueron excluidos de los análisis basados en esos estadísticos. En forma similar, los análisis de los índices de asignación son robustos frente a los desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg (Paetkau et al. 1995). Debido a que los estimadores de r se basan en las distribuciones alélicas de la población de estudio (Queller y Goodnight 1989), es poco probable que estos análisis sean afectados por desvíos de las frecuencias genotípicas esperadas bajo condiciones de equilibrio. Los supuestos del programa KINSHIP incluyen la ausencia de endogamia y de mutación (Queller y Goodnight 1989); a pesar de que la endogamia

puede causar desvíos de las proporciones Hardy-Weinberg, este efecto debería verificarse en todos los loci analizados (Hartl y Clark 1997), conduciendo a desvíos consistentes de lo esperado por Hardy-Weinberg en todos ellos. Se realizaron comparaciones de los valores de r generados utilizando todos los loci vs. solo aquellos loci que se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg en ambas poblaciones de estudio. Estas no revelaron diferencias significativas entre los coeficientes de parentesco estimados (Mantel test: MC: matriz de 45 x 45, $r = 0.970$, $P < 0,001$; NC: matriz 25 x 25, $r = 0.940$, $P < 0,001$). Considerando estos resultados, y dado que la exclusión de todos los loci que se desviaban de las proporciones Hardy-Weinberg afectaba el poder estadístico de ciertos procedimientos (ej. identificación de parientes cercanos), los datos de los 12 loci fueron incluidos en los análisis de parentesco y de estructura genética.

Distribución espacial de los individuos.- Los análisis de las distribuciones espaciales de los sitios de captura revelaron evidencia significativa de la existencia de clusters dentro de la grilla tanto en MC (Ia_{grilla1}: 1,33, $n = 23$, $P = 0,04$; Ia_{grilla2}: 1,19, $n = 22$, $P = 0,03$) y NC (Ia_{grilla1}: 1,4, $n = 11$, $P = 0,04$; Ia_{grilla2}: 1,26, $n = 14$, $P = 0,03$). Un promedio de 4 (± 0) clusters de cuevas distintos por grilla fueron identificados en MC, un promedio de 3 (± 1) por grilla fueron identificados en NC. El promedio de adultos por cluster fue $5,8 \pm 2,7$ (1,9 h: 1 m, $n = 8$ clusters) para MC y $4,0 \pm 2,6$ (1 h: 1 m, $n = 6$ clusters) para NC. En ambas poblaciones, la distancia media entre vecinos más cercanos machos fue mayor que aquella entre vecinos más cercanos hembras o entre vecinos más cercanos de sexos opuestos (Tabla 2). Ninguna de estas diferencias, sin embargo, fueron significativas (Mann-Whitney U tests, todos los $P \geq 0,059$, α corregido por Bonferroni = 0,017). En MC, la distancia media entre vecinos más cercanos del sexo opuesto fue

Tabla 2. Distancias medias al vecino más cercano (m) para animales dentro de la grilla de muestreo de Mar de Cobo (MC) o Necochea (NC). Se presentan las distancias para todos los pares de animales de una composición de sexos dada, como también las distancias de un subgrupo de dichos pares que consisten en parientes cercanos ($r \geq 0,25$). Los datos se presentan como distancias medias (± 1 SD); los tamaños muestrales (numero de distancias mínimas computadas) se presentan debajo de cada media.

Población	MC	NC
Distancias (m)		
Hembra-hembra		
Todos los pares	13,4 (7,7)	8,9 (8,4)
	n = 23	n = 11
Parientes	19,5 (10,6)	23,9 (10)
	n = 9	n = 5
Macho-macho		
Todos los pares	22,5 (22,5)	39,5 (39,8)
	n = 22	n = 14
Parientes	55,7 (28,2)	81,1 (18,8)
	n = 15	n = 7
Hembra-macho		
Todos los pares	11,3 (7,5)	19,3 (13,3)
	n = 45	n = 25
Parientes	37,6 (22,8)	47,4 (32,8)
	n = 29	n = 16

menor que aquella entre vecinos más cercanos hembras; en NC, se observó el patrón opuesto (Tabla 2). Sin embargo, estas diferencias tampoco resultaron significativas (Mann-Whitney U - test, todos los $P \geq 0,261$).

Estructura espacial del parentesco.- Los análisis de las distancias entre individuos cercanamente emparentados ($r \geq 0,25$) revelaron que, en ambas poblaciones de estudio, las distancias entre sistemas de cuevas ocupados por parientes cercanos no se encontraban distribuidas normalmente (MC: Shapiro-Wilk, $n = 52$, $W = 0,926$, $P < 0,019$; NC: $n = 28$, $W = 0,926$, $P < 0,048$). Por el contrario, las distancias entre animales cercanamente emparentados fueron consistentes con una distribución de Poisson (MC: Kolmogorov-Smirnov, $n = 52$, $d = 0,214$, NS; NC: $n = 28$, $d = 0,195$, NS). En ambas poblaciones, la distancia media entre hembras cercanamente emparentadas no difirió significativamente de la distancia promedio entre todas las hembras (Mann-Whitney U – test, todos los $P > 0,143$, Tabla 2). Por el contrario, la distancia media entre vecinos machos más cercanos de MC y entre individuos del sexo opuesto de ambas poblaciones fueron significativamente mayores para animales cercanamente emparentados (Mann-Whitney U – test, todos los $P < 0,007$, α corregido por Bonferroni = $0,017$; Tabla 2), sugieren que al menos para ciertas combinaciones de pares de individuos, aquellos cercanamente emparentados tendían a estar localizados más lejos uno de otro que aquellos individuos menos emparentados o no emparentados.

Dentro de los clusters, los valores medios de r entre hembras y entre individuos de sexo opuesto fueron mayores para MC; por el contrario, los valores de r promedio entre machos fueron mayores para NC (Tabla 3). Sin embargo, solo las diferencias entre hembras y entre animales de sexos opuestos de MC resultaron significativamente

Tabla 3. Media (± 1 SD) de valores de r (coeficiente de parentesco) de a pares para animales capturados en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC).

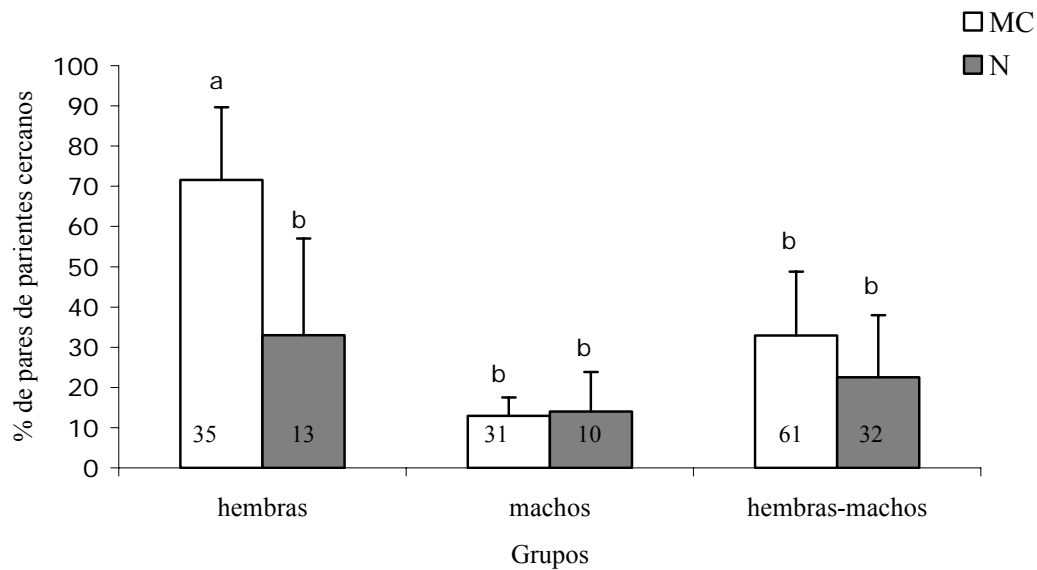
Población	MC	NC
(a) Clusters		
Hembra-hembra	0,190 (0,050)* n = 35	0,103 (0,050) n = 13
Macho-macho	-0,064 (0,120) n = 31	0,013 (0,050) n = 10
Hembra-macho	0,150 (0,010)* n = 61	0,060 (0,030) n = 32
(b) Grillas		
	0,083 (0,060) n = 61	0,106 (0,010) n = 32
Hembra-hembra	0,083 (0,060) n = 115	0,106 (0,010)* n = 25
Macho-macho	-0,063 (0,100) n = 106	0,039 (0,050) n = 42
Hembra-macho	0,039 (0,010)* n = 259	0,038 (0,040) n = 77

Los estimadores de r fueron generados para animales capturados dentro de (a) el mismo cluster de cuevas y (b) la misma grilla de muestreo. Los asteriscos denotan medias que caen fuera de los intervalos de confianza del 95% obtenidos mediante aleatorizaciones de pares de individuos de la misma composición de sexos capturados dentro de (a) la misma grilla de muestreo y (b) la misma población de estudio generados por Monte Carlo (100 iteraciones).

diferentes del nivel de parentesco background asociado. De acuerdo con esto, el porcentaje de pares hembra-hembra que fueron identificados como parientes cercanos fue significativamente mayor para MC (ANOVA: población de origen, $F_{(1,22)} = 8,599$, $P = 0,0077$; sexo, $F_{(2,22)} = 15,54$, $P < 0,0001$; interacción entre población y sexo, $F_{(2,22)} = 4,08$, $P = 0,031$; Tukey $P < 0,05$; Fig. 2a). Aunque el porcentaje de pares hembra-macho que fueron identificados como parientes cercanos fue también mayor para MC, esta diferencia no resultó significativa (Tukey $P > 0,05$; Fig. 2a). Por lo tanto, a la escala espacial de clusters de sistemas de cuevas, la estructura de parentesco resultó más pronunciada entre hembras, particularmente entre hembras de MC.

Dentro de las grillas, el promedio de valores de r entre hembras y entre machos fue mayor para NC, pero sólo el estimador de parentesco para hembras de NC difirió significativamente de los niveles de parentesco background (Tabla 3). Los valores promedio de pares hembra-macho fueron similares para ambas poblaciones de estudio; sólo el estimador de r para MC fue significativamente diferente del background (Tabla 3). El porcentaje de pares hembra-hembra y hembra-macho identificados como parientes cercanos fue significativamente mayor para MC (ANOVA: población de origen, $F_{(1,5)} = 8,29$, $P = 0,028$; sexo, $F_{(2,5)} = 32,73$, $P < 0,001$, interacción entre población y sexo, $F_{(2,5)} = 5,7$, $P = 0,041$; Tukey $P < 0,05$; Fig. 2b). Por lo tanto, a esta escala espacial, la estructuración del parentesco fue también más evidente entre animales de MC, con una estructura significativa detectada entre animales del sexo opuesto, así como también entre hembras.

a)



b)

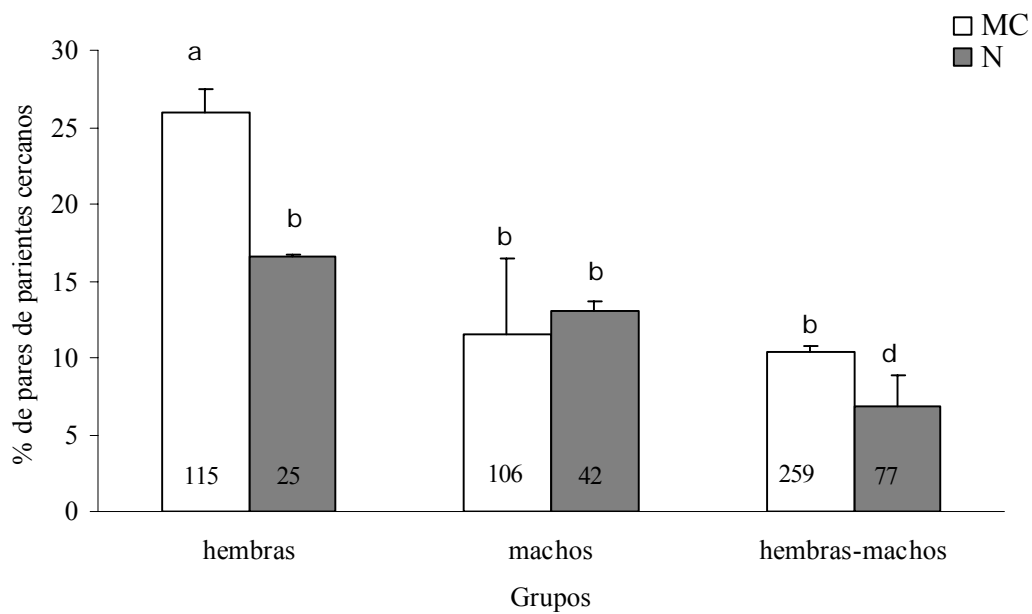


FIGURA 2. Porcentajes de individuos identificados como parientes cercanos ($r \geq 0,25$) en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC). El número total de pares a partir del cual se calcularon los valores de porcentajes son indicados dentro de cada barra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre porcentajes (ANOVA de dos vías, Tukey, $P < 0,05$). En (a) se muestran los porcentajes de pares de parientes cercanos presentes dentro de los clusters de cuevas; en (b) se muestran los porcentajes de parientes cercanos presentes dentro de las grillas de muestreo en las áreas focales.

= -0,331, $n = 115$, $P < 0,001$; NC: $r = -0,692$, $n = 25$, $P < 0,001$). Sin embargo, esta relación no fue significativa para los machos en ninguna de las poblaciones de estudio (MC: $r = -0,006$, $n = 106$, $P = 0,955$; NC: $r = 0,030$, $n = 42$, $P = 0,845$). Para animales de sexos opuestos, r se correlacionó negativamente en forma significativa con la distancia entre individuos en MC ($r = -0,210$, $n = 259$, $P = 0,004$) pero no en NC ($r = -0,020$, $n = 77$, $P = 0,880$). Estos resultados son consistentes con análisis de los valores promedio de r y de la prevalencia de parientes cercanos, en cuanto que sugieren que la estructuración del parentesco fue más evidente entre hembras de ambas poblaciones y entre animales de sexos opuestos de MC.

Subestructura genética.- En general, los estimadores de F_{ST} fueron mayores para MC que para NC (Tabla 4). Dentro de cada población de estudio, los valores de F_{ST} tendieron a ser mayores para las hembras que para los machos. A la menor escala espacial considerada (dentro de las grillas), se obtuvieron valores de F_{ST} significativamente diferentes de cero para hembras de una grilla de muestreo en MC y para todos los adultos (ambos sexos agrupados) de ambas grillas de muestreo en MC. Entre grillas, F_{ST} fue significativo sólo para las hembras de MC. A la mayor escala espacial considerada (entre localidades), todos los estimadores de F_{ST} para MC y los estimadores para hembras y para todos los adultos (ambos sexos agrupados) de NC fueron significativamente diferentes de cero. Por lo tanto, en todas las escalas espaciales consideradas, la subestructura genética fue más pronunciada entre animales de MC.

Los resultados de los coeficientes de endogamia arrojaron resultados similares, en cuanto a que, en todas las escalas espaciales consideradas, los estimadores de F_{IS} tendieron a ser mayores para MC que para NC (Tabla 5). Sin embargo, comparativamente

Tabla 4. Valores de F_{ST} calculados para animales de Mar de Cobo (MC) y de Necochea (NC). Se indican las escalas espaciales a través de las cuales se calcularon dichos valores.

F_{ST}	MC	NC
Entre localidades		
Todos	0,236* (69)	0,062* (49)
Hembras	0,247* (39)	0,082* (26)
Machos	0,230* (30)	0,040 (23)
Entre grillas		
Todos	-0,100* (45)	-0,080 (25)
Hembras	0,029* (23)	-0,023 (11)
Machos	-0,176 (22)	-0,168 (14)

	MC1	MC2	NC1	NC2
Entre clusters	0,076* (26)	0,075* (19)	0,066 (13)	0,042 (12)
	0,098 (13)	0,096* (10)	0,065 (6)	-0,053 (5)
	-0,032 (13)	0,005 (9)	0,068 (7)	-0,035 (7)

Los asteriscos denotan los valores de F_{ST} que son significativamente distintos de cero. Los tamaños muestrales son presentados entre paréntesis.

menos estimadores de F_{IS} fueron significativamente distintos de cero y todos ellos correspondieron a valores obtenidos en MC (Tabla 5). Dos de estos cuatro valores fueron obtenidos en los análisis de todos los individuos residentes en un mismo cluster (hembras y machos combinados). El F_{IS} también resultó significativo entre machos dentro de una misma grilla de muestreo y entre todos los adultos dentro de una localidad de muestreo. Por lo tanto, la reducción de la heterocigosis debida a endogamia fue más evidente entre miembros de la población de MC que entre aquellos de NC.

Cuando los datos de ambos sexos fueron combinados, más del 74 % de la variación genética total en cada población de estudio fue contenida dentro de la escala espacial de la grilla de muestreo (Φ_{ST} , Tabla 6). Aunque el porcentaje de variación genética total mantenida entre localidades fue aproximadamente tres veces mayor para MC que para NC, los estimadores de Φ_{CT} no resultaron significativos para ninguna de las poblaciones (Tabla 6). En todos los análisis, los estadísticos Φ para animales de MC fueron mayores que los obtenidos para NC, lo cual sugiere que la subestructura genética fue más pronunciada en MC. Cuando los datos de hembras y machos fueron examinados independientemente, más del 69% de la variación genética total para cada sexo se encontró dentro de las grillas de muestreo (Φ_{ST} , Tabla 7). En NC, el particionamiento espacial de la variación genética fue similar para ambos sexos (Tabla 7). Por el contrario, en MC, la variación genética entre localidades fue mayor para hembras que para machos (Tabla 7). Aunque el Φ_{CT} no resultó significativo para machos ni para hembras, el Φ_{ST} fue significativo para ambos sexos (Tabla 7), sugiriendo que la subdivisión espacial de la variación genética difirió entre machos y hembras en MC. Entre las localidades de MC, el valor del índice medio de asignación (AI) para hembras fue significativamente mayor que

Tabla 5. Valores de F_{IS} calculados para animales de Mar de Cobo (MC) y de Necochea (NC). Se indican las escalas espaciales a través de las cuales se calcularon dichos valores.

F_{ST}	MC	NC
En localidades		
Todos	0,106*(69)	0,012 (49)
Hembras	0,114 (39)	-0,013 (26)
Machos	0,090 (30)	0,022 (23)
En grillas		
Todos	-0,030 (45)	0,065 (25)
Hembras	0,108 (23)	0,015 (11)
Machos	0,440* (22)	0,148 (14)

	MC1	MC2	NC1	NC2
En clusters	0,162* (26)	0,226* (19)	0,068 (13)	-0,070 (12)
	0,201 (13)	0,210 (10)	-0,103 (6)	0,074 (5)
	0,105 (13)	0,239 (9)	0,317 (7)	0,029 (7)

Los asteriscos denotan los valores de F_{IS} que son significativamente distintos de cero. Los tamaños muestrales son presentados entre paréntesis.

Tabla 6. Resultados del test de AMOVA para individuos adultos de Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), dividido por sexo.

Componentes de la varianza	MC				NC			
	g.l.	%	Φ	P	g.l.	%	Φ	P
Entre localidades (Φ_{CT})								
Hembras	2	30,18	0,302	0,18	2	4,24	0,042	0,18
Machos	2	6,78	0,068	0,16	2	3,71	0,037	0,17
Entre grillas en localidades (Φ_{SC})								
Hembras	1	0,78	0,011	< 0,0001	1	4,73	0,049	< 0,0001
Machos	1	2,09	0,022	< 0,01	1	4,11	0,043	< 0,01
En grillas (Φ_{ST})								
Hembras	76	69,04	0,310	< 0,01	48	91,04	0,09	< 0,0001
Machos	66	91,13	0,089	< 0,0001	46	92,19	0,078	< 0,0001

La columna de porcentajes indica la porción de la varianza total que es explicada por cada uno de las escalas espaciales, de una forma jerárquica. Los valores de P fueron obtenidos mediante comparaciones de los valores observados con aquellos generados por permutación al azar en el ARLEQUIN 2000. g.l. representa los grados de libertad en cada análisis. Los estadísticos Φ son análogos a los estadísticos F de Wright e identifican el grado de correlación entre alelos en cada uno de los niveles jerárquicos.

Tabla 7. Resultados del test de AMOVA para individuos adultos de Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC).

Componentes de la varianza	MC				NC			
	gl	%	Φ	P	gl	%	Φ	P
Entre localidades (Φ_{CT})	2	23.5	0.235	0.16	2	7.71	0.077	0.17
Entre grillas en localidades (Φ_{SC})	1	1.98	0.026	<0.0001	1	0.58	0.006	<0.0001
En grillas (Φ_{ST})	134	74.52	0.255	<0.0001	94	91.71	0.083	<0.0001

para machos (n hembras = 39, n machos = 30, promedio de AI_{hembras} : 0,875; AI_{machos} : -1.000, $P = 0,036$), lo cual indica que las hembras fueron asignadas más frecuentemente a su área natal de muestreo (Fig. 1) sobre la base de sus genotipos. Aunque la varianza de AI para hembras fue menor que para machos, esta diferencia no fue significativa (N hembras = 39, n machos = 30, varianza AI_{hembras} : 9,29; varianza AI_{machos} = 12,21; $P = 0,737$). Entre las localidades de NC, tanto el promedio como la varianza de AI resultaron menores para las hembras, aunque ninguna de estas diferencias resultó significativa (n hembras = 26, n machos = 23; promedio AI_{hembras} : -0,583; promedio AI_{machos} : 0,364; $P = 0,793$; varianza de AI_{hembras} : 6,52; varianza AI_{machos} : 7,42; $P = 0,441$). Debido a que los valores de AI se basan en las diferencias genotípicas entre las áreas muestreadas, estos resultados sugieren que, en MC, la subestructura genética entre las localidades de muestreo es mayor para hembras que para machos. Por el contrario, la ausencia de diferencias significativas en el promedio y la varianza de AI en NC implican que, para esta población, el grado de subestructura genética entre localidades de muestreo no difirió entre los sexos. La subestructura puede surgir a partir de la limitada movilidad de los individuos entre localidades de muestreo y, por lo tanto, las diferencias interpoblacionales observadas en el grado de subestructura sugieren que la dispersión se encuentra más desviada hacia los machos en MC.

DISCUSIÓN

Las diferencias significativas en el grado de subestructura genética entre las dos poblaciones de *Ctenomys talarum* en MC y NC fueron evidentes. Por ejemplo, el análisis de los estimadores de F_{ST} reveló una subestructura genética significativa en MC en cada una de las escalas espaciales consideradas (clusters de cuevas, grillas y localidades). Por el contrario, para NC, se obtuvieron valores significativos de F_{ST} sólo a las mayores escalas espaciales analizadas (entre localidades). Los estimadores de F_{ST} entre localidades de NC, aunque significativamente diferentes de cero, fueron sustancialmente menores que los valores comparables de MC, indicando que, aun a la misma escala espacial, la estructuración genética fue más evidente en MC. En forma similar, todos los estimadores significativos de fueron de datos provenientes de MC, sugiriendo que los cambios en los niveles de heterocigosis debidos a endogamia también fueron más pronunciados en esta población. Finalmente, los AMOVAS revelaron que, cuando todos los adultos fueron considerados en forma conjunta, los valores de Φ fueron mayores para MC que para NC en todas las escalas espaciales consideradas. Por lo tanto, en general, la variación genética se encontró más estructurada espacialmente en MC que en NC.

Esta diferencia en el grado de estructura genética fue asociada con evidencia significativa de distintos niveles de estructuración del parentesco de acuerdo al sexo entre las poblaciones de estudio. En parte, este resultado se debe a que los niveles de parentesco (valores de r , prevalencia de parientes cercanos) fueron consistentemente mayores para hembras de MC. Al mismo tiempo, se encontró evidencia significativa de parentesco entre machos y hembras de MC; por el contrario, no se verificaron niveles de

parentesco comparables entre individuos de sexos opuestos de NC. Por lo tanto, la estructuración del parentesco más acentuada en MC es el resultado de mayores niveles de parentesco en dos categorías distintas de individuos. De acuerdo a esto, mientras que los coeficientes de parentesco entre hembras decrecieron significativamente con la distancia geográfica entre individuos en ambas poblaciones, sólo en MC se encontró una correlación negativa significativa entre distancia geográfica y coeficiente de parentesco entre individuos de sexos opuestos.

Un factor que podría haber contribuido a las diferencias en los niveles de parentesco y de estructuración genética es que los tamaños muestrales obtenidos en MC fueron consistentemente mayores que para NC. La densidad de *C. talarum* en MC es marcadamente mayor que en NC (Busch et al. 1989, Malizia et al. 1991) y, a pesar de la diferencia en el tamaño de las grillas entre los sitios de muestreo (0,5 ha. para MC vs. 1,0 ha. para NC), esta mayor densidad resultó en mayores tamaños muestrales para MC en todos los análisis. Como resultado, el poder de detectar estructuración genética y del parentesco pudo haber sido mayor para MC. Sin embargo, en ciertos análisis, se obtuvo evidencia significativa de parentesco entre hembras de NC, sugiriendo que los resultados de este estudio no se deben únicamente a diferencias en el poder estadístico. Aunque las comparaciones realizadas en este estudio entre localidades deberían tener en cuenta la variación en los tamaños muestrales (ver Hurlbert 1984), las diferencias en el grado de estructuración genética y del parentesco reportadas aquí reflejan diferencias demográficas reales entre las poblaciones de estudio.

Implicancias para la dispersión.- La estructura genética es influida por los patrones de movimiento individuales y por las características de la reproducción (Austin et al.

2003, Fraser et al. 2004). Dentro de las poblaciones, se espera que la subestructura genética aumente a medida que la distancia media de dispersión decrece (Perrin y Mazalov 2000). Mientras que la frecuencia de dispersión (porcentaje de individuos que dejan el sitio natal) también afectará al grado de subestructura, esta variable debería ser capturada en las estimaciones de las distancias de dispersión. A medida que la distancia recorrida desde el área natal decrece, los animales que comparten material genético debido a que tienen un ancestro en común tenderán a agruparse espacialmente, resultando este proceso en la formación de agregados espaciales de individuos dentro de una población (Perrin y Mazalov 2000). Por lo tanto, el grado de estructura genética dentro de una población puede proveer información crítica sobre los patrones de dispersión. Cuando esta información es combinada con datos sobre la estructura genética, estos análisis pueden ser empleados para generar hipótesis explícitas sobre los patrones de dispersión, a la vez que para explorar los posibles factores demográficos y ecológicos que subyacen a las diferencias encontradas en las características de la dispersión entre co-específicos.

Basados en los resultados de los análisis de parentesco y estructura genética de *C. talarum* obtenidos en este trabajo, predecimos que, en promedio, los machos de las poblaciones de estudio se dispersan a mayores distancias que las hembras. Todas las medidas consideradas coinciden en que la estructura genética es más pronunciada entre las hembras de cada población, sugiriendo que los movimientos de los miembros de dicho sexo son más limitados que los de los machos. Esta predicción es consistente con la tendencia general verificada en mamíferos de que la dispersión natal se encuentra sesgada hacia los machos (Greenwood 1980, Dobson 1982). Aunque el presente estudio parece

contradecir los resultados de trabajos previos, donde estudios de extirpación verificaron que en NC números similares de machos y hembras se dispersaron hacia las áreas artificialmente vaciadas (Malizia et al. 1995), dichos análisis no monitorearon el origen de los inmigrantes y, por lo tanto, las distancias recorridas por los machos durante la dispersión hacia el área experimental podrían haber sido mayores que las de las hembras. Por otro lado, los patrones de dispersión pueden diferir entre individuos que colonizan un área “vacía” en vez de un sitio en el cual ya existen residentes presentes (Dobson 1981). Los movimientos hacia el área experimentalmente vaciada en MC fueron sesgados hacia los machos significativamente (Malizia et al. 1995); estos datos coinciden con nuestros análisis de estructura genética en cuanto a que sugieren que las diferencias en la dispersión entre machos y hembras son más extremas en esta población que en NC.

Entre los factores que podrían afectar el grado de subestructura genética observada en poblaciones naturales se encuentran los de naturaleza histórica (ver Matocq 2004). Por ejemplo, la prevalencia de una línea materna puede contribuir a una mayor subestructura mientras que un período de mortalidad puede “filtrar” dicho parentesco. Sin embargo, como se demostrará en detalle en el capítulo 2 de esta tesis, es poco probable que se hayan producido reducciones en el tamaño poblacional efectivo de MC y NC en un pasado reciente. En forma similar, en el siguiente capítulo concluye que tampoco es probable que hayan ocurrido eventos históricos de expansión poblacional en MC y NC, considerando los resultados arrojados por los análisis que comparan la heterocigosis esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg con la esperada bajo el equilibrio de mutación-deriva (Cornuet y Luikart 1996).

Comparando los patrones de parentesco y estructura genética en las poblaciones de estudio, se predice que, para cada sexo, los animales de NC se dispersan a mayores distancias que los de MC. Entre las hembras, la evidencia de estructuración genética y del parentesco fue consistentemente mayor para MC, sugiriendo que las distancias relativas de dispersión son menores para las hembras de esta población. Aunque ninguna de las poblaciones estudiadas reveló una estructuración genética significativa entre los machos, dicha estructura fue detectada entre individuos de sexos opuestos de MC. Para que este patrón espacial ocurra, la dispersión de los machos de MC debe producirse, en promedio, a menores distancias que en NC. Los estudios de campo detallados en el capítulo 3 de esta tesis, ponen a prueba predicciones acerca de los patrones de dispersión en dichas poblaciones mediante el seguimiento de individuos marcados.

Identificar los factores selectivos que favorecen la dispersión natal representa un desafío, en parte debido a las dificultades de distinguir causa y efecto. Frecuentemente, el evitamiento de la endogamia y de la competencia local por recursos son postulados como los dos factores preponderantes que subyacen a la dispersión natal (Hamilton 1967, Clarke 1978, Pusey 1987, Clutton-Brock 1989, Pusey y Wolf 1996). Las comparaciones entre los datos de comportamiento y genéticos de MC y NC sugieren que la importancia relativa de estos factores puede variar entre las poblaciones de estudio. Por ejemplo, la mayor estructura del parentesco entre individuos de sexos opuestos en MC sugiere que la reproducción de individuos cercanamente emparentados podría ser más común en esta población, lo cual podría indicar, a su vez, que los mecanismos de evitamiento de la endogamia se encuentran más relajados en esta población que en NC. Al mismo tiempo, la densidad poblacional es mayor, los niveles de agresión entre machos son más altos y el

grado de poliginia es aparentemente mayor en MC (Zenuto 1999, Zenuto et al. 1999a, b, 2002), sugiriendo que la competencia local por parejas es prevalente en esta población. Por el contrario, la densidad poblacional es menor, la agresión macho-macho es menos extrema, la poliginia parece ser menos pronunciada (Zenuto 1999, Zenuto et al. 1999a, b, 2002) y no existe estructura genética significativa entre individuos de sexos opuestos en NC, todo lo cual sugiere que la competencia local por parejas es menos extrema en esta población. Mientras que se requiere continuar los estudios para elucidar los factores que subyacen a los patrones de dispersión en *C. talarum*, estas diferencias interpoblacionales en comportamiento y estructura genética sugieren que las bases adaptativas de la dispersión pueden variar entre poblaciones de co-específicos.

Estructura del parentesco en especies solitarias.- En las poblaciones de estudio de *C. talarum* se observó una estructuración genética significativa en el espacio, indicando que existe estructura del parentesco en esta especie de roedor solitaria. No se conoce que los adultos de *C. talarum* se involucren en interacciones sociales regulares fuera del período reproductivo (Zenuto et al. 2002) y, por lo tanto, la distribución espacial de individuos emparentados no debería ser influida por procesos asociados a la selección por parentesco o por otros beneficios adaptativos que requieren la proximidad espacial de parientes. En cambio, la estructuración del parentesco en *C. talarum* probablemente surge debido a la distribución de las distancias de dispersión individuales alrededor de una media específica de la población. Las distancias entre parientes cercanos en las poblaciones de estudio fueron consistentes con una distribución de Poisson. Asumiendo que dichas distancias reflejan los patrones de dispersión natal, es probable que la distribución espacial de individuos cercanamente emparentados siga una distribución

estadística conocida, dando lugar, por lo tanto, a relaciones predecibles entre distancia geográfica y grado de parentesco.

Aunque se ha demostrado la existencia de estructura genética en otras especies de roedores solitarios (Patton y Feder 1981, Patton y Smith 1989), pocos estudios de taxa solitarios han examinado explícitamente los patrones de distribución espacial de individuos cercanamente emparentados (pero ver Peacock y Smith 1997, Kraaijeveld-Smit et al. 2002). Sin embargo, la aparente relación entre dispersión y parentesco sugiere que estructuras genéticas similares a aquellas reportadas para *C. talarum* podrían ser comunes en otras especies (ver también Matocq 2004). La socialidad se considera como un continuo de relaciones espaciales y de comportamiento entre individuos (Lidicker y Patton 1987, Sherman et al. 1995, Lacey 2000); a medida que la distancia de dispersión desde el área natal decrece (ej. la filopatría natal aumenta), el grado de estructuración del parentesco y, presumiblemente, la estructura genética aumenta. En un extremo se encuentran las sociedades altamente sociales, fuertemente filopátricas y estructuradas por los niveles de parentesco, en las cuales la variación genética se encuentra marcadamente estructurada en el espacio (ej. ratas topo desnudas, Reeve et al. 1990, Faulkes et al. 1997). En el extremo opuesto, se encuentran las sociedades en las cuales todos los individuos se dispersan desde el sitio natal, por lo que no es evidente un patrón espacial del parentesco. Como se ha observado en el presente estudio sobre *C. talarum*, sin embargo, la estructuración del parentesco en estas sociedades puede estar presente y puede reflejarse en patrones de diferenciación genética entre co-específicos. Se espera que el grado en el cual la variación genética se encuentra distribuida dentro de las poblaciones sea afectado por la intensidad de de procesos tales como la deriva génica (Chesser et al. 1993) y, por

lo tanto, aun en las especies solitarias la distribución espacial de individuos emparentados podría influir sobre patrones y procesos de cambio evolutivo.

CAPITULO 2

VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN EL TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL DEL TUCO-TUCO DEL TALAR (CTENOMYS TALARUM): EL ROL DE LA DEMOGRAFÍA.

El presente capítulo ha sido publicado como: Cutrera, A.P., E.A. Lacey y C. Busch. 2006. Intraspecific variation in effective population size in talar tuco-tucos (*Ctenomys talarum*): the role of demography. *Journal of Mammalogy*. 00: 0000-0000.

AGRADECIMIENTOS: A Mati por su colaboración durante las tareas de campo, al grupo del Evolutionary Genetics DNA Lab (MVZ-UC Berkeley), en especial a Gab y a Rachel, por su asesoramiento constante en la etapa de trabajo en el laboratorio y a Marjorie Matocq, Jim Patton y dos revisores anónimos por mejorar el presente capítulo con comentarios y sugerencias que fueron de enorme ayuda.

*Variación intraespecífica en el tamaño efectivo poblacional del tuco-tuco del talar
(Ctenomys talarum): El rol de la demografía.*

INTRODUCCIÓN

El tamaño efectivo poblacional (N_e) es definido como el número de individuos en una población ideal que experimenta la misma magnitud de deriva génica que una población de tamaño real N (Wright 1931). Debido a su relación con la deriva génica, estimar N_e es un componente integral de aquellos estudios que intentan comprender los procesos que dan forma a la variación genética en poblaciones naturales. Numerosos factores pueden influir en el tamaño efectivo de una población, causando que éste difiera de su tamaño censal asociado. Para los estimadores demográficos, dichos factores incluyen fluctuaciones en el tamaño de la población, desviaciones de la proporción sexual 1:1 y varianzas en el éxito reproductivo individual (Frankham 1995, Frankham et al. 2002, Nunney y Elam 1994). Los estimadores genéticos, por su parte, se encuentran afectados no sólo por estos parámetros, sino también por el tamaño del vecindario (“neighborhood size”, ver Wright 1943, Slatkin y Barton 1989, Rousset 1997, 2000, Sumner et al. 2001), grado de subdivisión poblacional y cambios históricos en el tamaño de la población (Bouteiller y Perrin 2000, Dobson et al. 2004, Matocq et al. 2004). En general, los estimadores demográficos de N_e tienden a generar valores que son menores que los tamaños censales asociados, mientras que los estimadores genéticos de N_e tienden a ser sustancialmente mayores que los valores obtenidos por medio de censos (Bouteiller y Perrin 2000, Storz et al. 2002, Matocq et al. 2004).

Dada la variedad de factores que pueden influir en las estimaciones de N_e , identificar las causas de las diferencias entre N y N_e resulta un desafío (Schwartz et al. 1998, Crandall et al. 1999). Se considera que los atributos demográficos actuales de una población juegan un rol sustancial en la determinación del N_e (Nunney 1993, Nunney y Elam 1994, Nunney 1995). En este sentido, las comparaciones entre diferentes poblaciones de co-específicos proveen una herramienta muy útil para conocer las relaciones entre demografía actual y N_e (Foster et al. 1992, Foster y Endler 1999). A pesar de que numerosos estudios han estimado N_e para poblaciones naturales (e.g. Nozawa 1970, Bartley et al. 1992, Gerber y Templeton 1996), sólo pocos han utilizado un acercamiento explícitamente comparativo para examinar las interacciones entre demografía, estructura genética y tamaño efectivo poblacional (pero ver Begon et al. 1980, Husband y Barrett 1992, Bouteiller y Perrin 2000, Storz et al. 2002, Matocq 2004). Además, pocos estudios han explotado la existencia de variación intraespecífica en la estructura de las poblaciones con el fin de explorar las razones de las discrepancias evidentes entre estimadores demográficos y genéticos del N_e .

El tuco-tuco del talar (*Ctenomys talarum*) es un roedor subterráneo pequeño y solitario que exhibe una marcada variación inter-poblacional en aspectos de su demografía. Esta especie, como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, ha sido objeto de estudio por más de 2 décadas de investigación en aspectos de su comportamiento, ecología y biología poblacional (Busch et al. 1989, Antinuchi y Busch 1992, Vassallo et al. 1994, Busch et al. 2000, Zenuto et al. 2001). Estudios comparativos realizados a campo sobre *C. talarum* en dos poblaciones de esta especie de la Provincia de Buenos Aires (Mar de Cobo y Necochea) han revelado importantes diferencias

intraespecíficas en aspectos de su demografía (Busch et al. 1989, Malizia y Busch 1991, Malizia et al. 1991, Malizia et al. 1995, Malizia y Busch 1997, Zenuto et al. 1999a, 1999b), Zenuto et al. 2002b) que se espera afecten su N_e . Específicamente, una proporción sexual adulta más desviada hacia las hembras y una mayor varianza en el éxito reproductivo de los machos en la población de Mar de Cobo conducen a predecir que la razón N_e / N debería ser menor para esta población que para Necochea. Por lo tanto, en este segundo capítulo se pone a prueba esta predicción empleando estimadores del N_e tanto genéticos como demográficos. En particular, comparando los valores obtenidos entre sí y con las medidas censales, se estudiará como los estimadores de N_e varían entre las poblaciones de estudio y de acuerdo a las características de los sets de datos empleados para generar dichos estimadores. Estos análisis representan un aporte importante para comprender cuál es la influencia que tienen los parámetros demográficos sobre el tamaño efectivo poblacional y, por lo tanto, en la estructura genética de poblaciones naturales de vertebrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones de estudio.- Una detallada descripción de las características ambientales y demográficas de las poblaciones de estudio ya fue presentada en el capítulo 1. Las poblaciones de estudio, como ya se mencionó anteriormente, difieren marcadamente con respecto a la proporción sexual adulta y los patrones de competencia reproductiva entre machos, los cuales pueden a su vez influir sobre el N_e . Mientras que NC se caracteriza por un número aproximadamente igual de machos y de hembras adultos, la proporción sexual en Mar de Cobo se encuentra sesgada hacia las hembras en una relación cercana a 3 hembras adultas por cada macho adulto (Busch et al. 1989, Malizia y Busch 1991, Malizia y Busch 1997). Varias líneas de evidencia sugieren que el grado de poliginia es también más extremo en MC. En particular, el dimorfismo sexual es más pronunciado y el tamaño relativo de los testículos es menor en esta población que en NC (Zenuto et al. 1999b). Además, los machos de MC forman jerarquías de dominancia que determinan el acceso a las hembras receptivas; por el contrario, no se observan este tipo de jerarquías entre los machos de NC, sugiriendo que el acceso a las hembras es más equitativo en esta población (Zenuto et al. 2002b). Asumiendo que estas diferencias comportamentales impactan en la varianza del éxito reproductivo de los machos (Clutton-Brock 1989, Andersson 1994, Kruuk et al. 1999), entonces también podrían influir sobre los estimadores de N_e . En conjunto, estas diferencias demográficas conducen a predecir que la razón N_e / N debería ser mayor para NC que para MC (Nunney 1993, Nuney y Elam 1994).

Recolección de las muestras.- Todos los individuos adultos de *C. talarum* residentes en un área total de 1.0 ha (Mar de Cobo) o 2.0 ha (Necochea) fueron capturados entre abril y

noviembre de 2002. Los tamaños de las áreas de muestreo fueron elegidos para ser consistentes con estudios previos y actuales sobre la ecología y demografía de estas poblaciones. Para asegurarse de que todos los individuos presentes en las grillas fueran capturados, se empleó la metodología descrita en el capítulo 1.

Análisis de microsátélites.- Se analizaron la totalidad de las muestras de tejido colectadas de los adultos capturados en cada población de estudio con la misma metodología de laboratorio empleada en el capítulo 1, empleando los mismos 12 loci de microsátélites.

Los cálculos de frecuencias alélicas, análisis de desequilibrio por ligamiento y las pruebas de Hardy-Weinberg fueron realizados empleando el software GENEPOP 3.4 (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/index.htm>; Raymond y Rousset 1995). La frecuencia de alelos nulos fue estimada utilizando CERVUS (Marshall et al. 1998). Las comparaciones inter-poblacionales del número de alelos por locus y de la heterocigosis media observada fueron realizadas mediante la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas, como se implementa en el software STATISTICA 6.0 (Statsoft, Inc.). La posibilidad de eventos históricos de reducción del tamaño poblacional fue evaluada en tres formas. En primer lugar, se evaluó si las frecuencias alélicas observadas se desviaban significativamente de una distribución en forma de L (predominancia de alelos en bajas frecuencias) esperada en poblaciones que no han sufrido cuellos de botella en un pasado reciente. Este análisis fue llevado a cabo mediante el uso del software BOTTLENECK (Piry et al. 1999). En segundo lugar, se estimó el número de loci para los cuales la heterocigosis esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg (H_e) era mayor que la heterocigosis esperada bajo equilibrio deriva-mutación (H_{eq}). Este análisis se basa en el supuesto de que, en poblaciones que no han sufrido cuellos de botella, aproximadamente

50% de los loci deberían exhibir un exceso de heterocigosis ($H_e > H_{eq}$), mientras que el resto debería exhibir una insuficiencia de heterocigosis ($H_e < H_{eq}$) (Cornuet y Luikart 1996). Desviaciones significativas de dichos valores esperados fueron identificadas mediante la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas, implementada en el software BOTTLENECK (Piry et al. 1999). Por último, la proporción media número de alelos/rango de tamaño de alelos (M) fue calculada siguiendo los procedimientos de Garza y Williamson (2001). Debido a que los cuellos de botella pueden reducir el número de alelos sin afectar necesariamente el rango de tamaño de los mismos, valores pequeños de M deberían indicar reducciones históricas del tamaño poblacional. Se generaron intervalos de confianza para M utilizando las subrutinas de RESAMPLE y MONTE CARLO disponibles en POPTOOLS (Hood 2004, [http:// www.cse.csiro.au/poptools](http://www.cse.csiro.au/poptools)). En conjunto, estos tres procedimientos proveen un medio para detectar reducciones históricas en el tamaño de poblaciones naturales (Garza y Williamson 2001).

Estimadores genéticos de N_e .- En primer lugar, los estimadores genéticos del tamaño efectivo poblacional (N_{ge}) fueron generados utilizando la siguiente ecuación (Hartl y Clark 1997; ecuación 3.15), basada en la relación entre H y θ ($= 4N\mu$):

$$N_{ge} = H / 4\mu (1 - H) \quad (1)$$

en la cual H es el valor promedio de heterocigosis esperada de todos los loci de microsatélites empleados (calculada de acuerdo a Nei 1987) y μ es la tasa de mutación estimada (1×10^{-3} , Weber y Wong 1993, Bouteiller y Perrin 2000, Matocq 2004).

En segundo lugar, se empleó θ para obtener estimaciones de N_{ge} . Este procedimiento emplea datos de frecuencias alélicas. El patrón de mutación por pasos (“stepwise mutation model”, SMM) que se propone caracteriza a los loci de microsatélites (Valdés et al. 1993) sugiere que la información sobre la variación en el tamaño de los alelos puede emplearse para estudiar los determinantes históricos (e.g., cuellos de botella) del N_e . Por lo tanto, para explorar este aspecto del tamaño efectivo, también estimamos N_{ge} mediante el uso de las varianzas relativas en el tamaño de los alelos (Valdes et al. 1993), como es descrito por Hambuch y Lacey (2002). Este procedimiento se basa en el supuesto de que, para loci homólogos, la razón $\theta_{pop1} / \theta_{pop2}$ debería reflejar la diferencia relativa en N_e entre las dos poblaciones (Moran 1975, Kimmel y Chakraborty 1996). Los estimadores de θ basados en la heterocigosis esperada pueden ser altamente variables (Schwartz et al. 1998) y, por lo tanto, se utilizaron las subrutinas de RESAMPLE (100 iteraciones con reemplazo) y MONTE CARLO disponibles en el POPTOOLS (Hood 2004, [http:// www.cse.csiro.au/poptools](http://www.cse.csiro.au/poptools)) para generar intervalos de confianza del 95 % para las medidas de N_{ge} basadas en este estadístico. Aunque los estimadores de N_{ge} basados en θ son relativos, en vez de absolutos, reflejan determinantes tanto históricos como demográficos del tamaño efectivo poblacional. Las comparaciones de las varianzas específicas del tamaño de los alelos por locus y de los estimadores por locus del N_e relativo fueron realizadas mediante la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas, como se implementa en el STATISTICA 6.0 (Statsoft, Inc.).

Estimadores demográficos de N_e .- Los estimadores demográficos del tamaño efectivo poblacional (N_{re}) fueron generados utilizando la ecuación de Nunney (1993):

$$N_{re} = [4r(1-r)NT] / \{[A_m(1-r) + A_f r] - (2r/b_f) + [I_{bm}(1-r) + I_{bf}r] + [A_m I_{Am}(1-r) + A_f I_{Af}r]\} \quad (2)$$

en la cual r = proporción sexual adulta, T = tiempo generacional, A = promedio de vida por sexo, b_f = fecundidad promedio de las hembras, I_{bf} = la varianza estandarizada del éxito reproductivo de cada sexo (varianza/media²) y I_{Af} = varianza en el promedio de vida de cada sexo. El tiempo generacional fue estimado como $T = M - 1 + A$, donde M = tiempo de maduración (Nunney y Elam 1994). Este procedimiento asume que los animales alcanzan la madurez sexual a la edad de 1 año, lo cual es apropiado para *C. talarum* (Malizia y Busch 1991). Este modelo es relativamente robusto a la variación en el tamaño poblacional de adultos y a la variación en la fecundidad y la supervivencia relacionada con la edad (Nunney 1993, Nunney y Elam 1994), lo cual incrementa su utilidad para comparaciones inter-poblacionales de N_{re}/N . Los parámetros enfatizados en este análisis – proporción sexual adulta y sistema de apareamiento – han sido identificados como importantes determinantes del N_e (Frankham 1995, Frankham et al. 2002). Por otro lado, ambos atributos demográficos han demostrado ser sustancialmente diferentes entre las poblaciones de estudio, lo que hace a este modelo particularmente apropiado para realizar análisis comparativos del tamaño poblacional efectivo demográfico en *C. talarum*.

Los datos sobre proporción sexual adulta en cada población de estudio fueron obtenidos de Busch y col. (1989) y Malizia y col. (1997). Típicamente, los animales de MC y NC comienzan a aparearse cuando tienen aproximadamente 1 año de vida (Malizia

y Busch 1991). Los datos sobre el promedio de vida fueron obtenidos de Pearson y col. (1968) y Busch y col. (1989). Debido a que no se reportan en dichos trabajos diferencias en longevidad entre los sexos, se empleó para este estudio el mismo estimador del promedio de vida para ambos sexos; el supuesto de que la longevidad de machos y hembras es comparable en *C. talarum* no debería sesgar sistemáticamente los estimadores de N_{re} a menos que los patrones de supervivencia difirieran entre las poblaciones de estudio. Debido a que Busch y col. (1989) presentan información sobre la longevidad de los tuco-tucos de MC únicamente, dicha estimación fue utilizada para ambas poblaciones. Este procedimiento debería ser conservador ya que se espera que la mortalidad de machos se incremente con el grado de poliginia (Daly y Wilson 1983); como resultado, nuestros análisis podrían subestimar las diferencias en N_{re}/N entre las poblaciones de estudio. Los estimadores de fecundidad de las hembras y de varianza en el éxito reproductivo de las mismas en la población de MC fueron obtenidos del trabajo de Zenuto y col. (2002a); una vez más, debido a que los mismos datos no se encuentran disponibles para NC, las mismas estimaciones fueron utilizadas para ambas poblaciones de estudio. Las estimaciones de la varianza en el éxito reproductivo de los machos para cada población fueron obtenidas a partir de análisis de paternidad mediante el uso de la técnica de ADN fingerprinting llevados a cabo por Zenuto y col. (1999a).

RESULTADOS

Variabilidad de microsatélites.- El tamaño censal (número total de animales capturados) fue de 72 para MC y 62 para NC. No se detectó evidencia de desequilibrio por ligamiento entre los loci analizados (todos los $p > 0,05$). Luego de la corrección de Bonferroni (Rice 1989), se detectaron desvíos significativos del equilibrio Hardy-Weinberg en 4 loci (Tabla 1). La heterocigosis obrevada para uno de los loci, Soc 5, se desvió significativamente de lo esperado en ambas poblaciones de estudio. Por el contrario, el resto de los desvíos significativos del equilibrio Hardy-Weinberg se limitaron a una única población por locus (MC: Hai 3; NC: Soc 1, Soc 7). Cada uno de estos loci fue excluido de los análisis posteriores. A pesar de que los 3 loci restantes se caracterizaron por presentar frecuencias de alelos nulos superiores a +0.02 (Marshall et al. 1998) en una o en ambas poblaciones, ninguna de las muestras falló en la amplificación de estos loci. Además, comparaciones realizadas de 22 pares de individuos cuyas relaciones progenitor-descendencia habían sido identificadas independientemente por Zenuto y col. (1999a) no revelaron ninguna discordancia genotípica. En conjunto, estos datos no proveen evidencia directa de la presencia de alelos nulos (Callen et al. 1993). En consecuencia, estos loci fueron empleados en nuestros análisis, dando lugar a un set final de datos que consistió en genotipos de 8 loci de microsatélites.

La variabilidad genética fue mayor en NC que en MC. El número de alelos por locus varió entre 2 y 6 en MC y entre 2 y 8 en Necochea (Tabla 1). Aunque todos los loci fueron variables, se verificó una tendencia significativa en la que la variación alelica fue mayor en NC (Wilcoxon de 2 colas, $T = 0,0$, $n = 8$, $p = 0,043$). El número de loci

Tabla 1.- Resumen de la variación de loci de microsatélites en poblaciones de *C. talarum* de Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Provincia de Buenos Aires, Argentina. Un total de 72 adultos de MC y 62 adultos de NC fueron examinados en la totalidad de los loci. Se indica el número de alelos por locus, al igual que las heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o). Se presentan además los resultados de los tests de Hardy-Weinberg y las frecuencias estimadas de alelos nulos en cada locus.

Locus	Población	# de alelos	H_e	H_o	H-W valor de p	Frecuencia de alelos nulos
Soc 1	MC	2	0.460	0.409	0.256	0.068
	NC	8	0.647	0.590	0.001 *	0.118
Soc 2	MC	4	0.137	0.144	1.000	-0.028
	NC	5	0.390	0.471	0.929	-0.120
Soc 3	MC	6	0.611	0.689	0.165	-0.062
	NC	6	0.546	0.547	0.729	0.014
Soc 5	MC	3	0.600	0.494	0.001 *	0.119
	NC	9	0.790	0.612	0.001 *	0.145
Soc 6	MC	2	0.040	0.040	0.033	0.251
	NC	7	0.490	0.468	0.975	0.009
Soc 7	MC	3	0.408	0.381	0.018	0.051
	NC	9	0.831	0.413	0.001 *	0.319

Tabla 1. Continuación.

Locus	Población	# de alelos	He	Ho	H-W valor de p	Frecuencia de alelos nulos
Soc 8	MC	5	0.500	0.432	0.006	0.168
	NC	5	0.760	0.667	0.028	0.065
Hai 3	MC	4	0.477	0.191	0.001 *	0.442
	NC	4	0.460	0.404	0.738	0.079
Hai 4	MC	5	0.567	0.539	0.011	0.050
	NC	7	0.620	0.723	0.350	-0.081
Hai 9	MC	5	0.400	0.480	0.072	-0.053
	NC	6	0.692	0.865	0.005	-0.110
Hai 11	MC	3	0.284	0.310	0.442	-0.050
	NC	6	0.814	0.767	0.117	0.012
Hai 12	MC	2	0.490	0.573	0.275	-0.068
	NC	2	0.340	0.319	0.672	0.012

* Desvío significativo de los esperado según el equilibrio Hardy-Weinberg; corrección de Bonferroni $\alpha = 0.004$.

polimórficos (criterio del 95%) fue también mayor para esta población (NC: 8/8; MC: 7/8 loci). En forma concordante, la heterocigosis observada fue mayor para NC en 6 de los 8 loci considerados; aunque dicha tendencia no resultó significativa (Wilcoxon de 2 colas, $T = 5,0$, $n = 8$, $p = 0,069$). Esto sugiere que la variabilidad genotípica es mayor en la población de NC. No se detectó evidencia significativa de que los tamaños de los alelos de NC fueran mayores que los de MC (Wilcoxon de 2 colas, $T = 11,0$, $n = 8$, $p = 0,327$), sugiriendo que las diferencias observadas en la variabilidad no se deben a desvíos consistentes en el tamaño de los microsatélites.

Reducciones históricas en el tamaño poblacional.- Los histogramas de distribución de frecuencias alélicas fueron similares en ambas poblaciones de estudio. En aquellas poblaciones que han experimentado cuellos de botella recientes, el número de alelos de frecuencias intermedias (0,11-0,90) debería exceder el número de alelos a bajas frecuencias ($< 0,10$; Luikart et al. 1998). Las frecuencias alélicas en las poblaciones de este estudio no coincidieron con este escenario. En NC, 52,2% de los 44 alelos detectados se encontraba en frecuencias $< 0,10$; para MC, este valor fue de 61,1% de los 32 alelos detectados en esta población. De acuerdo con estos resultados, los análisis empleando BOTTLENECK indicaron que ninguno de los histogramas de frecuencias alélicas difirió significativamente de la distribución en forma de L característica de las poblaciones que no han experimentado un cuello de botella reciente. Para NC, el número de loci en los cuales $H_e > H_{eq}$ no difirió significativamente del número esperado bajo condiciones de equilibrio (Wilcoxon, $p = 0,074$, supuesto: SMM), lo cual no provee evidencia directa de reducciones históricas en el tamaño poblacional. Por el contrario, en MC, el número de loci para los cuales $H_e > H_{eq}$ fue significativamente mayor que lo esperado en

condiciones de equilibrio (Wilcoxon, $p = 0,020$, supuesto: SMM), lo cual podría indicar un evento de cuello de botella. Sin embargo, las estimaciones medias (± 1 SD) de M no difirieron significativamente entre las poblaciones (NC: $0,56 \pm 0,31$; MC: $0,61 \pm 0,25$, Wilcoxon de 2 colas, $T = 0,0$, $n = 8$, $p = 0,753$) y aunque los valores promedio de M resultaron menores que los valores límites indicadores de un cuello de botella reciente (Garza y Williamson 2001), los intervalos de confianza del 95% para cada media (NC: $0,387-0,767$; MC: $0,45-0,765$) incluyeron a dicho valor. Por lo tanto, 2 de los 3 procedimientos utilizados para detectar reducciones históricas no revelaron evidencia significativa de cuellos de botella en ninguna de las poblaciones estudiadas.

Estimadores de N_e .- La heterocigosis esperada promedio de los 8 loci examinados fue de 0,58 para NC y de 0,42 para MC. Basados en estos valores, los estimadores genéticos absolutos del tamaño efectivo poblacional (N_{ge}) fueron mayores para NC (181 ± 56 ; 95 % I.C. = $73 - 261$) que para MC (345 ± 71 ; 95 % I.C. = $224 - 593$; Tabla 2). Los estimadores de N_{ge} basados en la varianza en el tamaño de loci de microsatélites revelaron la misma tendencia. Dicha varianza fue mayor para NC en 7 de los 8 loci examinados (Wilcoxon de 2 colas, $T = 3$, $n = 8$, $p = 0,036$), al igual que la razón entre los tamaños poblacionales efectivos genéticos relativos ($N_{ge}^{MC} : N_{ge}^{NC} = 1 : 5,3$).

Los resultados de los análisis demográficos de N_e (N_{re}) fueron similares. Tanto las proporciones sexuales de individuos adultos registradas en este estudio (Necochea: 1M:1H; Mar de Cobo: 1M:1.6H) como los datos publicados (Busch et al. 1989; Malizia et al. 1991) indicaron que la población de MC se encuentra más sesgada hacia las hembras; debido a que los datos publicados previamente se basan en tamaños muestrales mayores y a que estos se basan en muestreos de múltiples años, dichas proporciones

Tabla 2.- Valores de los parámetros utilizados para estimar N_{re} en las poblaciones de *C. talarum* de Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC). Las definiciones de los parámetros se realizaron de acuerdo a Nunney (1993). Los detalles de los procedimientos empleados para estimar cada uno de los parámetros se encuentran en el texto.

Parámetro	Estimador	Valor población-específico	
		MC	NC
Tamaño censal (# adultos)	N	72	62
Proporción sexual adulta (macho: hembra)	r	0.37	0.50
Tiempo generacional (años)	T	1.33	1.33
Promedio de vida adulta (años)	A	1.75	1.75
Variación de promedio de vida (varianza estandarizada)	I_a	0.004	0.004
Fecundidad de hembras (# de descendientes promedio)	b_f	4.55	4.55
Varianza del éxito reproductivo de hembras (varianza estandarizada)	I_{bf}	0.08	0.08
Varianza del éxito reproductivo del macho (varianza estandarizada)	I_{bm}	1.83	1.07

Tiempo de maduración (años)	M	0.58	0.58
-----------------------------	---	------	------

(Necochea: 1M:1H; Mar de Cobo: 1M:3H) fueron empleadas en el cálculo del N_{re} (Tabla 3). Basados en los análisis de paternidad de Zenuto y col. (1999a), se estimó la varianza estandarizada en el éxito reproductivo de los machos (NC: 1,07; MC: 1,83). Utilizando el promedio de vida adulta (A) de 1,8 años y el tiempo de maduración sexual de 1 año, se estimó el tiempo generacional (T) en las poblaciones de estudio en 1,3 años (Tabla 3). Al aplicar estos valores a la ecuación 1, se reveló que el N_{re} fue mayor en NC que en MC (Tabla 2).

Los estimadores de N_e variaron claramente con el tipo de datos empleados en la cuantificación del tamaño efectivo poblacional. En ambas poblaciones, los valores de N_{ge} fueron mayores que los de N , mientras que los estimadores de N_{re} fueron menores que los de N (Tabla 2). Entre las poblaciones, los estimadores de N_e/N fueron consistentemente mayores para NC, aunque la magnitud de dicha diferencia varió con el set de datos empleados. Específicamente, mientras que N_{re}/N fue 1.4 veces mayor para NC que para MC, N_{ge}/N fue 2.2 veces mayor para NC (Tabla 2). Por lo tanto, las diferencias inter-poblacionales en N_e/N fueron mayores para los estimadores genéticos del tamaño efectivo poblacional.

Tabla 3.- Tamaños poblacionales censales y efectivos estimados para *C. talarum* en Mar de Cobo (MC) and Necochea (NC). Se presentan los estimadores del tamaño efectivo poblacional demográficos (N_{re}) y los genéticos (N_{ge}), al igual que las proporciones del tamaño efectivo poblacional demográfico/ tamaño censal (N_{re}/N) y el tamaño efectivo poblacional genético/tamaño censal (N_{ge}/N).

Parámetro	Estimador	Valor poblacional-específico	
		MC	NC
Tamaño censal adulto (# adultos)	N	72	62
Tamaño poblacional efectivo demografico	N_{re}	32	39
Tamaño poblacional efectivo genético	N_{ge}	181	345
Proporción del tamaño poblacional efectivo demográfico/tamaño censal	N_{re}/N	0.4	0.6
Proporción del tamaño Poblacional efectivo genético/tamaño censal	N_{ge}/N	2.5	5.6

DISCUSIÓN

Todos los estimadores de N_e examinados apoyan la predicción de que N_e/N es mayor para NC que para MC. La variación alélica entre los loci de microsatélites estudiados es mayor en NC que en MC, al igual que la heterocigosis de dichos loci. Estas diferencias en la variabilidad no se encontraron asociadas a desvíos detectables en la estructura de los microsatélites (e.g., tamaño de los alelos), sugiriendo que, por el contrario, éstas reflejan diferencias demográficas actuales o históricas entre las poblaciones de estudio. Debido a que los estimadores de N_{re} y N_{ge} fueron generados utilizando diferentes sets de datos, esto provee una evidencia convincente de que la proporción N_e/N realmente difiere entre las poblaciones de estudio. Al mismo tiempo, la magnitud de dichas estimaciones difiere claramente, siendo los estimadores de N_{re} menores y los de N_{ge} sustancialmente mayores que los tamaños censales. En parte, estas diferencias pueden reflejar el uso de sets de datos y algoritmos estadísticos diferentes para estimar N_e . Las variables que influyen sobre los estimadores de N_e genéticos versus los demográficos no son idénticas y, por lo tanto, las discrepancias entre N , N_{ge} y N_{re} podrían indicar el grado en el cual diferentes variables afectan a la población. Por lo tanto, además de poner a prueba predicciones sobre los efectos de las diferencias conocidas en la estructura poblacional, el uso de múltiples estimadores de N_e puede generar nuevos aportes sobre cuales son las variables demográficas actuales e históricas que determinan el tamaño poblacional efectivo.

Debido a que los mismos valores de tiempo generacional, promedio de vida y varianza en el éxito reproductivo de las hembras fueron empleados para MC y NC, la

diferencia en la estimación de N_{re}/N para estas poblaciones se debe principalmente a la variación en el éxito reproductivo de los adultos de ambos sexos y a los patrones de éxito reproductivo de los machos. Como resultado, estos estimadores podrían no capturar completamente las diferencias en el tamaño poblacional efectivo demográfico entre las poblaciones de estudio. Sin embargo, la proporción sexual y la varianza en el éxito reproductivo se encuentran entre los determinantes más importantes del N_e (Frankham 1995; Frankham et al. 2002) y, por lo tanto, enfatizar dichas variables es apropiado. Además, resulta más probable que estos atributos varíen significativamente entre poblaciones de co-específicos que parámetros básicos de historia de vida, como son el tiempo generacional y el promedio de vida (Charnov 1990). Por último, la variación en el éxito reproductivo de los machos típicamente excede a la de las hembras, en particular en una especie poliginica (Clutton-Brock 1989), sugiriendo que el éxito reproductivo de las hembras debería jugar un rol menos importante en la determinación del N_e . En consecuencia, mientras que los estimadores de N_{re} presentados en este estudio pueden no representar medidas completas del tamaño poblacional efectivo demográfico, constituyen una medida de información adecuada sobre los factores que afectan N_e/N .

Diferencias intraespecíficas en N_e/N .- Los factores demográficos que influyen sobre el N_e incluyen fluctuaciones temporales en el tamaño poblacional promedio, desviaciones de la proporción sexual 1:1 y variación en el éxito reproductivo individual (Wright 1938, Frankham et al. 2002). Para aquellas poblaciones que varían temporalmente en tamaño, se espera que el N_e se aproxime a la media armónica del número de adultos por generación (Frankham 1995). Debido a que los datos de este estudio fueron obtenidos en el transcurso de 10 meses, no fue posible evaluar cambios en el tamaño poblacional a

través de múltiples años (generaciones). Entonces, los estimadores de N_e obtenidos en este estudio representan valores puntuales que pueden estar sujetos a variación en el tiempo. Sin embargo, las densidades de las poblaciones de los sitios de estudio han permanecido relativamente constantes (ver Malizia et al. 1995, Capítulo 1) desde que comenzó la recolección de datos sobre Mar de Cobo (1985: Busch et al. 1989) y Necochea (1987: Malizia et al. 1991) sugiriendo que la variación temporal en el tamaño poblacional no ha contribuido sustancialmente a diferencias intraespecíficas observadas en N_e/N .

Por el contrario, la proporción sexual adulta y la varianza en el éxito reproductivo de los machos parecen tener una marcada influencia en el tamaño efectivo de las poblaciones de estudio. Se espera que los desvíos de la proporción sexual 1:1 reduzcan el N_e , lo mismo que una variación sustancial en el número de descendientes por individuo (Wright 1969, Frankham 1995, Frankham et al. 2002). Ambas situaciones son típicas de los sistemas de apareamiento poliginicos, en los cuales la reproducción es dominada por un número limitado de machos adultos en la población (Clutton-Brock 1989). En consecuencia, se espera que cuanto más extremo el grado de poliginia, mayor sea la reducción de N_e con respecto a N . Se ha reportado variación intraespecífica en el grado de poliginia en varias especies de roedores, incluyendo a la rata topo común (*Cryptomys hottentotus*; Bishop et al. 2004) y a los voles de la pradera (*Microtus ochrogaster*; Roberts et al. 1998). Con respecto a las poblaciones de este estudio, los datos genéticos y de comportamiento indican que la poliginia es más pronunciada en la población de Mar de Cobo que en la de Necochea (Zenuto et al. 1999a, 1999b, Zenuto et al. 2002b). Las

diferencias intraespecíficas en N_e/N reportadas en este trabajo son consistentes con el grado aparentemente mayor de poliginia en Mar de Cobo.

Las diferencias intraespecíficas en N_e/N potencialmente tienen profundas implicancias en los patrones de estructura genética y cambio evolutivo. Debido a que la diversidad genética debería declinar a una tasa de $1/(2N_e)$, las diferencias en N_e pueden resultar en niveles marcadamente distintos de variación genética dentro de poblaciones de la misma especie (Schwartz et al. 1998, Crandall et al. 1999). En forma concordante, a medida que el N_e decrece, el grado en el cual una población es influida por procesos aleatorios como la deriva génica aumenta (Wright 1969). Como resultado, los procesos evolutivos que conducen al cambio genético en poblaciones caracterizadas por N_e s pequeños podrían ser muy diferentes de los experimentados por co-específicos en poblaciones con tamaños efectivos mayores. Como este estudio sugiere, los parámetros demográficos como la proporción sexual y la varianza en el éxito reproductivo pueden ser determinantes importantes de las diferencias intraespecíficas en N_e/N . La variación intraespecífica en la proporción sexual y en el sistema de apareamiento es común entre los vertebrados (Emlen y Oring 1977, Foster and Endler 1999) y, por lo tanto, diferencias en el N_e mediadas por la demografía pueden constituir importantes determinantes de las tasas y patrones de cambio evolutivo en este grupo de animales.

Diferencias entre estimadores de N_e .- Mientras que los estimadores de N_{re} pueden ser influidos por la proporción sexual adulta, el promedio de vida y la varianza en el éxito reproductivo (Nunney 1993), los estimadores de N_{ge} no solo están afectados por estos parámetros sino también por factores como el tamaño del vecindario (“neighborhood size”, ver Sumner et al. 2001), grado de subdivisión poblacional y severidad en los

eventos históricos de reducción poblacional (Bouteiller y Perrin, 2002, Storz et al. 2002, Matocq 2004). Como resultado, las discrepancias entre N , N_{re} y N_{ge} pueden brindar información importante con respecto a los determinantes de la estructura genética de poblaciones naturales de vertebrados. Para ambas poblaciones de estudio, los estimadores de N_{ge} fueron sustancialmente mayores que los estimadores de N_{re} o N , lo que indica que el tamaño del vecindario, la subdivisión y los cuellos de botella históricos podrían ser componentes significativos de la estructura poblacional de *C. talarum*. Debido a que la magnitud de dichas diferencias varía entre las poblaciones de estudio, los análisis comparativos de Mar de Cobo y Necochea pueden proveer información sobre la importancia de los factores mencionados en la determinación del tamaño poblacional en esta especie.

Las reducciones históricas en el tamaño poblacional pueden dar lugar a estimadores de N_{ge} pequeños en comparación con los actuales tamaños censales (Storz et al. 2002). Se considera que los eventos históricos han contribuido significativamente en los patrones de variabilidad genética de varias especies de *Ctenomys*. Por ejemplo, reducciones históricas en el tamaño poblacional han estado implicadas en el mantenimiento del inusual polimorfismo de color del pelaje de *C. rionegrensis* (Wlasiuk et al. 2003), en los bajos niveles de variabilidad detectados en *C. lami* (El Jundi and Freitas 2004) y en la ocurrencia de marcadas diferencias interespecíficas en la variabilidad genética de *C. haigi* y *C. sociabilis* (Lacey 2001). Existe además evidencia directa de las consecuencias genéticas de la reducción en el tamaño poblacional, la cual fue provista por Gallardo y Köhler (1994) and Gallardo y col. (1995), quienes reportaron un marcado descenso en la variación genética de *C. maulinus brunneus* luego de una erupción volcánica en el sur de

Chile, que resultó en una reducción de un 91% en el tamaño poblacional de esta especie. En conjunto, estos estudios sugieren que los factores históricos pueden contribuir sustancialmente en los actuales estimadores de N_e en al menos algunas especies de *Ctenomys*.

Los análisis realizados en este trabajo, sin embargo, no revelaron evidencia de recientes reducciones en el tamaño poblacional par alas poblaciones de *C. talarum* en Mar de Cobo y en Necochea. Aun más importante, los análisis no sugieren que dichas poblaciones hayan sido diferencialmente afectadas por eventos históricos. Aunque para Mar de Cobo se verificó un exceso de loci con heterocigosis mayores a las esperadas, los estimadores de M no difirieron significativamente entre ambas poblaciones y no se encontraron significativamente por debajo del valor límite indicador de un cuello de botella. Debido a que se espera que M recoja evidencia de reducciones históricas en el tamaño poblacional a través de períodos más prolongados que los análisis basados en frecuencias alélicas (Garza and Williamson 2001), este estadístico podría ser particularmente informativo respecto de las historias comparativas de las poblaciones de estudio. Entonces, aunque no se puede rechazar la posibilidad de que una o ambas de las poblaciones hayan estado sujetas a antiguas reducciones de su tamaño poblacional, análisis específicos con microsatélites (el mismo marcador empleado para estimar N_{ge}) no sugieren que el mayor valor de N_{ge}/N obtenido para Necochea se deba a diferencias inter poblacionales en la severidad de un cuello de botella reciente.

Las poblaciones locales que se encuentran subdivididas en múltiples unidades reproductivas pueden dar lugar a estimadores de N_{ge} mayores que N (Sugg et al. 1996, Dobson et al. 1998, Dobson et al. 2004, Matocq 2004). Como se desarrolló en el

Capítulo 1 de esta tesis, análisis previos de microsatélites han revelado que la estructura espacial genética es más pronunciada en Mar de Cobo que en Necochea, lo cual sugiere que, si la subestructura poblacional es uno de los determinantes principales del N_e en *C. talarum*, entonces el valor de N_{ge}/N podría encontrarse sobreestimado con respecto al valor de Necochea. En este sentido, los estimadores de N_{ge}/N para las poblaciones de estudio deberían ser más similares entre sí que los estimadores de N_{re}/N . Por el contrario, los análisis indican que los estimadores demográficos de N_e fueron más similares entre sí que los genéticos. Por lo tanto, mientras que la subdivisión poblacional puede haber conducido a valores aumentados de N_{ge} en MC, este factor por sí solo no parece capaz de explicar la gran discrepancia entre los estimadores genéticos de N_e (versus los demográficos) y los tamaños censales de ambas poblaciones de estudio.

Por último, el tamaño del vecindario y los movimientos inter-poblacionales pueden haber contribuido a que el N_{ge} exceda al N . Si el tamaño del vecindario, definido como la extensión espacial de un demo (Sumner et al. 2001, Matocq 2004), excede el área de muestreo utilizada para determinar el tamaño censal, entonces el conjunto de individuos que contribuyen a la variabilidad genética en la población será mayor que aquel que se ha muestreado (Storz et al. 2002), lo que conduce potencialmente a estimadores de N_e mayores de lo esperado. Aunque los tamaños de vecindario para las poblaciones de estudio no son conocidos, los análisis genéticos indican que la subestructura poblacional es más pronunciada en Mar de Cobo (ver Capítulo 1), lo cual podría reflejar movimientos más limitados de los individuos y, por lo tanto, un tamaño de vecindario menor comparado con el de Necochea. Esta posible diferencia podría, a su vez, contribuir al tamaño relativamente menor de N_{ge} obtenido para Mar de Cobo. Los estudios de

marcado-recaptura y de radiotelemetría realizados en Necochea y Mar de Cobo como parte de esta tesis, brindan información respecto de los patrones de dispersión y los tamaños de vecindario para estas poblaciones. Cuando estos análisis son combinados con caracterizaciones moleculares más extensivas de la historia poblacional de *C. talarum*, brindan información importante sobre los roles de factores demográficos actuales e históricos en la determinación del tamaño efectivo poblacional.

CAPITULO 3

VARIACIÓN DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) DEL TUCO-TUCO DEL TALAR (CTENOMYS TALARUM): LA INFLUENCIA DE LA DEMOGRAFÍA SOBRE LA SELECCIÓN.

El presente capítulo ha sido aceptado para su publicación como: Cutrera, A.P. y E.A. Lacey. Major histocompatibility complex variation in talar tuco-tucos: the influence of demography on selection. *Journal of Mammalogy*. En prensa.

AGRADECIMIENTOS: A Mati por su gran ayuda durante las tareas de campo, al grupo del Evolutionary Genetics DNA Lab (MVZ-UC Berkeley), en especial a Gab y Bridget, por su asesoramiento y por el entrenamiento brindado en las técnicas de secuenciación y clonado; y a Diogo Meyer, Enrique Lessa y dos revisores anónimos por mejorar el presente capítulo con comentarios y sugerencias sobre los tratamientos estadísticos empleados.

Variación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) del tuco-tuco del talar (Ctenomys talarum): La influencia de la demografía sobre la selección.

INTRODUCCION

Comprender los factores que dan forma a la variación genética es uno de los objetivos fundamentales del campo de la biología evolutiva (Lewontin 1974, Gillespie 1991, Ford 2002). Para loci no funcionales, es decir, selectivamente neutrales, se considera que el flujo génico y la deriva son las fuerzas principales que dan afectan los niveles de diferenciación genética (Hartl y Clark 1997, Avise 2004). Para aquellos loci que son funcionales, la selección también puede contribuir a dar forma a los patrones de variabilidad observados (Meyers y Bull 2002, Storz y Nachman 2003). En conjunto, los tres procesos pueden verse influidos por factores demográficos (Nunney y Elam 1994, Dobson et al. 2004, Penn y Potts 1999; revisado por Endler 1992, Avise 2004), sugiriendo que la estructura poblacional es un determinante crítico de la estructura genética. Mientras que numerosos estudios en vertebrados han examinado los patrones de diferenciación genética en loci presumiblemente neutros (Ej., Sugg et al. 1996, Gompper et al. 1998, Matocq et al. 2000, Storz et al. 2002; pero ver Nachman et al. 1996), es considerablemente menor la cantidad de datos disponibles sobre loci que se encuentran sujetos a selección positiva (Storz y Nachman 2003). Como resultado, las relaciones entre demografía, selección diversificadora y estructura genética permanecen relativamente poco exploradas en poblaciones naturales de vertebrados (Meyers y Bull 2002).

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC son sus siglas en inglés) consiste en un grupo de genes cercanamente ligados y constituye el componente genético más

importante del sistema inmunitario de mamíferos (Klein 1986). El MHC codifica para glicoproteínas de la superficie celular que se unen a antígenos derivados de patógenos o parásitos y los presentan a los linfocitos T, los cuales disparan la respuesta inmune correspondiente. Se pueden distinguir dos grandes grupos de genes de MHC:

- ✓ Los genes de la clase I juegan un rol esencial en la defensa inmune frente a patógenos intracelulares, por medio de la unión a péptidos que derivan principalmente de proteínas virales y de células cancerosas infectadas. Estos genes se expresan en la superficie de todas las células somáticas nucleadas (Sommer 2005).
- ✓ Por el contrario, los genes de la clase II se encuentran involucrados predominantemente en el monitoreo del ambiente extracelular, mediante la presentación a las células T de péptidos principalmente provenientes de parásitos (ej., bacterias, nematodos, cestodos, Klein y Horejsi 1997; Dengjel et al. 2005). Estos genes se expresan fundamentalmente en la superficie de las células presentadoras de antígenos pertenecientes al sistema inmune, como las células B y los macrófagos.

Los genes del MHC proveen un sistema ideal para examinar el impacto de la demografía sobre selección y variación genética. Además de estar sujetos a selección balanceadora (Klein et al. 1993, Takahata et al. 1992; pero ver Satta et al. 1994), estos loci se encuentran relativamente bien estudiados en cuanto a su rol en la respuesta inmune de vertebrados (Apanius et al. 1997, Edwards y Hedrick 1998, Patterson et al. 1998). Se postula que las principales fuerzas selectivas que afectan a estos genes son la exposición a patógenos y la depresión por endogamia (Hughes et al. 1994, Penn y Potts

1999, Bernatchez y Landry 2003). Por un lado, la variabilidad de las moléculas de MHC se encuentra correlacionada con la diversidad de receptores de linfocitos T, lo cual a su vez determina la resistencia de un organismo a enfermedades y parásitos, y en consecuencia puede influir sobre la probabilidad de supervivencia a largo plazo de una población (Paterson et al. 1998; Hedrick et al. 2001a, 2001b; Langefors et al. 2001). Por otro lado, los genes del MHC constituyen regiones hipervariables que podrían funcionar como marcadores de parentesco, disminuyendo de esta manera las probabilidades de apareamientos entre parientes cercanos (Potts y Wakeland 1993; Brown y Eklund 1994).

Se espera que la exposición a patógenos se incremente con el aumento de la densidad poblacional del hospedador, particularmente para aquellos patógenos que son transmitidos directamente entre hospedadores (Anderson y May 1979, Coté y Poulin 1995, Arneberg 2002). Como ya se discutió en el primer capítulo de esta tesis, el nivel de parentesco entre potenciales parejas reproductivas es influido fundamentalmente por la distribución espacial de los individuos relacionados (Emlen 1991, Solomon 2003, Matocq y Lacey 2004) y, de acuerdo a ello, la probabilidad de endogamia debería incrementarse a medida que el grado de estructura genética dentro de la población aumenta (Keane 1990, Koenig et al. 1996). Dadas las relaciones expuestas, la intensidad de selección y la diversidad en genes del MHC deberían variar con la demografía.

Mientras que numerosos estudios han examinado la variación en el complejo de MHC en poblaciones que han sufrido cambios históricos pronunciados (ej., cuellos de botella severos) debidos a factores antropogénicos (ej. Hoelzel et al., 1999, Hedrick et al. 1999, 2000, van der Walt et al. 2001, van Den Bussche et al. 2002, Lukas et al. 2004, Weber et al. 2004), pocos trabajos han explorado los efectos de la demografía sobre la variabilidad

del MHC en poblaciones que no han experimentado dichos eventos. Entre los estudios, que han examinado la variación del MHC en poblaciones no sujetas a disturbio humano, análisis recientes en tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae) y en ratas topo africanas (Rodentia: Batiergidae) sugieren que la estructura social es un importante correlato de la selección que actúa sobre los loci de este complejo (Hambuch y Lacey 2002, Kundu y Faulkes 2003). La densidad poblacional y el grado de filopatría son componentes fundamentales de la estructura social (Travis et al. 1995, Maher y Lott 2000, Solomon 2003) y, por lo tanto, las comparaciones interespecíficas mencionadas proveen interesantes sistemas para evaluar los efectos de la demografía sobre la variación del MHC. Sin embargo, idealmente, los esfuerzos por comprender el impacto de la densidad y del grado de filopatría en genes del MHC deberían explotar diferencias intraespecíficas en dichos parámetros, evitando de esta manera, los efectos de otras diferencias interespecíficas, relacionadas con aspectos del comportamiento, de la estructura poblacional y de patrones asociados de endogamia y exposición a patógenos.

En los dos primeros capítulos de esta tesis, se examinaron las relaciones entre demografía, variabilidad genética neutral y estructura genética en dos poblaciones del roedor subterráneo *Ctenomys talarum*. Este capítulo da inicio a la segunda sección de esta tesis, donde se indaga sobre la interacción entre factores demográficos, estructura genética, los patrones de evolución de y la intensidad de selección sobre los loci de MHC. Específicamente, en este tercer capítulo, se comparan los patrones de variabilidad genética en las dos poblaciones de estudio de *Ctenomys talarum*, empleadas para los análisis de los capítulos 1 y 2, con el fin de explorar los efectos de la demografía sobre la selección que opera sobre la variabilidad del MHC. Como ya fuera mencionado, las

poblaciones de Mar de Cobo difieren significativamente en su densidad poblacional y, como fuera detallado en el primer capítulo de esta tesis, en el grado de estructuración espacial del parentesco genético, lo cual provee una oportunidad ideal para comprender las relaciones entre estas variables, selección y estructura genética en loci del MHC. En particular, se pondrá a prueba la predicción de que la mayor densidad y el mayor nivel de endogamia verificados en la población de Mar de Cobo se encuentran asociados con una más alta variabilidad y mayor intensidad de selección en dos loci de MHC. Debido a que la variación en loci de MHC es influida por procesos que determinan también la variabilidad de la totalidad de genoma (ej., cuellos de botella: Seddon y Baverstock 1999; tamaños efectivos poblacionales pequeños: Seddon y Ellegren 2001, Miller y Lambert 2004), se emplearon análisis de marcadores de microsatélites, no funcionales, para evaluar el rol de procesos selectivamente neutrales (ej., deriva génica) en la determinación de los patrones de polimorfismo de MHC observados en las poblaciones de estudio. Las comparaciones realizadas entre los niveles de variabilidad de regiones de microsatélites y de intrones presumiblemente neutrales con los de exones de dos loci de Clase II (DRB y DQA) revelaron diferencias entre las poblaciones que sugieren que la demografía es un determinante importante de las presiones selectivas que dan forma a la variación de MHC en poblaciones naturales de vertebrados.

MÉTODOS

Poblaciones de estudio.- Una detallada descripción de las características ambientales y demográficas de las poblaciones de estudio en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC) ya fue presentada en el capítulo 1. En la Tabla 1, se resumen las características demográficas y de estructura genética neutral que difieren entre MC y NC. Probablemente más relevante para los análisis de variación del MHC, la densidad y la estructuración del parentesco genético también difieren entre las poblaciones. La recolección de datos a través de 18 años de estudio (Busch et al. 1989, Malizia et al. 1991, 1995, Cutrera y Zenuto, datos no publicados) indica que MC presenta una mayor densidad (t de Student, g.l. = 8, $t = 13,62$; $P < 0,001$) que NC. Al mismo tiempo, la dispersión juvenil se encuentra más desviada hacia los machos en MC, conduciendo a un mayor grado de estructuración del parentesco genético y mayor endogamia aparente en esta población comparada con NC, como ya fue detallado en el primer capítulo de esta tesis.

Recolección de muestras.- Se obtuvo el genotipo de treinta adultos por población, los cuales fueron capturados vivos en MC y NC entre agosto y noviembre de 2002, siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 1. Como ya fue mencionado en los capítulos anteriores, *C. talarum* es solitario, lo cual significa que los adultos no comparten sistemas de cuevas (Busch et al. 1989). Como resultado, las relaciones de paternidad y de parentesco son difíciles de determinar sin el uso de datos moleculares (ver Capítulo 1). En consecuencia, se recolectaron muestras de tejido de múltiples clusters de cuevas distribuidos en áreas de 1-2 ha para evitar que la evaluación de los patrones de variabilidad de MHC a nivel poblacional pudieran estar basados en análisis realizados sobre un subgrupo de individuos cercanamente emparentados.

Análisis genéticos: loci de MHC.- Se estudió la variabilidad de dos loci de MHC Clase II. Se seleccionaron para dicho análisis el exón 2 del locus DRB y el exón 2 del locus DQA debido a que se conoce que estas secuencias contienen las regiones de unión a péptidos (“peptide binding region”, PBR) de las moléculas de MHC asociadas, y que constituyen las porciones de estos genes que están sujetas típicamente a mayores niveles de selección balanceadora (Brown et al. 1993, Hughes y Hughes 1995). Se extrajo ADN de alto peso molecular de todas las muestras de tejido colectadas empleando el protocolo descrito en el capítulo 1. Para DRB, un fragmento de 273 pares de bases del exón 2 fue amplificado utilizando los primers GH46 y GH50 (Scharf et al. 1988). Para DQA, un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases que contiene el exón 2 (177 pares de bases), el intrón 2 (309 pares de bases) y una porción del exón 3 fue amplificado utilizando los primers DQA1 y DQA2 (Slade et al. 1993, 1994). Las mezclas de PCR para ambos loci fueron preparadas de acuerdo a Sommer et al. (2002). Las condiciones de reacción para todas las amplificaciones consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 1 min a 94 °C, alineado del primer (annealing) por 1 min a 57 °C y extensión por 1 min a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los fragmentos de MHC amplificados fueron clonados y secuenciados para caracterizar la variación alélica de los genes DRB y DQA. El clonado se realizó utilizando el kit de clonado TA con células competentes Inv α -F (Invitrogen, Inc.). Para verificar que los productos de clonado se ajustaban al tamaño de inserto esperado, el ADN de colonias bacterianas positivas (de color blanco) fue amplificado por PCR utilizando los primers T7 y M13 reverso específicos para el vector de clonado TA. Cada

reacción de 10 ul consistió en 4,8 ul de agua doblemente destilada, 1 ul de buffer Thermophilic DNA Poly 10 X buffer (Promega ®), 0,3 ul de dNTP 10 mM cada uno, 0,9 ul de solución de MgCl₂ 25 mM y 1,5 ul de solución de cada primer 10 uM. Los templados de ADN para cada reacción fueron obtenidos tocando el borde de una colonia blanca con un palillo de madera autoclavado, luego introduciendo dicho palillo en la mezcla de PCR y revolviendo los contenidos de la reacción. La misma se sometió a 10 min iniciales a 100 °C para desnaturalizar el templado y el vector de ADN. Una segunda mezcla de PCR que consistía en 4,35 ul de agua doblemente destilada, 0,5 ul de Thermophilic DNA Poly 10x buffer (Promega ®) y 0,15 ul de polimerasa Taq (Promega ®) fue preparada y agregada a cada reacción. Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 4,5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94 °C, alineado del primer por 30 seg a 57 °C y una extensión por 30 seg a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por 2 min.

Los productos de amplificación que contenían insertos del tamaño correcto fueron utilizados como templado para la adición de dNTPs fluorescentes empleando el kit de secuenciación Big Dye ® Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc.). Luego de esta reacción, los productos dicha reacción fueron corridos en un secuenciador automático ABI 3730. Se secuenciaron 5-6 clones positivos por individuo; este número de productos de clonado fue suficiente para determinar el genotipo de cada animal y para evitar errores de lectura o secuencias recombinantes generadas durante las amplificaciones de PCR (Bradley y Hillis 1997). Cada alelo nuevo detectado fue secuenciado en ambas direcciones para confirmar pares de bases diagnósticos. Las secuencias que diferían sólo en una sustitución única fueron consideradas alelos distintos

si cada variante ocurría en (1) múltiples individuos y/o (2) múltiples productos de clonado por individuo (obtenidos de al menos dos reacciones de PCR diferentes y dos rondas de clonado distintas).

Análisis de microsatélites.- Los análisis de microsatélites fueron idénticos a aquellos descritos en los capítulos 1 y 2.

Análisis de los datos.- Los tamaños muestrales típicos empleados en varios estudios de vertebrados en condiciones naturales hacen difícil la detección de la selección (Hedrick et al. 2000). Consecuentemente, se emplearon tests a nivel molecular y poblacional para detectar desvíos de la neutralidad de los exones de los loci DRB y DQA. Mientras que los procesos de flujo génico y de deriva deberían afectar todos los loci, se espera que la selección influya solo sobre una porción del genoma (Nielsen 2001). Como resultado, las comparaciones de variabilidad entre loci neutrales y de MHC pueden ser utilizadas para distinguir selección de otras fuentes de diversificación genética (Garrigan y Hedrick 2003). Para proveer información sobre la variación neutral a nivel poblacional, se utilizaron datos de los 8 loci de microsatélites empleados en el capítulo 2 para calcular la heterocigosis media observada en estos marcadores. En forma similar, se examinó la variabilidad del intrón 2 de DQA presumiblemente neutral como parte de los análisis a nivel poblacional de estructura genética (ver más adelante).

Tests de selección basados en frecuencias alélicas.- Para detectar evidencia de selección actual sobre loci de MHC (Garrigan y Hedrick 2003), se usaron tests de Hardy-Weinberg para determinar si los niveles de heterocigosis observada para DRB (exón 2) y DQA (exón 2 e intrón 2) excedían significativamente aquellos esperados, basados en las frecuencias alélicas de cada población. Para detectar evidencia de selección a lo largo de

periodos más prolongados, se realizaron tests de Ewens-Watterson (Ewens 1972, Watterson 1978, Garrigan y Hedrick 2003). Ambos tests, además de los análisis de desequilibrio por ligamiento, fueron realizados empleando el ARLEQUIN 2000 (Schneider et al. 2000). Como un acercamiento alternativo para explorar la evidencia de selección a nivel poblacional, se calcularon los D de Tajima para cada una de las poblaciones de estudio utilizando el DNAsp 4.0 (Rozas et al. 2003). Este estadístico emplea la diferencia normalizada entre θ (estimada a partir del número de sitios que segregan, S) y el número promedio de pares de bases distintas en comparaciones de pares entre secuencias (K) para determinar si las frecuencias intermedias de alelos se encuentran sobre-representadas, como se esperaría bajo selección balanceadora (Tajima 1989). Aunque cada uno de los tests puede arrojar resultados significativos debido a otros factores no relacionados con la selección, desvíos consistentes de la neutralidad en múltiples tests provee información convincente de la acción de la selección sobre los loci DRB y DQA.

Tests de selección basados en composición nucleotídica de los alelos.- Para detectar evidencia de selección, también se emplearon los cálculos de las tasas de sustituciones no sinónimas (d_N) a sinónimas (d_S) de acuerdo a Nei y Gojobori (1996) para DRB (exón 2) y DQA (exón 2) empleando el DNAsp 4.0 (Rozas et al. 2003). Debido a que se espera que las secuencias neutrales acumulen ambos tipos de sustituciones a tasas similares, un exceso de cambios no sinónimos ($d_N/d_S > 1.0$) se considera como indicador de selección positiva (Hughes y Nei 1989). De acuerdo a ello, para ambos exones examinados, se espera encontrar un exceso de cambios no sinónimos. La significancia de los desvíos de

la condición de neutralidad para las proporciones d_N/d_S fue evaluada utilizando MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001).

Debido a que el algoritmo de Nei y Gojobori (1986) estima d_N/d_S empleando el set entero de codones secuenciados, las proporciones resultantes pueden incluir codones que estén sujetos a diferentes formas de selección (ej., balanceadora vs. purificadora). Por lo tanto, se empleó el método de máxima verosimilitud de Goldman y Yang (1994) para evaluar la existencia de proporciones d_N/d_S variables entre codones de la misma secuencia. Este procedimiento está basado sobre un modelo explícito de sustitución de codones que considera tanto la proporción transición/transversión observada (K) y la distribución observada de pares de bases en cada posición del codón al estimar ω , el cual es equivalente al d_N/d_S (Goldman y Yang 1994). Los estimadores de ω fueron generados siguiendo el protocolo de Yang et al. (2000). Para cada comparación de pares de alelos (todos los alelos del mismo locus y de la misma población), el test de proporción de verosimilitud fue empleado para determinar si el valor de ω calculado difería significativamente de 1.0 (el valor esperado de ω bajo condiciones de neutralidad; Yang et al. 2000).

Para identificar los codones sujetos a selección positiva ($\omega > 1.0$) y para determinar si la selección varía entre codones de la misma secuencia, los valores observados de ω fueron comparados con cuatro modelos de distribución para el estimador utilizando la subrutina CODEML del PAML (Yang 1997). Las cuatro distribuciones examinadas fueron M0 (una proporción única), la cual asume que los codones son conservados ($\omega = 0$) o neutrales ($\omega = 1.0$), M2 (selección), la cual incorpora una tercera clase de codones con valores no restringidos de ω (ej., $\omega > 1.0$) y M3 (discreto), la cual estima la

proporción de codones en cada clase (conservados, neutrales, no restringidos) a partir de los datos. Los tests de verosimilitud fueron utilizados para comparar M0 y M3, así como para comparar valores de M1 y M2. De acuerdo a Yang et al. (2000), los valores de M2 y M3 indicadores de codones con $\omega > 1$, pueden ser interpretados como evidencia de selección positiva. En forma concordante, las comparaciones de M0 y M3 pueden ser usadas para detectar la presencia de valores variables de ω entre codones de la misma secuencia. Una vez que los estimadores de los parámetros de los modelos de máxima verosimilitud fueron obtenidos, las probabilidades bayesianas posteriores fueron calculadas para evaluar si ciertos codones específicos eran conservados, neutrales o sujetos a selección positiva (Nielsen y Yang 1998).

Estimación de la intensidad de selección.- La intensidad de selección sobre cada exón fue estimada de acuerdo al método de Satta et al. (1994), el cual emplea la evidencia a nivel molecular (d_N/d_S) de los desvíos de la neutralidad. Para incorporar potenciales diferencias en la estructura genética neutral entre poblaciones de estudio, los estimadores de s fueron divididos por $2N_e$ (Satta et al. 1994); los estimadores del tamaño efectivo poblacional de MC y NC se basan en los análisis de microsatélites realizados en las poblaciones de estudio, tal como fueron detallados en el capítulo 2.

RESULTADOS

Todas las muestras dieron lugar a una única banda bien resuelta cuando fueron amplificadas empleando los primers para DRB y DQA. Luego del clonado, no se detectaron más de dos secuencias por individuo en ninguno de los loci, sugiriendo que sólo una copia del gen fue amplificada. Las comparaciones de las secuencias de MHC con aquellas publicadas en Genbank revelaron más del 80 % de identidad entre DRB y DQA de *C. talarum* y el de otros taxa de mamíferos. No se detectaron inserciones ni deleciones entre las secuencias obtenidas y, cuando éstas fueron traducidas a secuencias proteicas, no se detectaron codones de stop en ninguno de los exones estudiados de *C. talarum*. En conjunto, estos resultados sugieren que los datos obtenidos en este estudio no fueron afectados por la presencia de pseudogenes.

Niveles de variabilidad en DRB y DQA.- En general, la variabilidad de los dos exones de MHC examinados tendió a ser mayor en Mar de Cobo que en Necochea (Fig. 1). Un total de 16 variantes alélicas fue detectado en el exón 2 del locus DRB, de las cuales tres fueron compartidas entre las poblaciones de estudio (Tabla 2). El número de alelos, la heterocigosis observada y la diversidad nucleotídica y haplotípica fueron mayores en MC (Tabla 3). Un total de 4 variantes alélicas fue detectado en el exón 2 del locus DQA, tres de las cuales fueron compartidas entre las poblaciones de estudio; sólo la población de MC contuvo una variante alélica de DQA específica (Tabla 2). Mientras que el número de alelos, heterocigosis observada y diversidad haplotípica fueron mayores para MC, la diversidad nucleotídica de DQA fue mayor para Necochea (Tabla 3).

Comparaciones con marcadores neutrales.- En contraste con los resultados obtenidos para los exones de MHC, la variabilidad del intrón 2 del locus DQA tendió a ser mayor

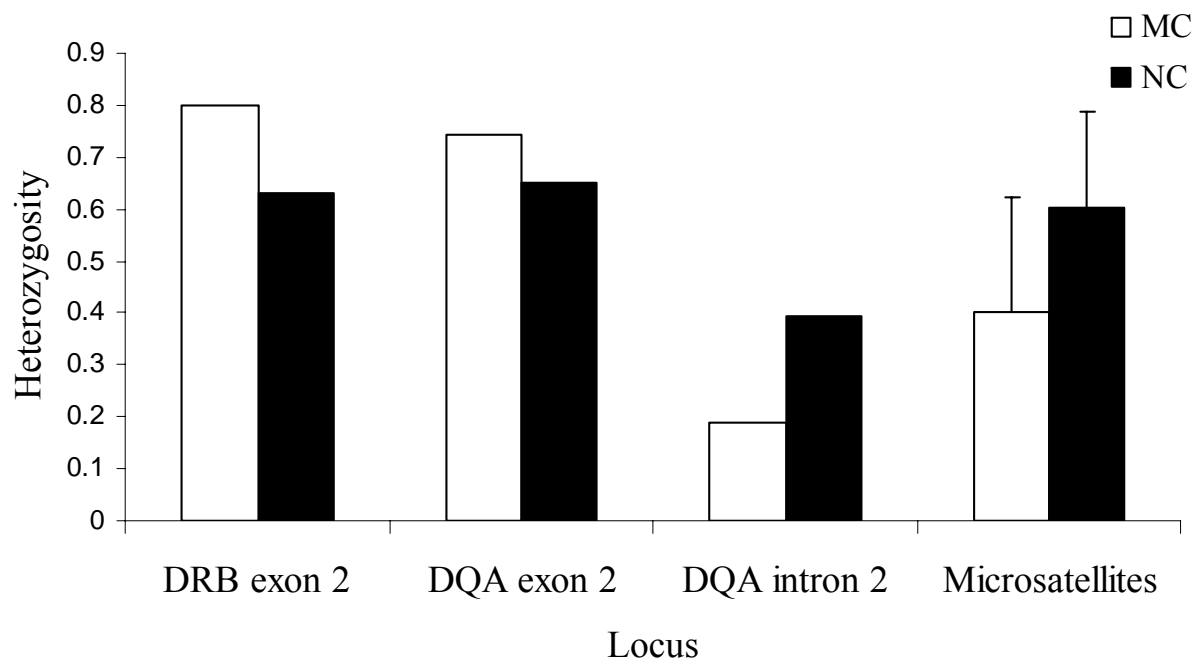


FIGURA 1.- Comparación de la variación de microsatélites y de MHC en poblaciones de *C. talarum* de Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina. Se examinaron 30 adultos por población. Se presentan los datos de heterocigosis observada (H_o) en 8 loci de microsatélites, como así también los datos observados en heterocigosis de los exones 2 de DRB y DQA y del intrón 2 del locus DQA.

Tabla 1.- Resumen de las diferencias demográficas principales entre las poblaciones de *Ctenomys talarum* en Mar de Cobo y Necochea, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Población	Densidad (# adultos/ha \pm SD) ^{*,1,2,3}	Proporción sexual ^{1,4}	Patrones de dispersión	Parentesco entre potenciales parejas ^{**,5}	Fis
MC	57 \pm 6	3:1	juveniles, mayoría machos	0.15 †	0.106 †
NC	15 \pm 4	1:1	juveniles, ambos sexos	0.06	0.012

* n = 5 años

** medido como el coeficiente de parentesco (r) entre potenciales parejas reproductivas, determinado a partir del análisis de 12 loci de microsatélites (ver capítulo 1).

† desvío significativo del valor esperado (ver capítulo 1).

¹Busch et al. 1989, ²Malizia et al. 1995, ³Zenuto unpubl. data, ⁴Malizia et al. 1997, ⁵Cutrera et al. 2005.

para NC (Fig.1). Un total de 4 variantes alélicas fue detectado para esta porción del gen de DQA, las cuales fueron compartidas entre las poblaciones de estudio (Tabla 2). Aunque el número de alelos detectados fue el mismo para MC y NC, la heterocigosis observada y la diversidad haplotípica y nucleotídica fue mayor para NC (Tabla 3). Estos resultados son consistentes con análisis de la variación de microsatélites en las poblaciones de estudio (Fig.1), lo cual indica una tendencia significativa hacia una mayor cantidad de alelos por locus en NC (ver capítulo 2). Como ya fue detallado en el capítulo 2, la heterocigosis de regiones de microsatélites fue generalmente mayor para NC, aunque esta tendencia no resultó significativa (ver capítulo 2). Así, tanto los datos de microsatélites como los del intrón 2 del locus DQA sugieren que, en contraste con los patrones de variación de los exones de MHC examinados, la variación genética neutral tendió a ser mayor que NC (Fig. 1).

Evidencia de selección.- La evidencia de selección obtenida a partir de tests basados en frecuencias alélicas difirió entre loci pero no entre las poblaciones de estudio. Para el exón 2 del locus DRB, las frecuencias genotípicas no se desviaron significativamente de lo esperado bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg en ninguna de las poblaciones de estudio (MC: $n = 30$, $p = 0,356$; NC: $n = 30$, $p = 0,950$). En forma similar, los tests de Ewens-Watterson no revelaron desvíos significativos de los valores esperados para MC ($F = 0,205$, Watterson $P = 0,796$, Slatkin's Exact $P = 0,951$) o NC ($F = 0,409$, Watterson $P = 0,637$, Slatkin's Exact $P = 0,866$). Los estimadores del D de Tajima resultaron positivos para ambas poblaciones (MC: $D = 1,20$; NC: $D = 0,615$), sugiriendo un exceso de alelos con frecuencias intermedias, aunque ninguno de dichos estimadores

fue significativamente distinto de aquellos esperados bajo condiciones de neutralidad

(ambos

Tabla 2.- Frecuencias alélicas para los loci de MHC clase II DRB y DQA (exón 2), y el intrón 2 de DQA. Los estimadores se basan en una muestra de 30 adultos de *Ctenomys talarum* por población para cada población de estudio en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina. El nombre de los alelos y cada uno de sus números de acceso en el Genbank son detallados.

Locus	Alelo	Frecuencia en la población		Número de acceso
		MC	NC	
DRB exón 2				
	DRBCta0101	--	0.017	DQ380445
	DRBCta0102	0.050	0.450	DQ380431 (MC), DQ380444 (NC)
	DRBCta0103	0.220	0.450	DQ380432 (MC), DQ380446 (NC)
	DRBCta0104	--	0.050	DQ380447
	DRBCta0105	--	0.017	DQ380448
	DRBCta0106	0.017	0.017	DQ380433 (MC), DQ380449 (NC)
	DRBCta0107	0.080	--	DQ380434
	DRBCta0108	0.017	--	DQ380435

Locus	Alelo	Frecuencia en la población		Número de acceso
		MC	NC	
	DRBCta0109	0.120	--	DQ380436
	DRBCta0110	0.400	--	DQ380437
	DRBCta0111	0.017	--	DQ380438
	DRBCta0112	0.017	--	DQ380439
	DRBCta0113	0.017	--	DQ380440
	DRBCta0114	0.017	--	DQ380441
	DRBCta0115	0.017	--	DQ380442
	DRBCta0116	0.017	--	DQ380443
DQA exón 2	DQACta0101	0.280	0.360	DQ380450 (MC), DQ380454 (NC)
	DQACta0102	0.280	0.460	DQ380451 (MC), DQ380455 (NC)
	DQACta0103	0.340	0.180	DQ380452 (MC), DQ380456 (NC)
	DQACta0104	0.100	--	DQ380453

Locus	Alelo	Frecuencia en la población		Número de acceso
		MC	NC	
DQA intrón 2				
	DQACta0105	0.910	0.160	DQ380457 (MC), DQ380461 (NC)
	DQACta0106	0.030	0.770	DQ380458 (MC), DQ380462 (NC)
	DQACta0107	0.030	0.040	DQ380459 (MC), DQ380463 (NC)
	DQACta0108	0.030	0.040	DQ380460 (MC), DQ380464 (NC)

Tabla 3.- Diversidad de MHC en poblaciones de *C. talarum* en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina. Se presentan los datos de número de alelos, heterocigosis observada (Ho), promedio de diferencias nucleotídicas de a pares (k), diversidad nucleotídica (Pi) y diversidad haplotípica (Hd) para los exones 2 of DRB y DQA y el intrón 2 de DQA. Las muestras consistieron en 30 adultos por población de *C. talarum*. Los asteriscos denotan las heterocigosis que se apartaron significativamente de lo esperado bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg.

Locus	Población	# alelos	Ho	He	# de sitios polimórficos	k	Pi (± SD)	Hd (± SD)
DRB (exon 2)	MC	13	0.80	0.81	13	4.28	0.011 (0.001)	0.765 (0.037)
	NC	6	0.63	0.60	8	3.53	0.008 (0.001)	0.605 (0.037)
DQA (exon 2)	MC	4	0.745*	0.60	3	1.35	0.008 (0.001)	0.730 (0.018)
	NC	3	0.649*	0.583	3	1.45	0.008 (0.001)	0.640 (0.027)

Locus	Población	# alelos	Ho	He	# de sitios polimórficos	k	Pi (± SD)	Hd (± SD)
DQA (intron 2)	MC	4	0.188	0.207	4	0.31	0.001 (0.001)	0.181 (0.090)
	NC	4	0.383	0.389	4	0.70	0.010 (0.001)	0.406 (0.101)

$p > 0,1$). En resumen, los análisis a nivel poblacional no revelaron evidencia significativa de selección sobre el locus DRB.

Por el contrario, los tests de Hardy-Weinberg revelaron que los niveles de heterocigosis observados en el exón 2 del locus DQA fueron significativamente mayores que lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg en las dos poblaciones (ambos $n = 30$, ambos $p < 0,0001$). En forma similar, los tests de Ewens- Watterson indicaron desvíos significativos de las condiciones de neutralidad en el exón DQA en ambas poblaciones de estudio (MC: $F = 0,28$, Watterson $P = 0,011$, Slatkin's Exact $P = 0,015$; NC: $F = 0,36$, Watterson $P = 0,029$, Slatkin's Exact $P = 0,031$). Los estimadores del D de Tajima fueron positivos y significativamente mayores que 0 en ambas poblaciones de estudio (MC: $D = 2,204$; NC: $D = 2,48$, MC y NC $p < 0,05$), indicando un exceso de alelos en frecuencias intermedias relativo a lo esperado bajo neutralidad. En conjunto, estos análisis sugieren que, al contrario de DRB, existe evidencia de selección sobre el exón 2 del locus DQA.

Como se esperaba, los análisis realizados sobre el intrón 2 del locus DQA no revelaron evidencia de selección. Por un lado, los niveles de heterocigosis observados no se desviaron significativamente de lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg en ninguna de las poblaciones (MC: $p = 1,00$; NC: $P = 0,271$). Por otro lado, los tests de Ewens-Watterson no revelaron desvíos significativos de las condiciones de neutralidad (MC: $F = 0,82$, Watterson $P = 0,92$, Slatkin's Exact $P = 0,88$, NC: $F = 0,62$, Watterson $P = 0,92$, Slatkin's Exact $P = 0,88$; NC: $F = 0,62$, Watterson $P = 0,73$, Slatkin's Exact $P = 0,61$). Contrario a nuestros análisis de los exones de MHC, los estimadores del D de Tajima para el intrón 2 de DQA fueron negativos, aunque estos valores no difirieron significativamente de 0 en ninguna de las poblaciones de estudio (MC: $D = -1,74$, $P >$

0,05; NC: $D = -0,185$, $P > 0,05$). Por lo tanto, la variabilidad en el intrón 2 fue consistente con la presunta neutralidad de esta porción del locus DQA.

Para ambos exones examinados, la evidencia de selección obtenida a partir de tests basados en la composición nucleotídica de los alelos fue consistentemente mayor para MC. Para DRB, el exón de 273 pb se tradujo en 91 aminoácidos, incluyendo 16 sitios posibles de unión a péptidos extraños y presentación de los mismos (Brown et al. 1993). En MC, 5 (50%) de los 10 residuos aminoacídicos variables se encontraban localizados dentro del PBR; los residuos restantes se encontraban localizados en forma inmediatamente adyacente al PBR. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el exón completo, así como también para las subregiones del PBR, la hélice α y la lámina β de dicho exón. En todos los casos, los valores de d_N/d_S para MC fueron mayores que para NC (Tabla 4). Sólo la hélice α de Mar de Cobo, sin embargo, presentó desvíos significativos de lo esperado por neutralidad (Tabla 4). Los tests de verosimilitud de las proporciones no revelaron diferencias significativas en el ajuste de los modelos M0 y M3 para NC; aunque el M3 presentó un mayor ajuste para MC, la diferencia entre los modelos tampoco resultó significativa (Tabla 5), lo cual arrojó evidencia negativa de que los estimadores de ω diferían entre los codones de la misma secuencia. Los análisis de los modelos M2 y M3 sugirieron la presencia de dos codones positivamente seleccionados en MC (codones 46 y 63, ambos $p < 0,05$), pero no se detectaron codones seleccionados positivamente entre las secuencias de NC (Tabla 5).

Para DQA, el exón de 177 pb se tradujo en una secuencia de 59 aminoácidos. En ambas poblaciones de estudio, el único residuo variable se encontró en la región que se considera asociada con la unión a péptidos extraños (ver Brown et al. 1988). La

Tabla 4.- Estimadores de la proporción tasas de sustituciones no sinónimas (d_N) a sinónimas (d_S) en dos loci de MHC Clase II. Los datos fueron obtenidos de las muestras colectadas de *C. talarum* en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina. Treinta adultos por población fueron muestreados. N es el número de codones examinados para cada exón. Los valores de P provienen de los tests de z que comparan los d_N/d_S observados con una proporción de 1.0, el valor esperado bajo neutralidad. Los datos en (A) provienen del exón 2 del locus DRB. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el fragmento entero de 273 pb secuenciado, así como también para las subregiones de dicho exon (Brown et al. 1988, 1993) indicadas mas abajo. Los datos en (B) son para el exón del locus DQA. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el fragmento entero de 177 pb secuenciado.

A. DRB (exón 2)

Población	Porción del exón	N	d_N/d_S	P
MC	todo	91	1.68	ns
	Lamina β	56	0.72	ns
	Helice α^1	25	∞	0.04
	PBR	16	1.00	ns
NC	todo	91	0.50	ns
	Lamina β	56	0.47	ns
	Helice α^2	25	0.00	--

PBR ²	16	--	--
------------------	----	----	----

B. DQA (exón 2)

Población	Porción del exón	N	d _N /d _S	P
MC	all	59	0.64	ns
NC	all	59	0.54	ns

¹ Sólo sustituciones no sinónimas fueron detectadas en esta subregión.

² No se detectaron sustituciones en esta subregión.

Tabla 5.- Resultados de los tests de verosimilitud que comparan diferentes modelos de tasas de sustitución de codones de loci de MHC en *C. talarum*.. Los datos fueron obtenidos de poblaciones de *C. talarum* en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina (n = 30 adultos por población). Los modelos de sustitución de codones examinados fueron M0 (modelo de proporción única), M1 (modelo neutral), M2 (modelo de selección) y M3 (modelo discreto); los tests de a pares de modelos fueron realizados de acuerdo a Yang et al. (2000). Para cada comparación, se presenta el estadístico de verosimilitud de la proporción (2ΔI), como también los valores de P de los tests de Chi- cuadrado realizados de acuerdo a Yang et al. (2000).

Locus	Modelos comparados	Población					
		MC			NC		
		2ΔI	g.l.	P _{χ²}	2ΔI	g.l.	P _{χ²}
DRB (exón 2)	M0 vs. M3	3.88	4	n.s.	0.23	4	n.s.
	M1 vs. M2	4.70	2	n.s.	0.24	2	n.s.
DQA (exón 2)	M0 vs. M3	0.00	4	n.s.	0.00	4	n.s.
	M1 vs. M2	0.00	2	n.s.	0.00	2	n.s.

Tabla 6. Intensidades de selección estimadas en dos loci clase II de MHC. Los datos provienen de poblaciones de *C. talarum* en Mar de Cobo (MC) y Necochea (NC), Argentina. Se muestrearon 30 adultos por población. Los estimadores de N_e fueron obtenidos a partir de análisis de microsatélites detallados en el capítulo 2. Los estimadores de S fueron generados de acuerdo a Satta et al. (1994) y luego fueron divididos por $2N_e$ para corregir dicha estimación por las diferencias observadas en el tamaño efectivo poblacional en las poblaciones de estudio.

Población	N_e	DRB exón 2		DQA exón 2	
		S	s_{N_e} (%)	S	s_{N_e} (%)
MC	181	2.19	0.60	0.22	0.06
NC	345	0.30	0.04	0.24	0.03

estructura del exón de DQA no ha sido tan detalladamente caracterizada como la del exón de DRB (Meyer y Thompson 2001) y, por lo tanto, no fue posible identificar subregiones específicas en la secuencia de DQA (ej., hélice α) para un análisis más exhaustivo de la variación a nivel molecular. Como resultado, se calcularon los valores de d_N/d_S únicamente para el exón entero. El valor de d_N/d_S obtenido para MC fue mayor que aquel calculado para NC, aunque ninguno difirió significativamente de lo esperado bajo neutralidad (Tabla 4). Los tests de verosimilitud no revelaron diferencias significativas en el ajuste de los modelos M0 y M3 para ninguna de las poblaciones de estudio (Tabla 5), lo cual no brindó evidencia de que ω difirió entre los codones de este exón. En forma similar, los análisis de los modelos M2 y M3 no detectaron ningún codón del exón 2 de DQA que estuviera sujeto a selección positiva (Tabla 5).

Intensidad relativa de selección.- La intensidad de selección (s) estimada para el exón 2 del locus DRB fue 7,2 veces mayor para MC que para NC (Tabla 6). Cuando las diferencias en los tamaños efectivos poblacionales de las poblaciones de estudio (estimados a partir de los datos de variación en regiones de microsatélites, ver capítulo 2) fueron considerados, la intensidad de selección corregida (s_{N_e}) para MC fue 15,0 veces mayor que para NC (Tabla 6). Los análisis del exón 2 del locus DQA revelaron estimadores similares de s para ambas poblaciones de estudio (Tabla 6). Cuando estos fueron corregidos por las diferencias en el tamaño poblacional efectivo, s_{N_e} fue 2,0 veces mayor para MC que para NC (Tabla 6). Por lo tanto, en conjunto, los estimadores de s basados en datos a nivel molecular indicaron que la intensidad de selección fue mayor para MC.

DISCUSION

Los patrones de variación a nivel poblacional de los dos exones del MHC examinados difirieron de aquellos observados para las regiones de microsatélites y el intrón considerados. Como era esperado, los loci de microsatélites ni el intrón 2 de DQA mostraron desvíos significativos de lo esperado bajo neutralidad. Por el contrario, se detectaron desvíos significativos de la neutralidad en el exón 2 de DQA y, los tests basados en la composición nucleotídica de los alelos, registraron evidencia de apartamiento de la neutralidad para el exón 2 del locus DRB. Al mismo tiempo, los D de Tajima, revelaron un exceso significativo de alelos en frecuencias intermedias en el exón de DQA, pero sugirieron un exceso de alelos a bajas frecuencias para el intrón 2 de DQA. Finalmente, mientras que la variabilidad de los exones de DRB y DQA tendió a ser mayor para MC, la población de mayor densidad y mayor estructuración del parentesco, la variación en regiones de microsatélites y en el intrón de DQA fue mayor para NC. En conjunto, estas diferencias en niveles de variabilidad de marcadores funcionales y presumiblemente neutros examinados sugieren que, en *C. talarum*, las fuerzas que mantienen la variación de los exones de MHC difiere de aquellas que actúan sobre los microsatélites y los intrones de MHC.

La selección y la historia poblacional pueden tener efectos similares sobre la estructura genética (Nielsen 2001), haciendo difícil la distinción entre los resultados de dichos procesos. Los resultados de regiones de microsatélites previamente analizados en el capítulo 2 de esta tesis, sin embargo, no evidenciaron que las poblaciones de estudio difirieran con respecto las reducciones históricas en la variabilidad (ej., cuellos de

botella). En forma similar, aunque los *D* de Tajima revelaron una tendencia hacia un exceso de alelos a bajas frecuencias en el intrón de DQA, ni MC ni NC se desviaron significativamente de lo esperado bajo neutralidad, lo cual no generó evidencia de que dichas poblaciones difieran con respecto a la probabilidad de que hayan sufrido expansiones históricas. Sumados, estos análisis sugieren que las diferencias observadas en niveles de variabilidad neutral entre MC y NC reflejan las diferencias demográficas bien documentadas entre estas poblaciones (Busch et al. 1989, Malizia y Busch 1991, Zenuto et al. 1999a, 1999b, Zenuto et al. 2002).

Ambos exones examinados se consideran típicamente sujetos a selección balanceadora (Satta et al. 1994, Meyer y Thomson 2001). Aunque estos análisis representaron evidencia estadística limitada de selección sobre DRB, este resultado podría reflejar restricciones impuestas por el tamaño muestral, en vez de ausencia de selección sobre este locus. La selección es usualmente difícil de detectar para tamaños muestrales que son típicos de estudios en poblaciones naturales de vertebrados (Satta et al. 1994, Hedrick et al. 2000). Tomando en cuenta este problema, se emplearon múltiples análisis a dos escalas, poblacional y molecular, para examinar la existencia de desvíos de la neutralidad. La consistencia en las tendencias identificadas por estos análisis, sumada a las diferencias marcadas en la variabilidad de loci neutrales y de MHC sugiere que, a pesar de lo limitado del soporte estadístico para demostrar selección sobre DRB, los exones examinados se encuentran sujetos a selección (ver también Hambuch y Lacey 2002, Wegner et al. 2003). Los estimadores de la intensidad de selección fueron consistentemente mayores para MC, indicando que las diferencias demográficas entre las

poblaciones de estudio podrían haber contribuido a generar los patrones observados en la variación de los loci de MHC considerados.

Comparaciones entre loci.- Los análisis de este trabajo revelaron diferencias marcadas entre DRB y DQA con respecto a la variabilidad y a la intensidad de selección estimada, siendo ambos parámetros mayores para DRB. Este tipo de relación positiva entre la intensidad de selección y la variabilidad alélica se espera bajo un modelo de selección balanceadora (Satta et al. 1994, Richman 2000). Mientras que sólo se verificó evidencia de selección positiva para DRB a partir de los tests basados en el cálculo de d_N/d_S y en los cocientes de máxima verosimilitud, la evidencia de selección obtenida a través de tests basados en frecuencias alélicas se limitó a DQA. En parte, esta diferencia podría reflejar los algoritmos estadísticos empleados en estos análisis. Por ejemplo, detectar la acción de la selección se vuelve más difícil a medida que el número de alelos de un locus aumenta, particularmente para aquellos tests basados en frecuencias genotípicas (Satta et al. 1994). Como resultado, puede haber resultado más difícil detectar evidencia de selección en DRB, el cual se caracteriza por tener al menos el doble de alelos por población que DQA. Aunque esta tendencia podría haber contribuido a la falta de evidencia significativa de selección a nivel poblacional sobre DRB, no explica la razón por la cual la variabilidad y la intensidad de selección fueron consistentemente mayores para este locus, sugiriendo que otros factores han contribuido a las diferencias observadas entre DRB y DQA.

También han sido reportadas diferencias en variabilidad alélica entre estos loci en humanos (Satta et al. 1994, Salamon et al. 1999), elefantes marinos (Weber et al. 2004), tamarindos (Gyllensten et al. 1994), lobos (Seddon y Ellegren 2002) y perros (Kennedy et

al. 2000, 2001); en cada caso, la variabilidad alélica fue mayor para DRB. La intensidad de selección también tendió a ser mayor para DRB, particularmente para humanos (Satta et al., 1994), sugiriendo una base consistente y, probablemente, funcional para la diferencias de variabilidad entre estos loci. Se considera que ambos exones examinados en este estudio se encuentran involucrados en la unión a péptidos extraños (Brown et al. 1993, Hughes y Hughes 1995). Aunque las distribuciones de sustituciones no sinónimas a sinónimas detectadas en este trabajo son consistentes con las de moléculas de MHC inmunológicamente activas (Brown et al. 1988, 1993), las funciones específicas de dichos genes permanecen poco caracterizadas. Por lo tanto, las diferencias locus-específicas en actividad o en la naturaleza de los péptidos detectados pueden contribuir a generar las diferencias en variabilidad y selección en dichos genes. Además, estudios que indican que alelos individuales de MHC de clase II pueden estar asociados con resistencia o susceptibilidad a patógenos específicos (Patterson et al. 1998, Froeschke y Sommer 2005, Schad et al. 2005) sugieren que estos aspectos de la diversidad del MHC pueden variar en respuesta a condiciones ambientales y / o demográficas. A medida que aumente el número de estudios que examinan la variabilidad en múltiples loci de MHC, el conocimiento sobre las diferencias locus-específicas en función y respuesta a selección también debería aumentar.

Comparaciones entre poblaciones.- Las comparaciones de las poblaciones de estudio revelaron que las medidas de selección y de variabilidad en loci de MHC fueron típicamente mayores para MC. Esto es consistente con las predicciones basadas en las diferencias demográficas entre dichas poblaciones, en particular con respecto a la mayor densidad y mayor grado de endogamia características de MC. La densidad poblacional es

considerada como uno de los factores determinantes del grado de exposición a patógenos (Anderson y May 1979, Coté y Poulin 1995, Arneberg 2002); a medida que la densidad aumenta, la exposición a patógenos debería aumentar también, conduciendo potencialmente a una selección más intensa a favor de diversidad en los loci de MHC (Hughes et al. 1994, Penn y Potts 1999, Bernatchez y Landry 2003). Simultáneamente, a medida que el grado de estructura del parentesco genético aumenta, el potencial de endogamia debería aumentar también (Perrin y Mazalov 1999); si la endogamia reduce el fitness, mayor parentesco entre potenciales parejas reproductivas debería llevar a una mayor selección a favor de la diversidad de MHC, como un mecanismo de evitamiento de apareamientos entre parientes cercanos (Penn y Potts 1999). La densidad puede afectar la acción de la selección a través de su efecto sobre el tamaño poblacional total, el comportamiento de dispersión y el grado de conectividad entre las poblaciones, los cuales, a su vez, deberían impactar en el tamaño efectivo poblacional (Frankham 1995, Nunney y Elam 1994). Específicamente, las diferencias en N_e podrían afectar los patrones de variación de loci presumiblemente neutrales, afectando, por lo tanto, la interacción entre selección débil y deriva; a medida que el N_e se vuelve mayor, la acción de la selección, aunque débil, debería ser más importante (Hartl y Clark 1997). Entonces, las diferencias demográficas entre las poblaciones de estudio podrían haber contribuido a generar las diferencias observadas en los niveles de selección operando en DRB y DQA de múltiples maneras.

Las comparaciones intraespecíficas proveen una herramienta poderosa para explorar los efectos de la demografía sobre la selección debido a que es menos probable que dichos análisis sean afectados por diferencias en la historia filogenético de los grupos

(Awise 2004). La mayoría de los estudios de variación del MHC en vertebrados de vida libre, sin embargo, se han centrado en escalas taxonómicas y geográficas mayores (Boyce et al. 1996, Kim et al. 1999, Landry y Bernatchez 2001), haciendo difícil la evaluación de la importancia relativa de las influencias actuales versus las históricas sobre dichos loci. Por el contrario, debido a que este estudio explota las diferencias intraespecíficas en estructura poblacional, ofrece evidencia particularmente interesante de que la demografía podría ser importante en la determinación de la selección sobre los loci de MHC. En particular, los resultados obtenidos de que la variabilidad y la selección sobre DRB y DQA fueron consistentemente mayores para MC sugieren que los parámetros demográficos mencionados influyen en las fuerzas selectivas que actúan sobre la variabilidad inmunogenética de los tuco-tucos de los talas. Análisis adicionales de poblaciones de esta especie, sin embargo, son requeridos para poner a prueba la generalidad de las relaciones aparentes entre densidad poblacional, grado de endogamia y patrones de variación genética neutral y no neutral. Al mismo tiempo, los estudios de la variación de DRB y DQA en múltiples especies del género *Ctenomys* deberían contribuir a generar una perspectiva evolutiva sobre los roles de la demografía y de la selección balanceadora en este género. Esta metodología será aplicada en los dos capítulos siguientes.

CAPITULO 4

**EL ROL DE LA DEMOGRAFÍA HISTÓRICA EN EL MODELADO
DE LA VARIACIÓN DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) DEL TUCO TUCO DE LOS
MÉDANOS (*CTENOMYS AUSTRALIS*)**

AGRADECIMIENTOS: A Mati por su gran ayuda durante las tareas de campo, por capturar los individuos de *C. australis* y ceder parte de los tejidos para los análisis de este capítulo; al grupo del Evolutionary Genetics DNA Lab (MVZ-UC Berkeley), por su asesoramiento y por el entrenamiento brindado en las técnicas de secuenciación y clonado.

El rol de la demografía histórica en el modelado de la variación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) del tuco-tuco de los médanos (Ctenomys australis).

INTRODUCCIÓN

La distribución y el mantenimiento de la diversidad genética dentro del rango geográfico de una especie refleja tanto la historia de sus poblaciones como procesos ecológicos y características demográficas actuales de dicha especie. En particular, eventos de colonización recientes de nuevos hábitats o extensos períodos de aislamiento geográfico pueden tener efectos duraderos sobre los patrones de variación genética (Matocq et al. 2000). Aunque este balance ha sido intensamente estudiado por medio del uso de marcadores neutrales (e.g. Su et al. 2001; Banks et al. 2005; Knowles y Richards 2005), todavía resta realizar trabajos extensivos que empleen loci funcionales, sobre los cuales la selección natural también juega un importante papel en la modificación de los niveles y patrones de variabilidad.

El grupo más variable de genes funcionales, como fuera mencionado en el capítulo anterior, es el de aquellos que forman parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el cual es responsable de la identificación y presentación de péptidos extraños para que sean reconocidos por el sistema inmune (Apanius et al. 1997; Edwards y Hedrick 1998; Patterson et al. 1998). La selección balanceadora ha sido propuesta como una de las fuerzas principales que mantienen este nivel tan alto de variabilidad en los loci de MHC (Hughes y Yeager 1998), asociada a la magnitud de la exposición a parásitos y la depresión por endogamia (Penn y Potts 1998; revisión realizada por Bernatchez y Landry 2003). En poblaciones de gran tamaño y que no sufren problemas de endogamia, esta forma de selección puede mantener numerosos alelos y

una alta divergencia de secuencias aminoacídicas, así como también altos niveles de heterocigosis, más allá de los esperados bajo condiciones de neutralidad (Hedrick y Thomson 1983; Klein et al. 1993; Garrigan y Hedrick 2003). Sin embargo, la selección balanceadora puede no siempre ser la fuerza predominante que da forma a la variación del MHC; particularmente en pequeñas poblaciones, la dinámica de la variabilidad del MHC puede ser afectada mayormente por la deriva génica, asociada con eventos demográficos como los cuellos de botella (Mikko y Andersson 1995; Seddon y Baverstock 1999; Seddon y Ellegren 2004). Por el contrario, otros estudios han documentado que la selección balanceadora puede ser un mecanismo lo suficientemente intenso como para mantener la variación del MHC en poblaciones naturales, a pesar de una deriva génica pronunciada (Aguilar et al. 2004). Numerosos estudios han examinado la variación del MHC en poblaciones naturales que han sufrido cambios históricos pronunciados (e.g. cuellos de botella severos), la mayoría de ellos asociados a factores antropogénicos (e.g. Hoelzel et al. 1999; Hedrick et al. 1999; 2000; van der Walt et al. 2001; van Den Bussche et al. 2002; Lukas et al. 2004; Weber et al. 2004). Sin embargo, considerablemente menos cantidad de estudios han evaluado los efectos de la demografía sobre la variación del MHC en poblaciones naturales que han experimentado eventos históricos no necesariamente asociados a la acción humana (pero ver Hambuch y Lacey 2002; Lacey en prep.).

En este capítulo, se comparan los patrones de variabilidad genética en dos especies del género *Ctenomys*, *C. australis* (el tuco-tuco de las dunas) y *C. talarum* (el tuco-tuco de los Talas) con el fin de explorar los efectos de la demografía histórica y de la selección sobre la variabilidad del MHC. Estas especies de roedores subterráneos

habitan las dunas costeras de la costa atlántica de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Aunque se encuentran distribuidas en simpatria en el rango sur de la distribución de *C. talarum* (Contreras y Reig 1965), parecen encontrarse separadas a escala microespacial por diferencias en las preferencias de suelo (Vassallo 1994; 1998).

En forma interesante, aunque estas especies de *Ctenomys* comparten parte de su distribución geográfica, parecen haber experimentado procesos históricos extremadamente distintos. Análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) han provisto evidencia de que las poblaciones locales de *C. talarum* muestran un régimen de diferenciación estable por deriva génica bajo un sistema de flujo génico limitado, habiendo alcanzado el equilibrio entre la diversidad nucleotídica y el tamaño poblacional (Mora et al. enviado). Este escenario ha sido corroborado por distribuciones “mismatch” erráticas que indican estabilidad a lo largo de un periodo sustancial en el pasado. A su vez, los patrones observados han sido asociados con la mayor flexibilidad de la especie en cuanto a preferencias de suelo, lo cual podría haber permitido ajustes locales de las poblaciones a niveles cambiantes del nivel del mar, manteniendo un patrón general de aislamiento por distancia (Mora et al. enviado). Una situación completamente diferente fue observada para el tuco-tuco de las dunas, el cual, contrariamente a lo que ocurre en *C. talarum*, exhibe una fuerte dependencia con respecto al ambiente inestable de las dunas costeras (Malizia et al. 1995; Zenuto y Busch 1995; 1998). En particular, en base a evidencia molecular (región control de ADNmt) para *C. australis* ha sido propuesto un escenario de expansión demográfica reciente asociado a la formación del hábitat de dunas que ocupa esta especie, luego de las fluctuaciones del nivel del mar durante el Holoceno medio (Isla 1988, Isla et al. 2001). *C. australis* es un especialista estricto de este tipo de

hábitat y muestra una fuerte asociación con las condiciones inestables del sistema de dunas costeras (Malizia et al. 1991, Zenuto y Busch 1995, 1998); por lo tanto, las poblaciones de esta especie son al menos tan antiguas como el ambiente de dunas en la región. Por otro lado, no se han encontrado restos fósiles de esta especie fuera de su área de distribución actual (Contreras y Reig 1965), apoyando la hipótesis de un reciente colonización y expansión a lo largo de las dunas costeras (Mora et al. 2006).

En el capítulo previo, se proporcionó evidencia sobre el papel de la demografía actual, principalmente la densidad de las poblaciones y la extensión de la filopatría, afectando tanto la variabilidad de los loci de MHC como la intensidad de la selección que actúa sobre ellos en poblaciones naturales de *C. talarum*. Con el fin de determinar si la variación en el MHC en *C. australis* ha sido mantenida por medio de selección natural a pesar de la intensa señal de expansión demográfica reciente que se evidencia en los patrones observados de variabilidad del ADNmt, en este capítulo se evaluó la variabilidad de dos loci de MHC clase II (exones 2 de DRB y DQA) y una región neutral (intrón 2 de DQA). Si la acción de la selección fue importante en la historia del tuco-tuco de las dunas, se espera encontrar una señal de selección positiva a nivel molecular, así como la presencia de linajes de alelos divergentes, considerando que al menos cierta variación alélica ha sido retenida a través de la contracción y posterior evento de expansión. Por otro lado, se espera que la heterocigosis de los exones de MHC sea mayor y que las frecuencias alélicas sean más balanceadas en *C. talarum*, dado que esta especie ha experimentado una historia demográfica más estable, probablemente asociada con una deriva génica menos intensa en relación a la acción de la selección natural. Finalmente, tanto para *C. australis* como para *C. talarum*, se espera que la variabilidad en los exones

de MHC de DRB y DQA sea mayor que aquella para el intrón 2 de DQA tanto a nivel molecular como poblacional. Asimismo, la variación en el intrón de MHC debería mostrar un patrón más similar al ya observado en las especies de ctenómidos estudiadas en este capítulo para marcadores de ADNmt, debido a que se espera que ambas regiones sean de naturaleza neutral. La variabilidad en los loci de MHC mencionados para *C. australis* fue comparada con los datos de variación para los mismos loci de la población de *C. talarum* de Necochea detallados en el capítulo anterior, con el objetivo de estudiar el balance relativo entre la selección balanceadora y la deriva génica en el mantenimiento de la variación genética funcional en poblaciones naturales de especies relacionadas.

MÉTODOS

Poblaciones de estudio y recolección de muestras.- Las localidades de muestreo para *C. australis* y *C. talarum* se encontraban situadas en Necochea (38° 33' S, 38° 45' W), Provincia de Buenos Aires, Argentina. En esta zona, las especies de estudio se encuentran distribuidas en forma simpátrida en los hábitats de dunas costeras caracterizados por la presencia de suelos arenosos; sobre las dunas mismas, la vegetación es escasa y dominada por *Poa sp.*, *Panicum racemosum* y *Calistegia soldanella*, mientras que los ambientes de interdunas se caracterizan por una vegetación más densa donde predominan *Adesmia sp.*, *Stipa tricotoma*, *S. neesiana* y *Bromus unioloides* (Malizia et al. 1991). Durante el año 2003, se capturaron un total de 34 individuos de *C. australis* empleando cepos Oneida Victor n° 0, los cuales fueron recubiertos por goma para evitar lastimar a los animales. Cada animal capturado fue pesado, sexado y marcado individualmente con un anillo de metal en una de las pata posteriores. Se obtuvo una muestra de tejido, removiendo los 1-2 mm distales del dedo más externo de la pata posterior izquierda. Las muestras de tejido fueron conservadas en etanol 95% hasta el momento de ser analizadas. Para la captura de *C. talarum*, se empleó la misma metodología explicada en el capítulo anterior. Luego de finalizar estos procedimientos, el animal era liberado dentro de la cueva en la que había sido capturado. Todos los procedimientos de campo se realizaron conforme a las regulaciones de la American Society of Mammalogists para la captura, procesamiento y cuidado de los animales (Animal Care and Use Committee 1998).

Análisis genéticos.- Los análisis genéticos se realizaron siguiendo la misma metodología detallada en el capítulo anterior.

Análisis de datos.- Como fuera mencionado en el capítulo anterior, los tamaños de muestra típicos de la mayoría de los estudios que trabajan con vertebrados hacen difícil la detección de la acción de la selección natural (Hedrick et al. 2000). Por lo tanto, en este estudio se combinan análisis basados tanto en la composición nucleotídica de los alelos, así como en las frecuencias de las diferentes clases alélicas, con el fin de detectar desvíos de la neutralidad en los exones 2 de DRB y DQA. Además de emplear análisis comparados de la variabilidad de los exones vs. la del intrón con el objetivo de detectar la influencia de la selección sobre la variabilidad de los primeros, como ya fuera detallado en el capítulo 3 de esta tesis, se evaluó el balance entre la selección balanceadora y la deriva génica en el mantenimiento de la variación genética de los loci de MHC a través de la comparación de los resultados obtenidos para *C. australis* con los ya detallados para *C. talarum* en la población de Necochea, ya que esta última especie muestra una historia de mayor estabilidad que *C. australis* (ver Mora et al. 2006). Esta situación representa una oportunidad excelente para investigar si la variación de MHC se correlaciona con la variación neutral afectada por eventos históricos recientes de cambio demográfico. Datos obtenidos de un fragmento parcial de la región control de ADNmt (403 pb) secuenciado previamente para ambas especies (Mora et al., en prensa) otorgaron información sobre la variación genética neutral a nivel poblacional y sobre los procesos históricos que afectaron a las poblaciones de estudio de *C. australis* y *C. talarum*. Se generaron Minimum Spanning Networks (MSN, Excoffier y Smouse 1994) para el exón 2 de DRB, el exón 2 de DQA y el intrón 2 de DQA utilizando Arlequin v. 1.1 (Schneider et al. 2000) para *C. australis* y *C. talarum*. Los MST generados a partir de datos de ADNmt para ambas especies fueron obtenidos de Mora et al. (2006 y en prensa).

Tests de selección basados en frecuencias alélicas.- Para esta sección, se emplearon los mismos tests estadísticos detallados en el capítulo anterior. Por otro lado, los polimorfismos genéticos pueden ser mantenidos por selección balanceadora por períodos extensos, de forma que el ancestro común más reciente de dos alelos puede ser más antiguo que el evento de especiación. El test de McDonald – Kreitman, así como el test de Tajima, comparan la tasa de variabilidad en sitios sinónimos y no sinónimos, pero lo hace tanto a nivel intra como interespecífico (McDonald y Kreitman 1991). Bajo un escenario de evolución completamente neutral, la variabilidad dentro de una especie y la tasa de evolución entre especies (i.e. la tasa de sustitución) se encuentran relacionadas linealmente a la tasa de mutación neutral. Bajo el modelo alternativo de evolución adaptativa de las proteínas, se espera que las sustituciones de reemplazo entre especies sean relativamente más abundantes que dichos cambios dentro de una misma especie (Kreitman 2000). En este capítulo, este test fue realizado comparando a *C. australis* y *C. talarum*. Aunque cada uno de los tests realizados para analizar los datos de variabilidad de loci de MHC puede proporcionar resultados significativos por otros factores que no sean la acción de la selección, desvíos consistentes de la neutralidad en múltiples tests proveen evidencia más robusta de la influencia de la selección natural sobre los patrones de variabilidad de DRB y DQA.

Tests de selección basados en la composición nucleotídica de los alelos.- Para esta sección, se emplearon los mismos tests estadísticos detallados en el capítulo anterior.

RESULTADOS

Para ambas especies de ctenómidos, todas las muestras produjeron una única banda claramente resuelta cuando fueron amplificadas utilizando los primers para DRB y DQA. Luego de clonar, no se obtuvieron más de dos secuencias por individuo, sugiriendo que se amplificó una única copia de cada gen. Las comparaciones con las secuencias de MHC depositadas en el GenBank revelaron una similitud mayor al 80% entre otras secuencias de taxa de mamíferos y las secuencias de DRB y DQA obtenidas para *C. australis*. No se detectaron inserciones ni deleciones entre las secuencias obtenidas y, cuando éstas fueron traducidas a secuencias proteicas, no se encontraron codones de stop en los exones examinados. En forma conjunta, estos resultados sugieren que los datos no fueron afectados por la presencia de pseudogenes.

Variabilidad de DRB y DQA.- Para *C. australis*, se detectó un total de 10 alelos del exón 2 de DRB, mientras que se detectaron 9 variantes alélicas del exón 2 de DQA (Tabla 1). Para el intrón 2 de DQA, fueron encontrados 8 alelos; en general, el promedio de diferencias nucleotídicas apareadas, el número de sitios polimórficos y el grado de divergencia molecular entre alelos fue mayor para el exón 2 de DRB que para el exón 2 de DQA, mientras que la heterocigosis observada fue mayor para este último. Además, ambos exones exhibieron mayores niveles de diversidad haplotípica, y el número de promedio de diferencias nucleotídicas apareadas fue más alto para los exones que para el intrón (Tabla 1). Para *C. talarum*, se detectaron 6 alelos del exón 2 de DRB y 3 variantes alélicas del exón 2 de DQA (Tabla 1). Por último, se encontraron 4 alelos del intrón 2 de DQA. En forma similar a *C. australis*, ambos exones exhibieron mayores niveles de diversidad molecular que el intrón 2 de DQA; en particular, las heterocigosis

Tabla 1.- Diversidad de MHC en *C. australis* y *C. talarum* en Necochea, Argentina. Se presentan los datos de número de alelos, heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e), número promedio de diferencias nucleotídicas (k), diversidad nucleotídica (P_i) y diversidad haplotípica (H_d) para los exones 2 DRB y DQA y para el intrón 2 de DQA. Los tamaños muestrales consistieron en 34 adultos de *C. australis* y 30 adultos de *C. talarum* (ver capítulo 3).

Especie	Locus	Número de alelos	H_o	H_e	Número de sitios polimórficos	H_d	P_i	k
<i>C. australis</i>	DRB exón 2	10	0.265	0.274	27	0.249 (0.07)	0.003 (0.002)	0.823
	DQA exón 2	9	0.441	0.446	12	0.424 (0.07)	0.004 (0.003)	0.723
	DQA intrón 2	8	0.206	0.223	10	0.197 (0.065)	0.001 (0.005)	0.352
<i>C. talarum</i>	DRB exón 2	6	0.630	0.600	8	0.608 (0.034)	0.008 (0.0004)	3.53
	DQA exón 2	3	0.649	0.583	3	0.640 (0.29)	0.0082 (0.004)	1.45
	DQA intrón 2	4	0.393	0.389	4	0.406 (0.101)	0.010 (0.001)	0.70

observadas y las diversidades haplotípicas y nucleotídicas fueron mayores para los exones que para el intrón.

Finalmente, mientras que el número de alelos fue mayor para el tuco-tuco de las dunas que para el tuco-tuco de las Talas, los niveles de heterocigosis observados para los dos exones y el intrón fueron mayores para *C. talarum*. Asimismo, la diversidad haplotípica y la nucleotídica fueron más altas para el tuco-tuco de los talas.

Evidencia de selección.- En general, los tests para detectar selección basados en frecuencias alélicas realizados para los exones de DRB y DQA no exhibieron evidencia significativa de la acción de la selección para *C. australis* (Tabla 2). En cambio, el exón 2 de DQA exhibió evidencia significativa de selección balanceadora en *C. talarum* (Tabla 2). De acuerdo a lo esperado, los análisis del intrón 2 del locus DQA no revelaron evidencia de selección en ninguna de las especies estudiadas (Tabla 2). Para *C. australis*, los estimadores del D de Tajima para ambos exones de MHC y para el intrón 2 de DQA fueron significativamente negativos (Tabla 2), sugiriendo un exceso de alelos a bajas frecuencias. Por el contrario, los estimadores del D de Tajima fueron positivos para ambos exones examinados en *C. talarum*, aunque únicamente el D calculado para el exón 2 de DQA resultó significativamente diferente de cero. Asimismo, para esta especie, el estimador del D de Tajima obtenido para el intrón 2 de DQA, aunque no significativo, fue negativo. Por lo tanto, ambos exones y el intrón de los genes de MHC examinados exhibieron patrones coincidentes de variabilidad a nivel poblacional para *C. australis*, pero no para *C. talarum*. El test de McDonald – Kreitman no proporcionó evidencia significativa de desvíos con respecto a lo esperado bajo neutralidad para ninguno de los loci analizados (DRB: P Exacto de Fisher = 1; DQA: P Exacto de Fisher = 0.73).

Tabla 2.- Se presentan los resultados de los tests estadísticos aplicados para detectar los efectos de la selección operando sobre loci de MHC a nivel poblacional. Las muestras consistieron en 34 adultos de *C. australis* (presente capítulo) y 30 adultos de *C. talarum*. (ver capítulo 3). Los asteriscos representan desvíos significativos de lo esperado bajo condiciones de neutralidad (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).

Especie	Locus	Test de selección a nivel poblacional		
		Hardy –Weinberg	Ewens-Watterson	Tajima
<i>C. australis</i>	DRB exón 2	n.s.	n.s.	D = -2.696**
	DQA exón 2	n.s.	n.s.	D = -2.000*
	DQA intrón 2	n.s.	n.s.	D = -2.255*
<i>C. talarum</i>	DRB exón 2	n.s.	n.s.	D = 0.615
	DQA exón 2	**	*	D = 2.480*
	DQA intrón 2	n.s.	n.s.	D = -0.185

Para *C. australis* y en ambos exones examinados, la evidencia de la acción de selección positiva, basada en el cálculo de d_N/d_S y en los cocientes de máxima verosimilitud, fue mayor que aquella a nivel poblacional. Para DRB, el exón de 270 pb se tradujo en una secuencia proteica de 90 aminoácidos, incluyendo 16 posibles sitios de unión al antígeno (PBR, Brown et al. 1993). Seis (30%) de los 20 aminoácidos variables se encontraron localizados dentro del PBR, mientras que los residuos variables restantes se encontraban situados inmediatamente adyacentes a esta región. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el exón completo, así como también para el PBR, la hélice α y la lámina β (subregiones del exón de DRB, ver Tabla 3). Aunque el exón entero no presentó valores de d_N/d_S mayores que 1, la hélice α presentó un valor mayor que 1. Sin embargo, este valor no fue significativamente diferente de lo esperado bajo neutralidad. Para este locus, los tests de cociente de verosimilitud (likelihood ratio tests: LRT) no revelaron diferencias en el ajuste de los distintos modelos (M0 y M3: $2\Delta L = 1.982$, $gl = 4$, n.s.; M2 y M3: $2\Delta L = 0$, $gl = 2$, n.s., Tabla 4). Para DRB, los valores de d_N/d_S para *C. talarum* de la población de Necochea son reportados en el capítulo 3, siendo menores que para *C. australis* para ambos exones examinados. Además, los valores de LRT no mostraron diferencias significativas entre el ajuste de los diferentes modelos evaluados. La topología de las redes de alelos (MST) que conectan a los 10 alelos de DRB encontrados en *C. australis* reveló un único alelo en alta frecuencia, mientras que los 9 restantes fueron alelos únicos. De estos, 6 se encontraron separados del alelo más frecuente por 1-2 sustituciones, mientras que los otros 3 diferían en 4-7 cambios mutacionales (Figura 1). *C. talarum*, por otro lado, presentó una situación completamente distinta, con un menor número de alelos con frecuencias similares en la

Tabla 3. - Se presentan las proporciones de tasas de sustitución no sinónimas (d_N) a sinónimas (d_S) de dos loci de MHC clase II. Los datos pertenecen a dos poblaciones simpátricas de *C. australis* ($n = 34$) y *C. talarum* ($n = 30$; capítulo 3) en Necochea, Argentina. N representa el número de codones examinados para cada exón. Los valores de P provienen de los tests z empleados para comparar las proporciones d_N/d_S contra un valor de 1.0, esperado bajo neutralidad. Los datos de (A) corresponden al exón 2 del locus DRB. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el fragmento de 270 pb secuenciado, así también como para las subregiones de este exón (Brown et al. 1988, 1993) indicadas arriba. Los datos en (B) corresponden al exón 2 del locus DQA. Los valores de d_N/d_S fueron calculados para el fragmento completo de 177 pb secuenciado.

A. DRB (exón 2)

Especie	Porción del exón	N	d_N/d_S	P
<i>C. australis</i>	entero	900.25		ns
	Lámina β	56	0.11	ns
	Hélice α	25	∞	ns
	PBR	161.00		ns
<i>C. talarum</i>	entero	910.50		ns
	Lámina β	56	0.47	ns
	Hélice α^1	25	0.00	--

PBR¹ 16 -- --

B. DQA (exón 2)

Especie	Porción del exón	N	d _N /d _S	P
<i>C. australis</i>	entero	590.83	ns	
<i>C. talarum</i>	entero	590.54	ns	

¹ No se detectaron sustituciones en esta subregión.

Tabla 4.- Se presentan los resultados de los tests de cociente de verosimilitud que comparan los diferentes modelos de tasas de sustitución de codones para los loci de MHC loci examinados en *C. australis* (presente capítulo; n = 34) y *C. talarum* (capítulo 3; n = 30). Los modelos de sustitución de codones analizados fueron: M0 (modelo de único cociente), M1 (modelo neutral), M2 (modelo de selección) y M3 (modelo discreto); los tests pareados fueron realizados de acuerdo a Yang et al. (2000). Para cada una de las comparaciones, el estadístico asociado al cociente de verosimilitud ($2\Delta L$) es presentado, como también los valores de P de cada uno de los tests de Chi cuadrado realizados de acuerdo a Yang et al. (2000).

Especies						
<i>C. australis</i>			<i>C. talarum</i>			
Locus	Comparación	P	Locus	Comparación		
DRB exón 2	M0 vs. M3	n.s.	DRB exón 2	M0 vs. M3	n.s.	
	M1 vs. M2	n.s.		M1 vs. M2	n.s.	
DQA exón 2	M0 vs. M3	n.s.	DQA exón 2	M0 vs. M3	n.s.	
	M1 vs. M2	0.012 *		M1 vs. M2	n.s.	

población de Necochea y separados entre sí por 1-4 sustituciones, aunque los alelos más alejados entre sí se encontraron separados por 8 sustituciones.

Para DQA, el exón de 177 pb se traduce en una secuencia de 59 aminoácidos. De estos, 9 resultaron residuos polimórficos. Dos de ellos (22%) se encontraban localizados en la región que se considera involucrada en la unión de péptidos extraños (ver Brown et al. 1988). La estructura del exón 2 de DQA no ha sido tan detalladamente caracterizada como la del exón 2 de DRB (Meyer y Thomson 2001) y, por lo tanto, no fue posible identificar las sub-regiones específicas de la secuencia de DQA (e.g. la hélice α) para un análisis más exhaustivo de la variación de esta región a nivel molecular. Como resultado, el cálculo de d_N/d_S fue realizado únicamente para el exón 2 completo, el cual no se desvió significativamente de lo esperado bajo neutralidad. Los LRT no revelaron diferencias significativas en el ajuste de los modelos M0 y M3. Sin embargo, la comparación entre los modelos M1 y M2 revelaron que M2 se ajustó significativamente mejor a los datos obtenidos, sugiriendo que la selección actúa o ha actuado en este exón (Tabla 4). De acuerdo a esto último, los residuos 11 y 14 fueron identificados como sujetos a niveles significativos de selección positiva dentro del exón 2 de DQA. Las proporciones d_N/d_S del exón 2 de DQA para *C. talarum* en la población de Necochea son reportadas en el capítulo 3, las cuales resultaron menores que aquellas para *C. australis* y, contrario a lo observado para el tuco-tuco de los médanos, los tests de LRT para *C. talarum* no detectaron la acción significativa de la selección positiva actuando sobre la molécula del exón 2 de DQA. Finalmente, el MST que conecta a los 9 alelos del exón 2 de DQA encontrados para *C. australis* mostró una topología similar a la observada para el exón 2

de DRB, con un único alelo encontrado a una frecuencia relativamente alta (Figura 1).

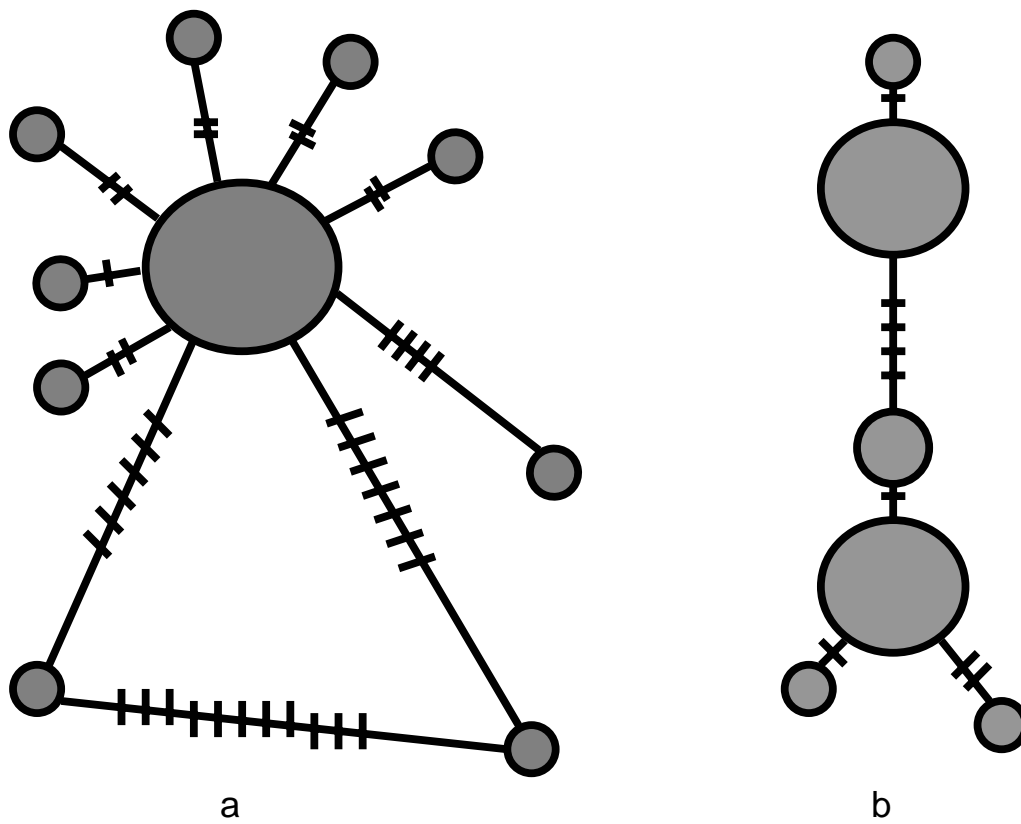


FIGURA 1a. -Minimum Spanning Tree para los alelos del exón 2 de DRB (1) de *C. australis* (a) y *C. talarum* (b).

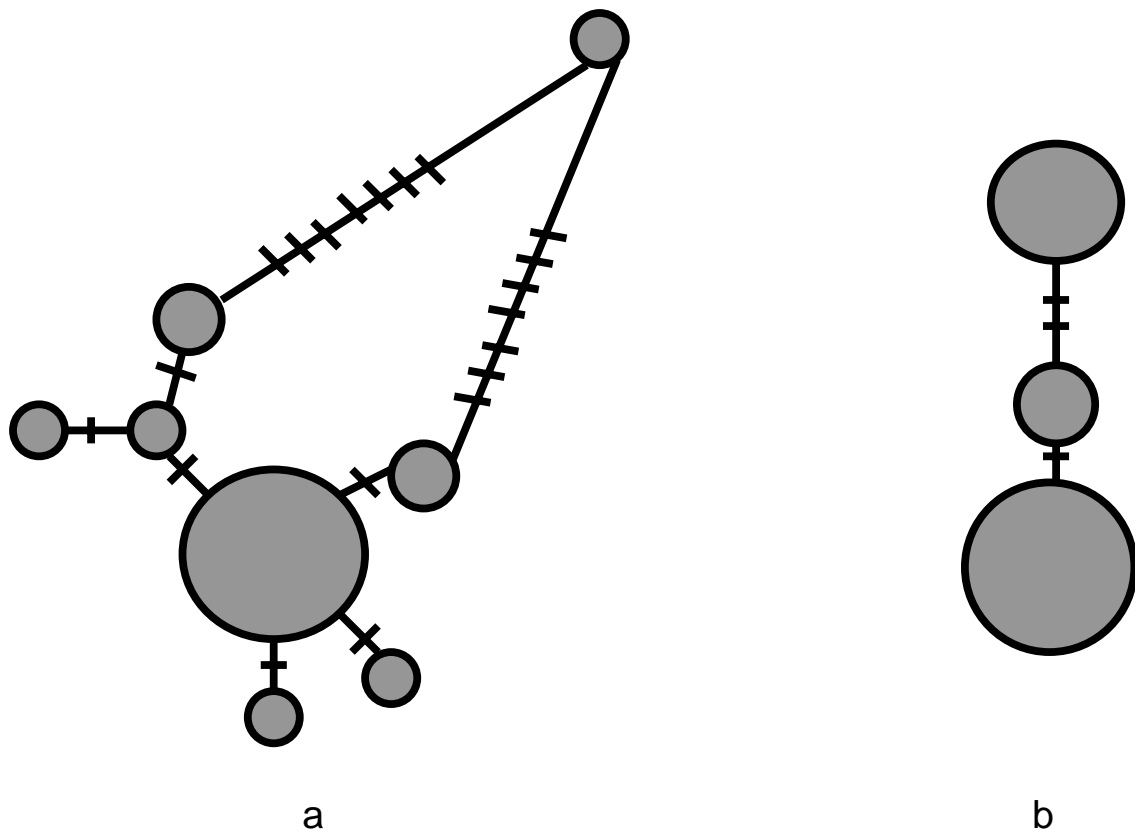


FIGURA 1b. -Minimum Spanning Tree para los alelos del exón 2 de DQA de *C. australis* (a) y *C. talarum* (b).

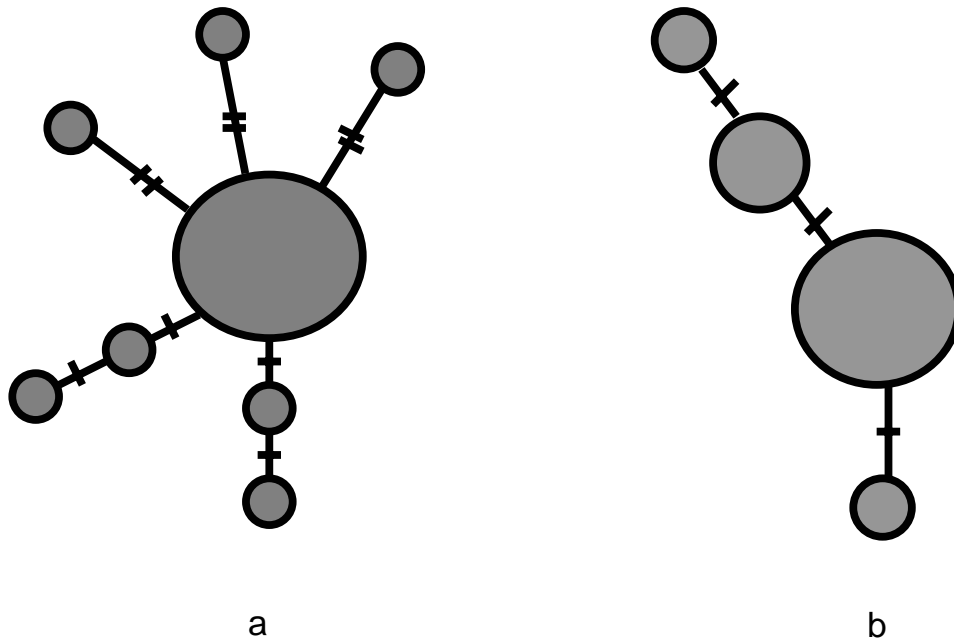


FIGURA 1c. -Minimum Spanning Tree para los alelos del intrón 2 de DQA de *C. australis* (a) y *C. talarum* (b).

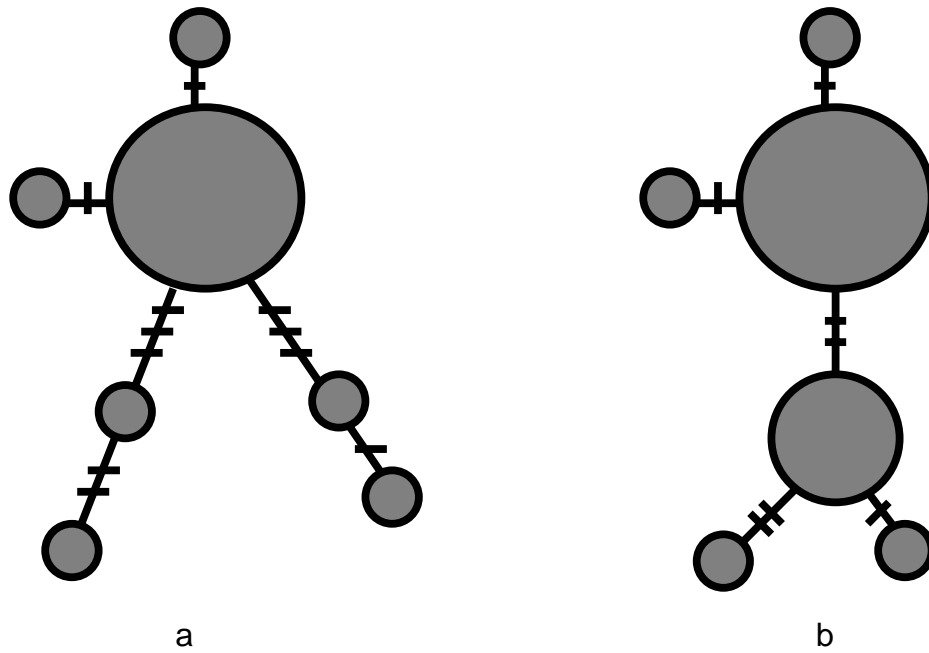


FIGURA 2.- Minimum Spanning Trees construidos a partir de la evidencia reunida empleando marcadores de ADNmt (región control) para *C. australis* (a) and *C. talarum* (b), modificado de Mora et al. (2006, en prensa).

Los 8 alelos restantes fueron encontrados a muy bajas frecuencias, la mayoría de ellos separados del alelo más frecuente por sólo 1-2 sustituciones. Por el contrario, Ctau_DQA0108 difirió del alelo más frecuente por 7 cambios nucleotídicos. Para *C. talarum*, en forma similar a lo observado para el exón 2 de DRB en esta especie, el patrón fue diferente al evidenciado por *C. australis*: el número de alelos fue menor y éstos se encontraron a frecuencias más balanceadas entre sí, mientras que las secuencias nucleotídicas difirieron en 1-3 sustituciones.

Para *C. australis*, la topología del MST observada para el exón 2 de DQA es muy diferente a la observada para el intrón 2 de este locus. Este último presentó una topología en “forma de estrella” más clara, con numerosos alelos únicos que solo diferían del más frecuente por 1-2 sustituciones (Figura 1); este patrón sugiere un posible evento de expansión demográfica, que concuerda con evidencia previa obtenida empleando un marcador de ADNmt (región control) para esta especie (Figura 2). Sin embargo, para *C. talarum* los resultados fueron diferentes; el intrón 2 de DQA mostró un MST con un número menor de alelos que para *C. australis*, sin una clara indicación de un evento de expansión demográfica en su pasado reciente. Por el contrario, el MST reconstruido para la población de *C. talarum* de Necochea a partir de la evidencia del intrón 2 de DQA sugiere un escenario histórico de mayor estabilidad.

DISCUSION

Tanto los niveles como los patrones de diversidad de los loci de MHC observados en poblaciones naturales se encuentran influidos por la intensidad de la selección balanceadora y por la historia demográfica de dichas poblaciones. Los resultados del presente capítulo sugieren que una expansión demográfica reciente ha afectado los patrones de variación de MHC en *C. australis*, de acuerdo a lo previamente sugerido por Mora et al. (2006); sin embargo, la acción de la selección balanceadora sobre estos loci a través de periodos más extensos aun puede ser detectada en esta especie a nivel molecular.

Evidencia de selección para C. australis.- Los efectos esperados de la selección balanceadora, la cual es considerada la fuerza predominante que actúa sobre los loci de MHC (Klein et al. 1998), incluyen el mantenimiento de varios alelos a frecuencias similares en la población junto con altos niveles de heterocigosis (Hedrick y Thomson 1983; Meyer y Thomson 2001). Ninguno de estos dos patrones esperados fue detectado para ninguno de los dos exones de MHC (exones 2 de DRB y DQA) examinados para *C. australis*. Por el contrario, los estimadores del D de Tajima resultaron significativamente negativos para ambos exones analizados, sugiriendo un exceso de alelos a bajas frecuencias, coincidente con un escenario evolutivo de expansión demográfica reciente o un evento de barrida selectiva (Harpending et al. 1998; Bertorelle y Slatkin 1995). Además, los patrones de variabilidad a nivel poblacional coincidieron para ambos exones y el intrón 2 de DQA examinado, sugiriendo que la variabilidad de estas tres regiones ha sido modelada esencialmente por las mismas fuerzas, siendo estas fundamentalmente de naturaleza neutral.

Existe evidencia adicional que apoya un efecto intenso de la deriva génica (asociada a eventos históricos) en el modelado de la variabilidad encontrada en los loci de MHC examinados, que proviene de las topologías de los MST. En general, ambos exones y el intrón mostraron patrones similares de organización de dicha variabilidad, con un único alelo común a frecuencias relativamente altas, conectado a varios alelos únicos separados de éste por un número reducido de sustituciones, patrón característico de un proceso de expansión demográfico reciente.

En particular, en base a evidencia molecular (región control de ADNmt) para *C. australis* ha sido propuesto un escenario de expansión demográfica reciente asociado a la formación del hábitat de dunas que ocupa esta especie, luego de las fluctuaciones del nivel del mar durante el Holoceno medio (Isla 1988, Isla et al. 2001). *C. australis* es un especialista estricto de este tipo de hábitat y muestra una fuerte asociación con las condiciones inestables del sistema de dunas costeras (Malizia et al. 1991, Zenuto y Busch 1995, 1998); por lo tanto, las poblaciones de esta especie son al menos tan antiguas como el ambiente de dunas en la región. Por otro lado, no se han encontrado restos fósiles de esta especie fuera de su área de distribución actual (Contreras y Reig 1965), apoyando la hipótesis de una reciente colonización y expansión a lo largo de las dunas costeras (Mora et al. 2006).

Se espera que los cambios nucleotídicos en las secuencias de ADN, particularmente la diversidad de aminoácidos en sitios funcionalmente importantes, indiquen la intensidad de selección a través de escalas temporales evolutivas. En este estudio, el d_N/d_S para los sitios PBR a través de todos los alelos del exón 2 de DRB y de los del exón 2 de DQA no difirió significativamente de 1. Es necesario considerar en esta

etapa del análisis la falta de conocimiento detallado sobre la estructura de proteínas de MHC de la especie de estudio, que por lo tanto puede conducir a la identificación incorrecta de los sitios de PBR. En general, se asume que la posición de estos sitios es conservada y por lo tanto que su posición puede ser asignada en base a la estructura tri-dimensional elucidada para la proteína de HLA-DRB1 de humanos (Brown et al. 1993). Sin embargo, esta estructura puede diferir de la estructura de esta molécula en otras especies de mamíferos. De hecho, se ha demostrado que la posición de estos sitios involucrados en la unión y reconocimiento de péptidos extraños puede variar incluso entre alelos diferentes del mismo locus (i.e. Freemont et al. 1998, Scott et al. 1998, Latek et al. 2000). Además, aunque los estudios de estructura proteica pueden identificar acertadamente los sitios de PBR, no todos ellos se encuentran bajo la acción de la selección balanceadora. En este contexto, se vuelve particularmente útil el uso de modelos de máxima verosimilitud para evaluar el rol de la selección positiva y la presencia de sitios bajo distintos tipos de selección. Para este estudio en particular, a través de los tests de cociente de verosimilitud (LRT) realizados, fue posible identificar la acción de la selección positiva sobre el exón 2 de DQA pero no sobre el exón 2 de DRB para *C. australis*.

Aunque fue previamente mencionado que los MST para ambos exones y el intrón de MHC examinados en este estudio presentaron en general un patrón similar, los exones de MHC difirieron del intrón 2 de DQA, ya que algunos alelos de cada exón fueron más divergentes con respecto al alelo mas común que la mayoría de los alelos restantes. A este respecto, en otros estudios que han involucrado al oryx de Arabia (Hedrick et al. 2000) y a los lobos de pelaje colorado (Hedrick et al. 2002) ha sido postulado que los

alelos de MHC que pasan a través de un cuello de botella y una posterior expansión demográfica son más diferentes que un grupo de alelos tomados al azar, sugiriendo que la selección ha favorecido el mantenimiento de alelos funcionalmente divergentes. De acuerdo a esto, en el presente estudio, la mayoría de los cambios nucleotídicos presentes en el alelo más divergente del exón 2 de DQA fueron no sinónimos (5 de 8) y 2 de los 4 cambios en residuos aminoacídicos involucraron codones identificados como blanco de la acción de selección positiva por los LRT. Se observó un patrón similar para DRB, en donde los dos alelos más divergentes demostraron una mayoría de cambios no sinónimos y presentaron varios cambios aminoacídicos en el mismo codón (45), sugiriendo que este sitio podría ser funcionalmente importante.

Existe otro escenario alternativo posible que podría explicar el patrón delineado anteriormente. Los cuellos de botella, al contrario de la expansión demográfica poblacional, pueden imitar la acción de la selección balanceadora manteniendo varios alelos o clases de alelos a lo largo de un período de tiempo extenso. Sin embargo, si esta fuera la situación para *C. australis*, la señal de un cuello de botella debería ser evidente también en el intrón 2 de DQA, lo cual no ocurre. Por lo tanto, estos resultados sugieren que una expansión poblacional reciente es un escenario más probable que un evento de cuello de botella para describir la historia demográfica de *C. australis* (coincidente con estudios previos para esta especie, ver Mora et al. 2006); aunque este evento histórico ha impactado sobre los patrones de variabilidad de los loci de MHC examinados, la selección parece haber jugado un rol importante en el mantenimiento de varios alelos divergentes en la población estudiada.

Finalmente, no es posible descartar la hipótesis de que dichos alelos divergentes podrían haber arribado a la población por flujo génico desde poblaciones aledañas. Por lo tanto, se planean estudios futuros para examinar la conectividad entre poblaciones costeras de *C. australis* empleando regiones de microsatélites (Mora et al. enviado). Por otro lado, resta ser evaluada la influencia de características ecológicas y demográficas actuales de las poblaciones de *C. australis* sobre la intensidad de selección operando actualmente sobre los loci de MHC, asociando dichos rasgos con la diversidad de fauna parasitaria a la cual se encuentran expuestas dichas poblaciones.

Comparaciones de los niveles y patrones de variabilidad de MHC entre C. talarum y C. australis.- A nivel poblacional, la variabilidad de los exones de MHC examinados fue mayor para *C. talarum* que para *C. australis*, los valores de heterocigosis fueron mayores en el tuco-tuco de los Talas y sólo en esta especie se detectó un exceso de heterocigosis significativo en el exón 2 de DQA, así como frecuencias alélicas más balanceadas que lo esperado bajo neutralidad (ver capítulo anterior). Por otro lado, contrario a lo observado en el tuco-tuco de los médanos, los estimadores del D de Tajima para *C. talarum* no resultaron significativamente diferentes de 0, excepto para el estimador del valor de D calculado para el exón 2 de DQA, que resultó significativamente positivo, sugiriendo un exceso de alelos a frecuencias intermedias. Aunque la evidencia de selección obtenida a partir de tests basados en el cálculo de frecuencias alélicas resultó más notable para el tuco-tuco de los Talas, se observó el patrón reverso en cuanto a la evidencia de selección obtenida a partir del d_N/d_S y de los tests de cocientes de máxima verosimilitud. Entre especies, la divergencia entre los alelos de los exones 2 de MHC de *C. australis* fue mayor que la observada en *C. talarum*. Únicamente en el tuco-tuco de las

dunas se observó un d_N/d_S mayor que 1 para DRB, y solamente para esta especie se detectó evidencia significativa de la acción de la selección positiva sobre codones específicos del exón 2 de DQA. Finalmente, las topologías de los MST observadas para las tres regiones (exones 2 de DRB y DQA e intrón 2 de DQA) en *C. talarum* mostraron una situación de equilibrio, con menos alelos que aquellos encontrados para *C. australis* pero presentes a frecuencias intermedias. Este patrón coincide con el escenario del pasado reciente propuesto para esta especie, que involucra un proceso de diferenciación por deriva génica y flujo génico limitado sugerido también a través del uso de marcadores de ADNmt (Mora et al. enviado).

En resumen, entre las especies estudiadas, la variación del MHC medida a partir de niveles de heterocigosis y balance de las frecuencias alélicas parece ser mayor para *C. talarum*, mientras que la evidencia de selección obtenida a partir de d_N/d_S y cocientes de máxima verosimilitud resulta más alta para *C. australis*. Este patrón sugiere que la selección diversificadora podría haber actuado con intensidad variable y a través de períodos de tiempos diferentes en estas especies. Los patrones actuales de variabilidad de MHC de los exones 2 de DRB y DQA en *C. australis* parecen haber sido modelados predominantemente por los eventos demográficos recientes (expansión), sin embargo, los niveles y patrones de diversidad molecular de los exones examinados sugieren que la acción de la selección ha actuado sobre estos loci a través de tiempos evolutivos. En particular, la evidencia de selección obtenida al explorar la composición nucleotídica de las diferentes clases alélicas fue significativa únicamente para *C. australis*, a pesar del rol significativo de la deriva génica asociado con el evento de expansión demográfica experimentado por esta especie. Esto sugiere que la intensidad de la selección

diversificadora que ha actuado sobre los loci de MHC a través de tiempos evolutivos ha sido probablemente mayor para el tuco-tuco de los médanos que para el tuco-tuco de los Talas.

Finalmente, se ha propuesto que la exposición a patógenos es el factor principal asociado a la selección diversificadora que opera sobre los exones de MHC (Hughes y Yeager 1998). Poulin y Morand (1999) sugirieron que distancias filogenéticas y geográficas pequeñas entre poblaciones de diferentes especies podría incrementar la similitud entre los componentes de su comunidad parasitaria. Bajo esta hipótesis, las poblaciones simpátricas de *C. australis* y *C. talarum* deberían haber compartido uno o varios alelos de MHC, como consecuencia de estar sujetas a presiones de selección similares ejercidas por una fauna parasitaria similar. Este no es el caso para las poblaciones examinadas en este estudio, y podría estar asociado con la relativamente reciente colonización del ambiente de las dunas por parte de *C. australis* en comparación con *C. talarum*. En este momento, se encuentra bajo desarrollo un proyecto que tiene como objetivo comparar la diversidad de la fauna parasitaria de estas dos especies (Rossin et al., datos no publ.) que contribuirá a clarificar este punto. Por otro lado, para evaluar cuán similares son los alelos de MHC de estas dos especies, es necesario realizar este análisis en un contexto taxonómicamente más amplio, incluyendo otras especies del género *Ctenomys*, y analizando los patrones de evolución de los loci de MHC a través de este género. Este análisis es desarrollado en detalle en el siguiente capítulo de esta tesis.

CAPITULO 5

PATRONES DE EVOLUCIÓN DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL GÉNERO *CTENOMYS*.

AGRADECIMIENTOS: A todos los laboratorios y museos que cedieron muestras de tejido para llevar a cabo los análisis de este estudio: Laboratorio de Evolución, Universidad de la República, Uruguay, Museum of Southwestern Biology, Albuquerque, USA, Museum of Vertebrate Zoology, UC Berkeley, USA, Laboratorio de Ecofisiología, UNMdP. A David Vieites especialmente, por su asesoramiento constante en la etapa de análisis de las relaciones filogenéticas de las especies de *Ctenomys* y de sus alelos de MHC. A Margareth Smith por haber generado la secuencia de citocromo b de *C. sociabilis* empleada en este trabajo.

*Patrones de evolución del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el género**Ctenomys***INTRODUCCIÓN**

Los genes contenidos en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), como he mencionado en los capítulos anteriores, se encuentran involucrados en el reconocimiento de antígenos extraños y su presentación a los linfocitos T y, por lo tanto, son esenciales en la activación de la respuesta inmune adaptativa (Klein 1986, Roitt 1997). Existen cuatro líneas de evidencia a favor de la hipótesis de que el alto polimorfismo de los genes de MHC es mantenido por selección balanceadora: 1) frecuencias alélicas balanceadas a nivel poblacional, 2) exceso de sustituciones no sinónimas en las regiones codificantes, 3) diferencias en el patrón de evolución de los exones e intrones y 4) mantenimiento de linajes alélicos en diferentes especies (Hughes 2002). En cuanto a la última línea de evidencia, la retención de alelos entre especies por períodos más extensos que lo esperado bajo evolución neutral se denomina polimorfismo trans-específico (Klein 1980, 1987) y puede ser el resultado de la acción de la selección balanceadora a través de la historia evolutiva de un grupo de organismos, causando que los árboles de genes sujetos a este tipo de selección no provean una hipótesis precisa de las relaciones entre especies. Para especies cercanamente emparentadas, este patrón es explicado por la existencia de un ancestro común – la persistencia de linajes alélicos a través de eventos de especiación y su pasaje de una especie a otra (Klein 1980, 1987), mientras la presencia de aminoácidos compartidos en posiciones polimórficas entre especies lejanamente emparentadas ha sido explicado tanto por descendencia directa (involucrando la acción conjunta de recombinación intragénica y de selección balanceadora, ver Lundberg y McDevitt 1992) como por evolución convergente (también invocando la acción de la selección natural,

ver Gustaffson et al. 1990, Anderson et al. 1991, Kriener et al. 2000). En los mamíferos, ejemplos de este tipo de evolución han sido encontrados en carnívoros (Hedrick et al. 2001a, Seddon y Ellegren 2002), ungulados (Van Den Bussche et al. 1999, Hedrick et al. 2001b, Schaschl et al. 2006), primates (Otting et al. 2002) y roedores (Figuerola et al. 1988, Edwards et al. 1997, Seddon y Baverstock 1999, Musolf et al. 2004, Bryja et al. 2006).

La evolución de los loci de MHC se encuentra intrínsecamente ligada a la historia de los organismos en los cuales han evolucionado. Por lo tanto, para comprender mejor los mecanismos que han creado y mantenido los polimorfismos genéticos de los alelos de MHC, es necesario considerar cómo el modo y las tasas de especiación han dado forma a la evolución de los linajes alélicos, incluyendo en el análisis a aquellos grupos que han sufrido eventos de especiación relativamente recientes (ver Dixon et al. 1996) o en los cuales la historia evolutiva está bien documentada (ver Musolf et al. 2004). Por otro lado, los niveles de variabilidad de estos loci también pueden ser afectados por los atributos demográficos y las historias de cada una de las especies consideradas (i.e. Millar y Whitler 1997). En este sentido, la necesidad de extender los estudios sobre el MHC a especies no tradicionales y considerar la importancia de dichas fuerzas en la evolución de estos genes ha sido enfatizada en recientes revisiones realizadas por Bernatchez y Landry (2003) y Piertney y Oliver (2006).

Como ha sido expuesto por Lessa (2000), los roedores subterráneos han sido el centro de gran controversia y debate sobre varios temas de la biología evolutiva, siendo uno de los de mayor importancia aquel que se enmarca dentro del campo de la genética evolutiva: el debate neutralismo-seleccionismo. En particular, la diversidad de especies del género *Ctenomys* ha sido el foco de numerosos estudios sobre tasas de diversificación y macroevolución (Vrba y Gould 1986, Cook y Lessa 1998, Lessa y

Cook 1998, Slamovits 2001, Castillo et al. 2005). Más de 56 especies forman parte de este género y se encuentran distribuidas en las zonas templadas de América del Sur, al sur del Río Amazonas. El gran número de especies de *Ctenomys* se propone ha sido el resultado de un proceso de diversificación explosivo en la historia temprana del género (hace aproximadamente 2 m.a.), revelado a partir de marcadores nucleares y mitocondriales (~ 1,2 – 1,3 m.a., Cook y Lessa 1998, Lessa y Cook 1998, Slamovits 2001, Castillo et al. 2005) y de evidencia del registro fósil (2 - 3 m.a., Mones y Castiglioni 1979, Verzi 2002).

Eventos de rápida diversificación como los propuestos para el género *Ctenomys* han sido invocados para explicar la persistencia de polimorfismo neutral a través de la fase de especiación en peces cíclidos (Nagl et al. 1998) en una forma que asemeja a la acción de la selección balanceadora. Al mismo tiempo, la diversificación evolutiva de este y otros grupos de roedores ha sido asociada con las características demográficas de los mismos, incluyendo su distribución en poblaciones relativamente pequeñas y la consecuente acentuada estructuración geográfica (Steinberg y Patton 2000). A su vez, se propone que estas características conducen a niveles bajos de polimorfismo.

Particularmente para el MHC, se ha propuesto que la demografía y la organización social juegan un rol preponderante en la modelación de la intensidad de selección actuando sobre estos loci en tuco-tucos (Hambuch y Lacey 2002) y ratas topo (Kundu y Faulkes 2004).

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo es, por un lado, detectar evidencia de la acción de la selección sobre los exones de dos genes de la clase II de MHC a través de numerosas especies del género *Ctenomys* y, por otro lado, analizar si existe polimorfismo trans-específico y determinar si éste refleja la acción de la selección que resulta en la conservación de alelos que existían antes de los eventos de especiación de

los ctenómidos. Si ocurre polimorfismo trans-específico en los loci de MHC examinados, se espera que los alelos encontrados dentro de una especie dada se encuentren más cercanamente emparentados a alelos de otras especies que a otros alelos co-específicos. Este patrón puede ser el resultado de la acción de la selección balanceadora o simplemente del mantenimiento del polimorfismo a través de eventos recientes de rápida especiación. Si el polimorfismo trans-específico es el resultado de la acción de la selección balanceadora, se espera encontrar evidencia de la acción de selección diversificadora (positiva) a través del análisis de la composición nucleotídica y aminoacídica de las moléculas de MHC.

Con el fin de explorar la interacción y complejidad de las fuerzas que han modelado la evolución de los loci de MHC en el género *Ctenomys*, se examinó la diversidad alélica en dos loci de MHC clase II (exones 2 de DRB y DQA) en 18 especies de tucos y una especie del género *Octodon*, cercanamente emparentado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes examinados.- Como parte de las comparaciones intraespecíficas detalladas en los capítulos 3 y 4 de esta tesis, se colectaron muestras de tejido de 60 individuos de *Ctenomys talarum* en Mar de Cobo y Necochea, así como de 34 individuos de *C. australis* de Necochea y 35 individuos de *C. sociabilis* y de *C. haigi* (Lacey, datos no publicados) de Estancia Rincón Grande (Pcia. De Río Negro) y Estancia San Ramón (Pcia. De Neuquén) respectivamente. Muestras de tejido de hígado de 5 individuos de cada una de las siguientes especies fueron cedidas por el Laboratorio de Evolución, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay: *C. rionegrensis* (números de acceso de la colección, NAC: EV 1072-76), *C. torquatus* (NAC: EV 1751-55) y *C. pearsoni* (NAC: EV 1450-1454). Además, se recibieron muestras de tejido de *C. porteusi* colectadas en Bonifacio, Buenos Aires por el Dr. Kittlein y el Lic. Mapelli, Laboratorio de Ecofisiología, UNMdP. Muestras de tejido de hígado de las siguientes 5 especies fueron provistas por el Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico como parte de análisis previos de MHC en *Ctenomys* (Hambuch 2000): 2 especímenes de *C. boliviensis* (NAC: 12606, 12607), un *C. frater* (NAC: 14622), un *C. goodfellowi* (NAC: 13029), 2 individuos de *C. opimus* (NAC: 11516, 11550), 2 *C. conoveri* (NAC: 12606, 12607) y 2 especímenes de *C. steinbachi* (NAC: 12133, 12134). Tejidos de corazón y hígado de las siguientes especies fueron provistos por el Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley: 2 individuos de *C. argentinus* (NAC: 5543, 5544), un *C. maulinus* (NAC: OPP 8093), un espécimen de *C. mendocinus* (NAC: 5507), un *C. pearsoni* (NAC: MFS 1363), un *C. bonettoi* (NAC: 179148) y dos individuos de *Octodon sp.* (NAC: JLP 16533, 16534), que fueron empleados como grupo externo en los análisis filogenéticos, de acuerdo con Lessa y Cook (1998) y Castillo et al. (2005). Para aquellos sets de datos que provienen de

estudios poblacionales de variabilidad de MHC, sólo aquellos alelos más frecuentes fueron incluidos en los análisis de este capítulo, basados en las distribuciones de frecuencias alélicas del exón 2 de DRB, exón 2 de DQA e intrón 2 de DQA de cada una de las especies involucradas.

Extracción de ADN, amplificación, clonado y secuenciación.- Se empleó la misma metodología descrita en el capítulo 3 para analizar la variabilidad del exón 2 de DRB, el exón 2 de DQA y el intrón 2 de DQA en las especies de *Ctenomys* mencionadas anteriormente.

Detección de selección.- Los análisis para detectar selección fueron realizados con el programa CODEML, contenido en la versión 3.11 de PAML (Yang 2001), el cual ya fue descrito en los capítulos anteriores. Las seis distribuciones examinadas fueron: M0 (one ratio: una proporción única), el cual asume la misma razón ω para todos los codones, M1a, que asume que los codones son conservados ($\omega = 0$) o neutrales ($\omega = 1$), M2a (Selección Positiva), el cual incorpora una tercera clase de codones con valores irrestrictos de ω (e.g., $\omega > 1$), M3 (discreto), el cual estima la proporción de codones conservados, neutrales e irrestrictos a partir de los datos, M7 (beta), el cual no permite sitios sujetos a selección ($0 < \omega < 1$) y M8 (beta y ω), que adiciona una clase de sitios adicional al modelo beta, que considera aquellos bajo selección positiva (Yang et al. 2000, los detalles de los modelos M1a y M2a son provistos por Yang et al. 2005). Los tests de razones de verosimilitud fueron empleados para comparar M0 con M3, M1a con M2a y M7 con M8. De acuerdo a Yang et al. (2000), cuando los modelos alternativos M2a, M3 y M8 sugieren la presencia de codones con $\omega > 1$, esto puede ser interpretado como evidencia de selección positiva. De acuerdo con esto, las comparaciones de M0 y M3 pueden ser empleadas para detectar la presencia de valores variables de ω entre codones de la misma secuencia. Una vez que los estimadores de

máxima verosimilitud para cada modelo han sido obtenidos, se emplean las probabilidades bayesianas (método incluido en los modelos M2a y M8) para analizar si codones específicos pueden ser conservados, neutrales o sujetos a selección positiva (Nielsen y Yang 1998). Si las probabilidades posteriores de ω para ciertas clases de sitios son > 1 (calculado como el promedio de ω a través de todas las clases de sitios pesadas por las probabilidades posteriores), entonces es probable que estos sitios se encuentren sujetos a selección positiva (Yang et al. 2005).

Análisis filogenéticos.- Con el fin de analizar las relaciones entre los alelos de MHC considerando las relaciones históricas hipotéticas entre las especies de ctenómidos, los árboles filogenéticos construidos en base a las secuencias de MHC fueron comparados con un árbol construido en base a secuencias de 1140 pb de citocromo b mitocondrial. Las secuencias de este locus para todas las especies involucradas en los análisis de este capítulo fueron obtenidas del GenBank (números de acceso provistos por Lessa y Cook 1998), excepto aquella de *C. sociabilis* que fue generada como parte de este estudio. Para los análisis filogenéticos que involucran a los genes de MHC, *Octodon* sp. fue empleado como grupo externo a los *Ctenomys* spp., mientras que para los análisis filogenéticos basados en citocromo b, *Octodon* sp. así como *Tympanoctomys barrerare* y *Spalacopus cyanus* fueron empleados como grupos externos, de acuerdo a Lessa y Cook (1998) y Castillo et al. (2005). Para todos los análisis filogenéticos realizados, se emplearon las técnicas de Markov-Chain Monte Carlo (MCMC) – Bayesianas implementadas en el programa Mr Bayes 2.0 (Huelsenbeck y Ronquist 2001). El procedimiento ModelTest (Posada y Crandall 2001) fue utilizado para elegir el modelo más ajustado de sustitución nucleotídica y de distribución de tasas de variación entre sitios nucleotídicos (invgamma para citocromo b y el exón 2 de DRB, gamma para el exón 2 y el intrón 2 de DQA). Cuatro cadenas separadas de MCMC (una fría y tres

calientes) fueron corridas por 1.0×10^6 generaciones y muestreadas cada 100 generaciones para dar lugar a una muestra de 10000 árboles. Los scores de log-likelihood de los puntos muestreados fueron graficados vs. el tiempo generacional para analizar el tiempo que tomaba alcanzar la estacionalidad de los scores (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Los primeros 1000 puntos muestreados fueron descartados y los restantes 9000 fueron empleados para derivar el árbol consenso al criterio del 50% con las probabilidades posteriores de los clados. Además, se obtuvieron el/los árboles más parsimoniosos empleando PAUP versión 4.0b10 (Swofford 2002), con pesos equivalentes para todos los sitios, búsquedas heurísticas con 1000 réplicas y optando por “steepest descent” y “tree-bisection reconnection (TBR)” para el algoritmo de intercambio de ramas. Los análisis de bootstrap fueron realizados en el PAUP empleando el mismo modelo con parámetros fijos que fuera determinado con el ModelTest, para resolver un árbol de máxima verosimilitud. Para los loci de MHC, los métodos bayesianos y de máxima verosimilitud no brindaron un buen soporte para ninguno de los clados propuestos. Por lo tanto, las relaciones entre los alelos de los exones de DRB y DQA y del intrón de DQA fueron representadas con el programa PAUP, empleando el criterio de “neighbor joining”; para cada una de las filogenias inferidas. Se realizó un análisis de bootstrap (2000 réplicas) con el fin de determinar la confiabilidad del patrón de bifurcación.

Detección de polimorfismo trans-específico.- Se empleó Arlequín (Schneider et al. 2000) para realizar la búsqueda de secuencias nucleotídicas (alelos) compartidas entre especies y el programa MEGA (Kumar et al. 2001) para buscar secuencias aminoacídicas compartidas, construyendo una matriz de distancia, calculando las diferencias apareadas de residuos aminoacídicos. El promedio de las distancias apareadas entre secuencias nucleotídicas de MHC fueron calculadas utilizando el

modelo de dos parámetros de Kimura, mientras que para las secuencias aminoacídicas, se calculó la distancia corregida de Poisson, como se implementa en MEGA (Kumar et al. 2001). El test no paramétrico de Wilcoxon apareado fue aplicado para comparar el número de alelos del exón 2 de DRB y de DQA, así como también el número de alelos del exón 2 de DQA y el del intrón 2 de este loci (STATISTICA VERSIÓN 5.5, Statsoft Inc.).

Detección de recombinación.- La recombinación a nivel molecular puede reducir los efectos de la estocasticidad evolutiva, promediando las historias genealógicas a través del genoma completo (Mc Vean et al. 2002). Al intercambiar fragmentos de las secuencias de interés, la recombinación debería hacer más cortas las distancias entre ellas, aumentando la similitud entre las mismas ((Schierup et al. 2001). Para los mamíferos, la evidencia que apoya la conversión génica (recombinación intra-locus) es equívoca (Richman et al. 2003a, b, Schaschl et al. 2005, 2006, Bryja et al. 2006). Se empleó el programa Geneconv versión 1.81 (Sawyer 1999) para detectar los fragmentos más probables de haber participado de eventos de recombinación / conversión génica entre secuencias de MHC de tuco-tucos (tanto de DRB como de DQA). Los valores de P son asignados comparando cada fragmento con el máximo que podría ser esperado para dicho par de secuencias en ausencia de conversión génica. Fueron realizados tests estadísticos globales y de a pares con 10.000 permutaciones. A pesar de que este método posee una de las más altas probabilidades de inferir correctamente la conversión génica cuando ésta ha ocurrido (Posada 2002), puede tener bajo poder en presencia de recombinación abundante. Por esta razón, también se estimó la tasa de recombinación ($\rho = 4N_e r$) durante la historia de un set de secuencias alineadas en ambos loci de MHC examinados, asumiendo una tasa constante de recombinación para cada una de las regiones, empleando el “composite-likelihood approach” (Hudson 2001) contenido en

el programa LDhat (Mc Vean et al. 2002). Este programa estima el valor de recombinación (“composite likelihood recombination”, ρ) condicionado por la tasa de mutación por sitio ($\theta = 4N_e\mu$), el cual es obtenido utilizando una versión de serie finita del estimador de Watterson. La influencia de la recombinación es evaluada a través de tests de permutación no paramétricos implementados en LDhat. La distribución de la medida de correlación (r^2) entre desequilibrio por ligamiento, LD, y la distancia física entre regiones fue calculada bajo permutación al azar de la posición física de los polimorfismos de nucleótidos únicos (1000 permutaciones). El valor observado proveniente de los datos no permutados fue comparado con esta distribución nula para poner a prueba la evidencia de una tasa de recombinación distinta de cero (McVean et al. 2002).

Cuando algunos de los supuestos del modelo standard son violados, como la ausencia de selección, el programa Ldhat aun puede proveer estimadores precisos de la tasa de recombinación; sin embargo, ρ puede no ser un verdadero estimador de la tasa de recombinación poblacional (ver Schaschl et al. 2006). Por esta razón, también fue calculada la razón ρ / θ como un estimador de la recombinación relativa comparada con la tasa de mutaciones puntuales, la cual es robusta frente a desviaciones del modelo de coalescencia (Fearnhead and Donnelly 2001). Finalmente, también fue calculado el número mínimo de eventos de recombinación inferidos para los exones de DRB y DQA y para el intrón de DQA (R_m , Hudson y Kaplan 1985) utilizando el programa DnaSp 4 (Rozas et al. 2003). Este estadístico puede ser interpretado como el mínimo número de posiciones diferentes en las cuales han ocurrido eventos de recombinación (ver Schaschl et al. 2006)

RESULTADOS

Variabilidad y polimorfismo a nivel molecular.- El número de alelos encontrado para cada especie es detallado en la Tabla 1. El número de alelos del exón 2 de DRB por especie no difirió significativamente del exón 2 de DQA (Wilcoxon apareado, $n = 18$, $T = 30$, $z = 0,70$, $P = 0,48$). Sin embargo, el número de alelos del exón 2 de DQA por especie fue significativamente mayor que el del intrón 2 de DQA (Wilcoxon apareado, $n = 19$, $T = 0,00$, $z = 2,201$, $P = 0,027$), como se esperaría bajo el modelo de selección diversificadora actuando sobre las regiones codificantes de la molécula de DQA. Los alelos de DRB y DQA encontrados en las especies de ctenómidos examinadas en este estudio mostraron un mayor porcentaje de divergencia al nivel aminoacídico (distancia de Poisson corregida) comparado con el nivel nucleotídico (distancia de dos parámetros de Kimura), sugiriendo que las sustituciones no sinónimas son más comunes que las sinónimas (Tabla 2), lo cual es esperado para aquellas moléculas que se encuentran evolucionando actualmente o que han evolucionado bajo selección positiva.

Detección de selección.- Empleando PAML 3.14, para el exón 2 de DRB todos los modelos que incluían selección positiva (i.e. M2a, M3 y M8) ajustaron a los datos significativamente mejor que los modelos más simples M1a, M0 y M7 (Tabla 3), el cual provee evidencia de la presencia del número de sitios bajo selección positiva. Un sitio resultó seleccionado positivamente en forma significativa bajo el modelo M2 y dos bajo el modelo M8 (Tabla 4). Para el exón 2 de DQA, los modelos M3 y M8 ajustaron a los datos significativamente mejor que los modelos M0 y M7, que no incorporan selección positiva (Tabla 3). Para este locus, dos sitios fueron identificados bajo selección positiva significativa.

Tabla 1.- Número de alelos de MHC clase II por locus para todas las especies de *Ctenomys* analizadas y para *Octodon* sp. N: número de especímenes analizado para cada una de las especies.

Especie	N	Locus		
		DRB exón 2	DQA exón 2	DQA intrón 2
<i>C. argentinus</i>	2	2	1	1
<i>C. australis</i> ^a	34	1	1	1
<i>C. boliviensis</i>	2	1	3	2
<i>C. bonettoi</i>	1	— ^b	1	1
<i>C. conoveri</i>	2	1	1	1
<i>C. frater</i>	1	2	3	2
<i>C. goodfellowi</i>	1	1	2	2
<i>C. haigi</i> ^a		2	1	1
<i>C. maulinus</i>	1	1	4	4
<i>C. mendocinus</i>	1	1	1	1
<i>C. opimus</i>	2	2	3	2
<i>C. pearsoni</i>	6	4	3	3
<i>C. porteousi</i>	3	1	1	1
<i>C. rionegrensis</i>	5	2	2	2
<i>C. sociabilis</i>		1	1	1
<i>C. steinbachi</i>	2	1	3	2
<i>C. talarum</i> ^a	60	4	3	2
<i>C. torquatus</i>	5	7	2	1
<i>Octodon</i> sp.	2	1	2	2

^a Debido a que estos datos provienen de estudios poblacionales (capítulo 3; Lacey unpubl. data), solo aquellos alelos de mayores frecuencias fueron incluidos en los análisis del presente capítulo.

^b La amplificación de DRB falló para esta especie.

Tabla 2.- Número promedio de diferencias nucleotídicas y aminoacídicas de a pares , distancias de Kimura – 2 – parámetros y distancias corregidas de Poisson para los linajes alélicos del exón 2 de DRB, exón 2 de DQA 2 y el intrón 2 de DQA y los haplotipos de citocromo b mitocondrial calculados para 18 especies de *Ctenomys* empleando los algoritmos implementados en MEGA (Kumar et al. 2001).

	Locus		
	DRB exón 2	DQA exón 2	DQA intrón 2
-Diferencias nucleotídicas	10.071	15.62	27.56
(distancia Kimura- 2 parámetros)	(0.041)	(0.104)	(0.248)
-Distancias aminoacídicas	5.12	7.57	--
(distancia corregida de Poisson)	(0.063)	(0.144)	--

Tabla 3.- Resumen de estadísticos para los tests de máxima verosimilitud para el exón 2 de DRB y de DQA en 18 especies del género *Ctenomys*. Los asteriscos representan significancia al nivel de 0,05 (*) y al 0,001 (**).

Locus	Modelos comparados	df	Estadístico	Significancia
DRB exón 2	M1a vs. M2a	2	13.3	0.0013*
	M3 vs. M0	4	57.18	<0.001**
	M8 vs. M7	2	13.28	0.0013*
DQA exón 2	M1a vs. M2a	2	0.63	0.73
	M3 vs. M0	4	40.86	<0.001**
	M8 vs. M7	2	7.04	0.03*

Tabla 4.- Resultados de los modelos de máxima verosimilitud para los exones 2 de DRB y DQA de 18 especies de *Ctenomys*.

Se empleó como input para el programa CODEML (incluido en el programa PAML 3.14) los alineamientos de 35 (exón 2 de DRB, A) y 38 (exón 2 de DQA, B) secuencias obtenidas a partir de 18 especies de tuco-tucos. Las secuencias del exón 2 de DQA de *Octodon* fueron incluidas en los análisis debido a que se agruparon con otras secuencias de *Ctenomys*. Los sitios seleccionados positivamente fueron identificados mediante los modelos M2a y M8 a partir del procedimiento “Bayes empirical Bayes” (BEB, Yang et al. 2005). Los sitios en los cuales se infirió la acción de selección positiva a un nivel de confianza del 99 % se presentan en negrita, y aquellos cuyo nivel de confianza es del 95% se presentan en itálica. P: Número de parámetros en la distribución de ω .

A. DRB exón 2

Modelo	P	Log-verosimilitud	Sitios seleccionados positivamente
M0 (one ratio)	1	-681.48	Ninguno
M1a (NearlyNeutral)	1	-659.59	No permitido
M2a (PositiveSelection)	3	-652.94	33Q
M3 (discrete)	5	-652.89	No permitido
M7 (beta)	2	-659.59	No permitido
M8 (beta y omega)	4	-652.95	33Q , <i>65D</i>

Detección de polimorfismo trans-específico.- Se detectaron numerosas instancias de linajes alélicos e incluso alelos idénticos compartidos de loci de MHC clase II entre las especies de ctenómidos examinadas, siendo este fenómeno más pronunciado para el exón 2 de DQA que para el de DRB (Figuras 1 y 2). Este patrón también resultó evidente para el intrón 2 de DQA (Figura 3). Además, fueron observadas numerosas instancias en las cuales los alelos detectados en una especie se encuentran más cercanos filogenéticamente a aquellos detectados en otras especies que a alelos co-específicos (i.e. DRB_Ctri0101 y DRB_Ctri0102, Figura 1; DQA_Ctst0101, DQA_Ctst0102, CQA_Ctst0103, Figura 2). Para el exón 2 de DRB, varios polimorfismos o residuos compartidos fueron encontrados entre ciertas especies de *Ctenomys*, como el verificado en las posiciones nucleotídicas 102-104: Q, R y W (ver Apéndice). Para el exón 2 de DQA, también se detectaron varios ejemplos de motivos compartidos, como aquellos ubicados en las posiciones nucleotídicas 90-96: “IF” y 159-164: “VS” (ver Apéndice). Las relaciones filogenéticas entre alelos de citocromo b para las 18 especies de *Ctenomys* examinadas son presentadas en la Figura 4.

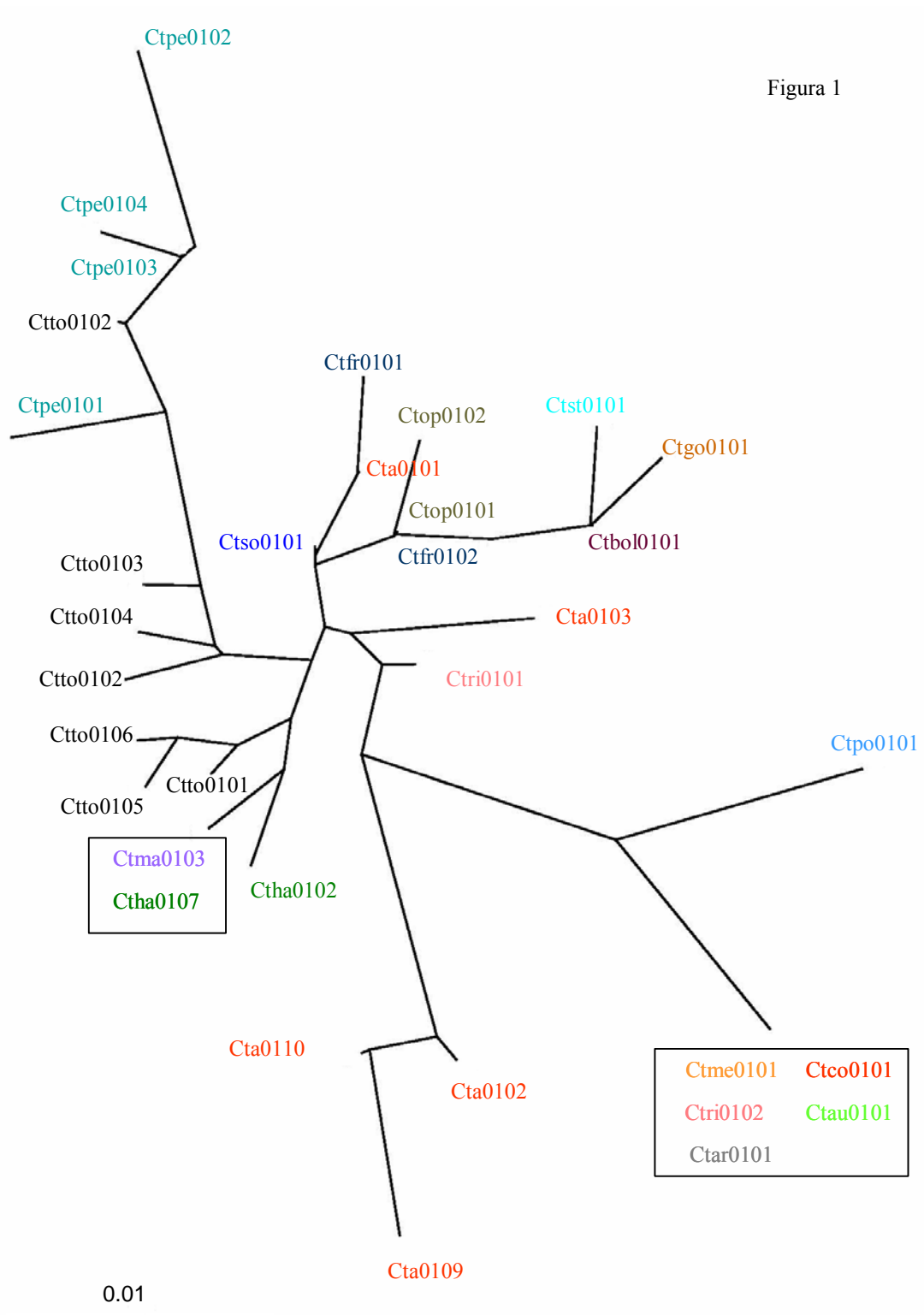


FIGURA 1.- Genealogía del exón 2 de DRB para 17 especies de *Ctenomys* y una especie de *Octodon*, obtenidos por neighbor joining method implementado en PAUP* (Swofford 1998), empleando la distancia de Kimura 2 –parámetros (Kimura 1980). Se presenta una genealogía sin enraizar debido a que la localización de la raíz es incierta y porque su localización precisa no es esencial para el tipo de análisis presentado en el texto. Los números subrayados indican frecuencias de bootstrap $\geq 60\%$. Los números corresponden a los siguientes alelos: 1) Octo0101, 2) Ctbol0101, 3) Ctfr0101, 4) Ctfr0102, 5) Ctst0101, 6) Ctop0101, 7) Ctop0102, 8) Ctpe0101, 9) Ctgo0101, 10) Ctpe0102, 11) Ctpe0103, 12) Ctpe0104, 13) Ctpo0101, 14) Ctri0101, 15) Ctto0101, 16) Ctto0102, 17) Ctto0103, 18) Ctto0104, 19) Ctto0105, 20) Ctto0106, 21) Ctto0107, 22) Cta0102, 23) Cta0103, 24) Cta0109, 25) Cta0110, 26) Ctar0101, 27) Ctme0101, Ctri0102, Ctar0102, Ctco0101, Ctau0101, 28) Ctso0101, 29) Ctha0102, 30) Ctha0107, Ctma0101. Colores diferentes representan diferentes especies. Los números en negrita corresponden a los alelos compartidos por 2 o más especies.

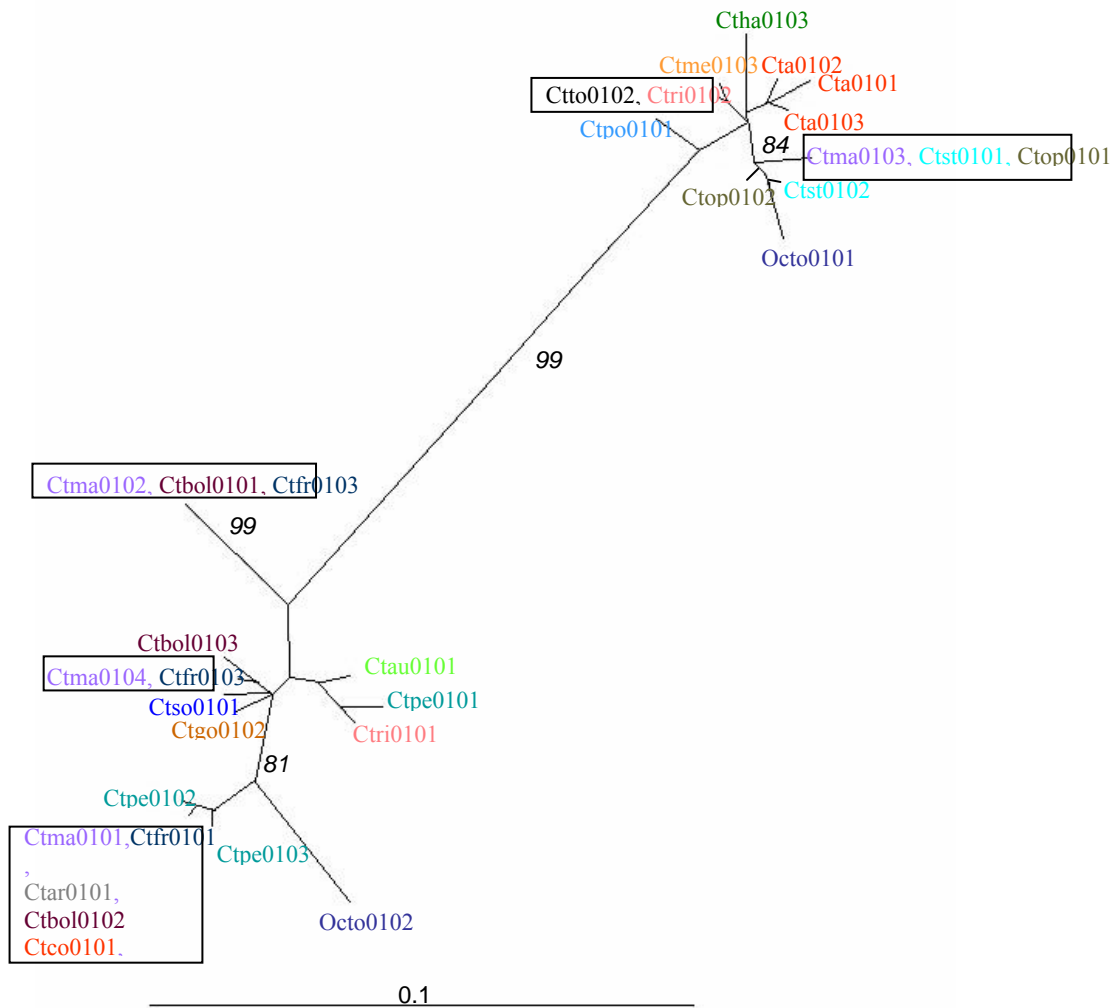


FIGURA 2.- Genealogía del exón 2 de DQA para 18 especies de *Ctenomys* y una especie de *Octodon*, obtenidos por neighbor joining method implementado en PAUP* (Swofford 1998), empleando la distancia de Kimura 2 –parámetros (Kimura 1980). Se presenta una genealogía sin enraizar debido a que la localización de la raíz es incierta y porque su localización precisa no es esencial para el tipo de análisis presentado en el texto. Los números subrayados indican frecuencias de bootstrap $\geq 60\%$.

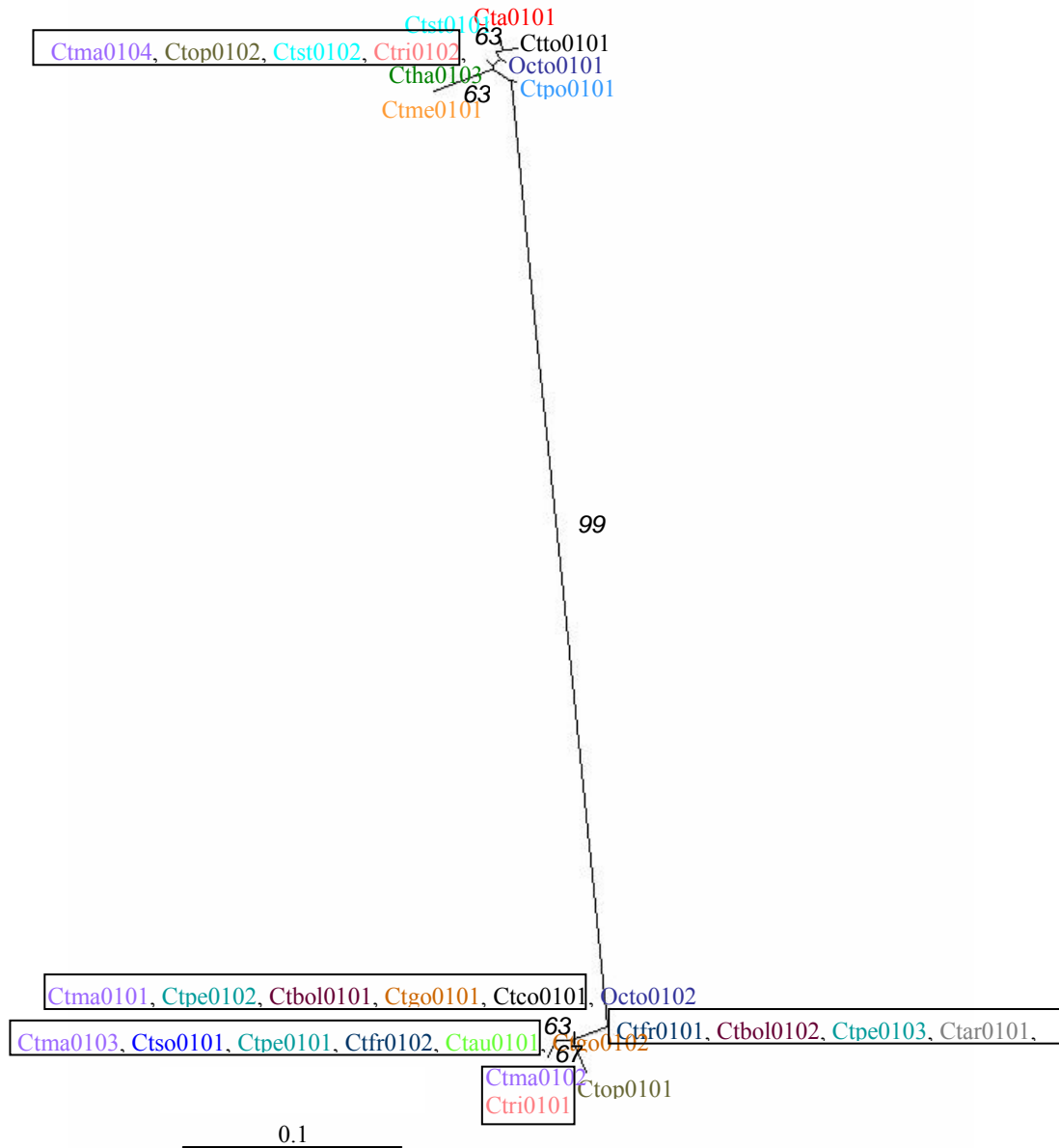


FIGURA 3.- Genealogía del intrón 2 de DQA para 18 especies de *Ctenomys* y una especie de *Octodon*, obtenidos por neighbor joining method implementado en PAUP* (Swofford 1998), empleando la distancia de Kimura 2 –parámetros (Kimura 1980). Se presenta una genealogía sin enraizar debido a que la localización de la raíz es incierta y porque su localización precisa no es esencial para el tipo de análisis presentado en el texto. Los números subrayados indican frecuencias de bootstrap $\geq 60\%$.

FIGURA 4.- Resultados de los análisis filogenéticos de máxima parsimonia (A), máxima verosimilitud (B) y bayesianos (C) para los tuco-tucos basados en secuencias de citocromo b, empleando a los octodontinos *Octodon*, *Spalacopus* and *Tympanoctomys* como grupos externos. Los valores de bootstrap mayores que 50% y las probabilidades posteriores mayores del 85% en los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos respectivamente son presentados sobre las ramas de los correspondientes filogramas.

Figura 4.A

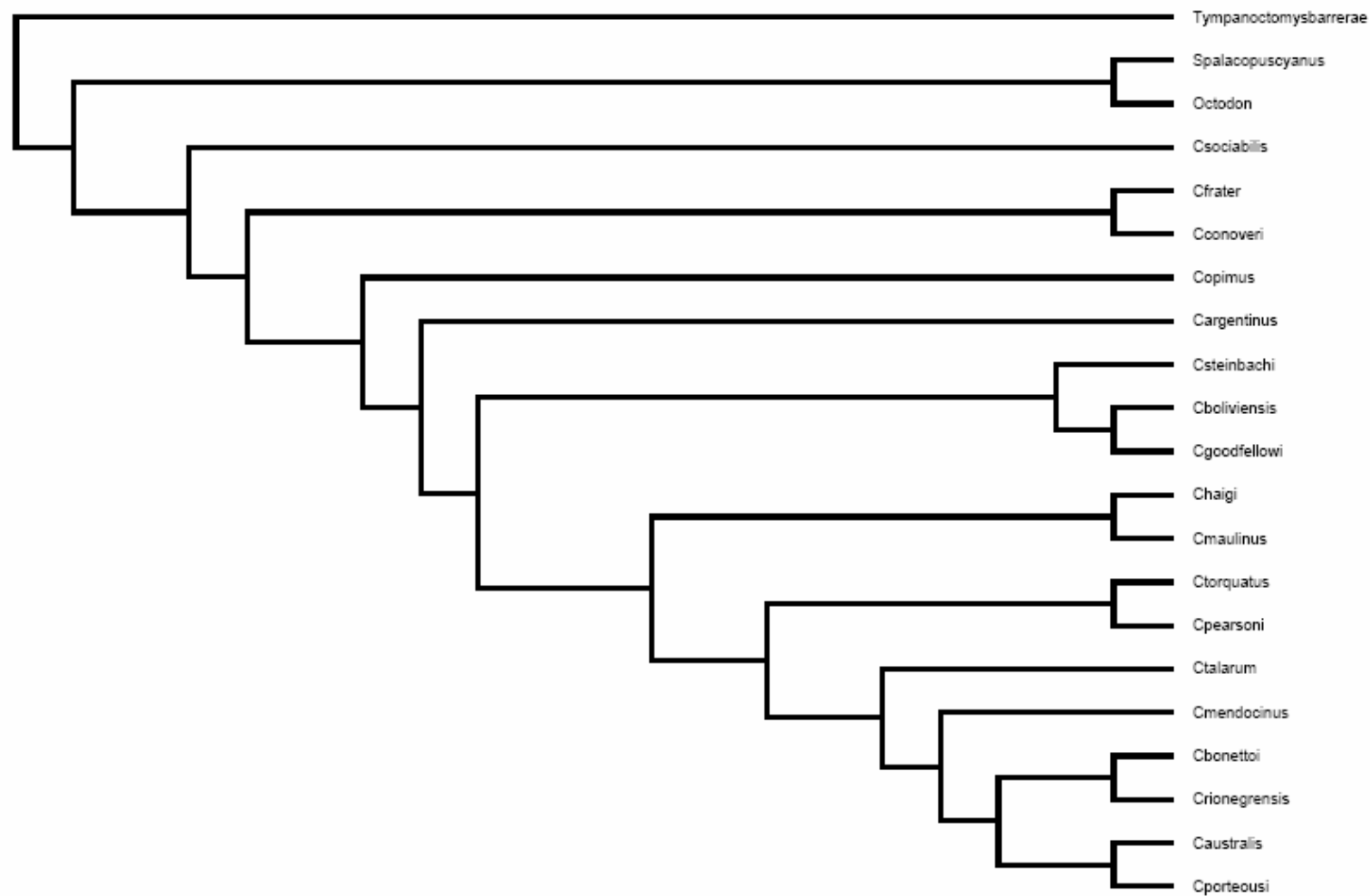
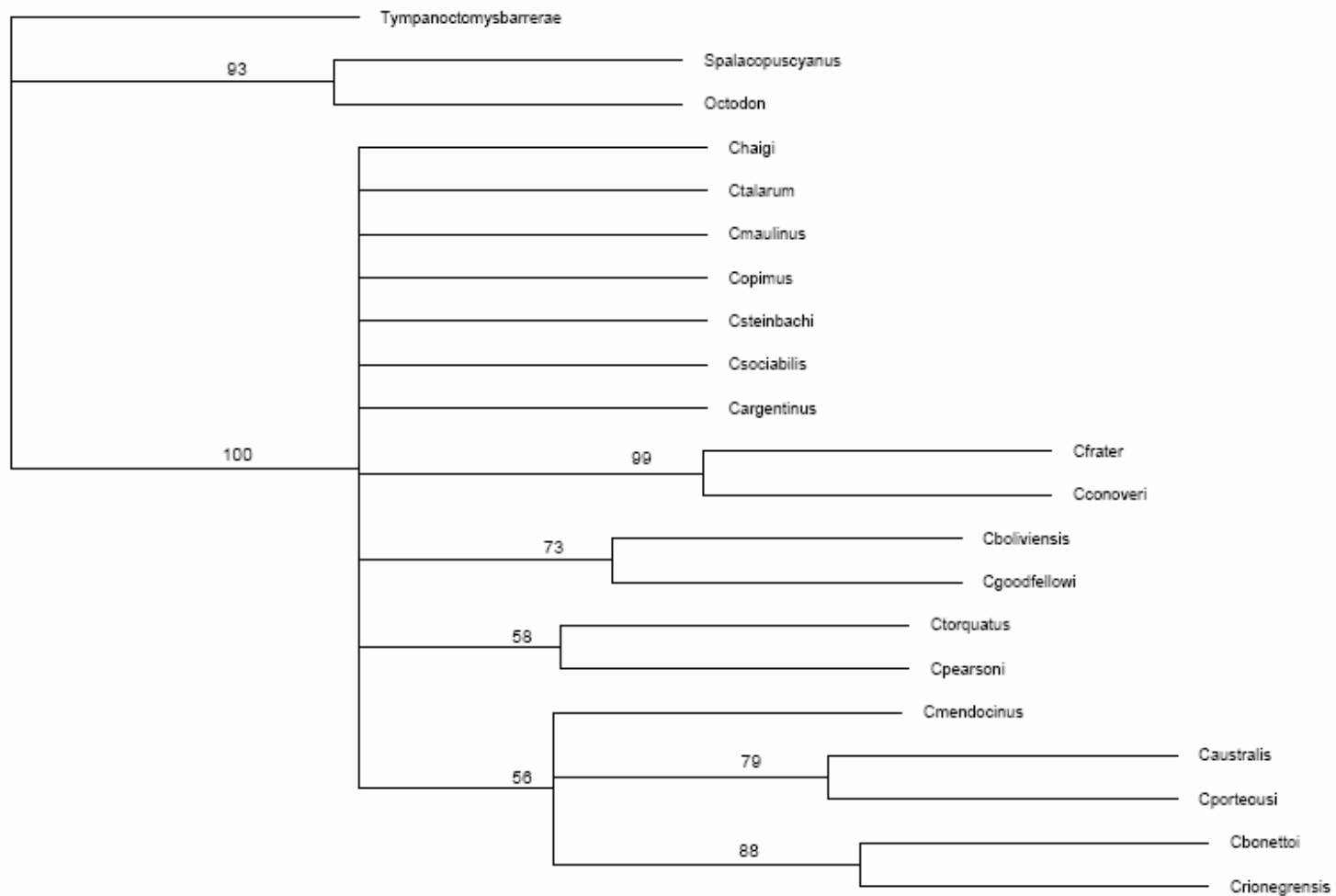


Figura 4.B



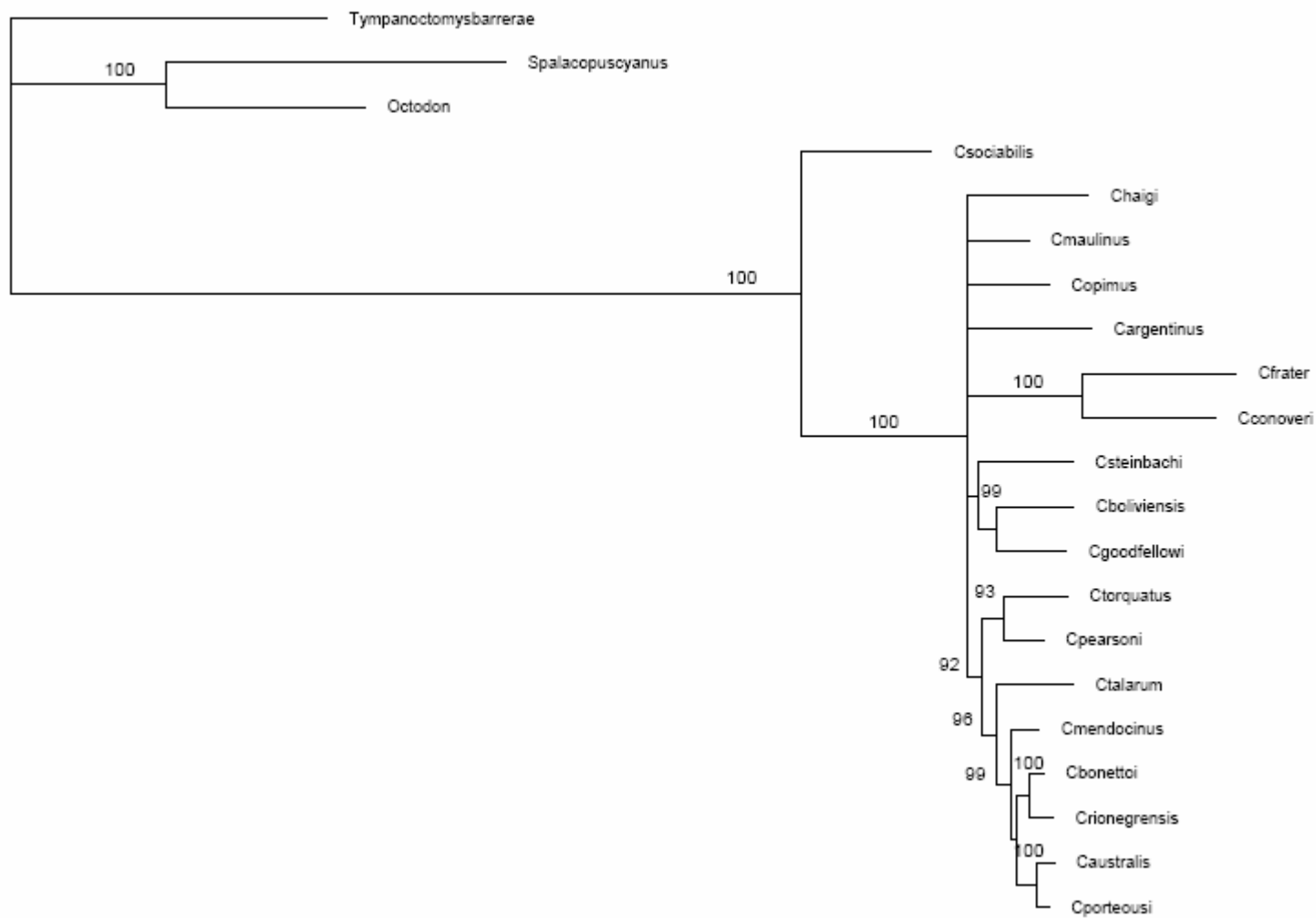


Figura 4C

0.1

Detección de recombinación.- Utilizando Geneconv 1.81, no se encontró evidencia de precombinación intra o interlocus en el alineamiento de las 35 secuencias del exón 2 de DRB o en el alineamiento de 38 secuencias del exón 2 de DQA correspondientes a las 18 especies de *Ctenomys* y a *Octodon* sp. No se identificó evidencia significativa de conversión génica ni para DRB ni para DQA. Empleando LDhat, tampoco se obtuvo evidencia concluyente de recombinación (Tabla 5). Para ambos exones, la tasa de recombinación fue menor que la de mutación en *Ctenomys*. Los tests de permutación realizados para el exón 2 de DRB también apoyaron la ausencia de recombinación. Para el exón 2 de DQA, sin embargo, los tests de permutación rechazaron significativamente la hipótesis nula ($p = 0$) y brindaron cierta evidencia de recombinación en este locus (Tabla 5). Para ambos genes, las correlaciones negativas detectadas entre las medidas de desequilibrio por ligamiento y distancia física entre regiones no resultaron significativas. Sin embargo, el DnaSP 4 detectó eventos posibles de recombinación (R_m) en ambos exones examinados (DRB $R_m = 7$, DQA $R_m = 11$), ambos de los cuales mostraron un mayor número de posiciones posiblemente afectadas por eventos de recombinación que el intrón 2 de DQA ($R_m = 3$).

Tabla 5.- Estimadores de la tasa de mutación poblacional (Waterson $\theta = 4N\mu$) y de la tasa de recombinación ($\rho = 4Nr$) obtenidas empleando el programa LDhat (Mc Vean et al. 2002) para los exones 2 de DRB y DQA. Los valores de significancia de ρ y r^2 se basan en 1000 permutaciones y los valores de $p < 0.05$ se encuentran en negrita. N: número de sitios que segregan, r^2 : correlación entre desequilibrio por ligamiento y distancia física entre regiones del locus analizado.

Locus	N	θ	ρ	P (ρ)	ρ/θ	r^2	P (r^2)
DRB exón 2	79	19.18	0	0.652	0	-0.00898	0.409
DQA exón 2	39	9.28	2.68	0.027	0.29	-0.01909	0.346

DISCUSIÓN

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio sobre dos exones de MHC clase II (DRB y DQA) para 18 especies del género *Ctenomys*, en comparación con la filogenia reconstruida utilizando secuencias de citocromo b para este grupo de taxa, indicaron que los linajes alélicos de DRB y de DQA no siempre se ubicaron en el árbol de acuerdo a las relaciones filogenéticas de las especies en cuestión. Estos resultados, junto con la detección de codones bajo selección positiva en ambos exones de MHC, sugieren que la selección ha operado sobre estas regiones genéticas en algún momento de la historia evolutiva del género *Ctenomys*.

Variabilidad y polimorfismo a nivel molecular.- Ambos exones de MHC examinados exhibieron similares números de alelos; sin embargo, la cantidad de alelos del intrón 2 de DQA fue significativamente menor que la del exón 2 de DQA, sugiriendo que aunque es posible que ambas regiones se encuentren bajo una situación de marcado desequilibrio por ligamiento, los niveles de variabilidad del exón 2 de DQA parecen haber sido impactados por la acción de la selección diversificadora en mayor medida.

Además, los alelos del exón 2 de DRB encontrados en las especies examinadas del género *Ctenomys* mostraron mayor divergencia a nivel de las secuencias de aminoácidos que a nivel de las secuencias de nucleótidos, indicando la persistencia de un alto número de sustituciones no sinónimas, lo cual es esperado bajo la acción de la selección positiva. El mismo patrón fue observado para el exón 2 de DQA, cuyos linajes alélicos retenidos eran marcadamente divergentes, presentando una distancia promedio (corregida por Poisson) entre secuencias de aminoácidos de 14,4 %, mayor que la verificada para el exón 2 de DRB (6,3 %). Este resultado concuerda con el mecanismo de “ventaja del alelo divergente o raro” (Wakeland et al. 1990, Richman et al. 2001), el

cual propone que los individuos que presentan alelos divergentes, que codifican para moléculas de MHC diferentes, tienen una ventaja selectiva debido a que son capaces de responder a un abanico más amplio de patógenos.

Evidencia de selección.- Una de las características de la evolución del MHC es la aparente naturaleza trans-específica del polimorfismo, el cual se hipotetiza que ha existido previo a los eventos de especiación y que luego pasa a las especies nuevas (Klein 1986). El hecho de que diferentes especies compartan alelos idénticos de MHC ha sido documentado únicamente en unos pocos casos, que predominantemente involucran primates (Kenter et al. 1992, Otting et al. 1992, 2002, Doxiadis et al. 2006) y, más recientemente, un rumiante (*Bison bonasus*, Radwan et al. 2006). Los datos del presente estudio documentan un alto número de alelos compartidos entre especies de ctenómidos, el cual se verifica en mayor medida para el exón 2 de DQA. Por el contrario, un estudio previo que examinó los patrones de diversidad interespecífica de MHC en el género *Ctenomys* encontró únicamente un ejemplo de un alelo idéntico del exón 2 de DQB compartido entre *C. sociabilis* y *C. maulinus* (Hambuch 2000).

Persistencia histórica de alelos compartidos.- Una de las fuerzas invocadas para explicar la extensa persistencia de ciertos alelos de MHC a lo largo de la historia evolutiva de un grupo de taxa es la selección balanceadora (Takahata y Nei 1990), asociada con la exposición y resistencia a patógenos (Doherty y Zinkernagel 1975, Hedrick y Kim 2000). En este estudio, la evidencia de que la selección diversificadora ha operado en forma importante sobre los exones de DRB y DQA a lo largo de la historia evolutiva del género *Ctenomys* proviene de los análisis de máxima verosimilitud realizados empleando PAML 3.14, los cuales muestran que los modelos de sustitución de codones que incluyen la acción de selección positiva ajustaron a los datos de manera significativamente mejor que otros modelos más simples. Además, los

codones identificados como sujetos a selección positiva en DRB coincidieron mayormente con los sitios correspondientes al PBR, identificados en base al locus HLA-DRB 1 de humanos (Brown et al. 1993). Para DQA, la falta de un modelo detallado de la estructura proteica tridimensional impidió realizar este tipo de análisis.

Otras fuerzas, como eventos de rápida especiación o expansiones demográficas, también pueden contribuir al mantenimiento de linajes alélicos neutrales a través de la historia evolutiva de un género. El supuesto detrás de ello es que, generalmente, la especiación se completa antes de que los alelos que segregan se fijen. Este fenómeno ha sido descrito para otros grupos de organismos en los cuales han ocurrido radiaciones adaptativas explosivas (peces cíclidos: Nagl et al. 1998) y se ha demostrado que es más frecuente de lo que se consideraba, especialmente si la radiación ha ocurrido recientemente, como ha sucedido en el género *Ctenomys* (Cook y Lessa 1998, Lessa y Cook 1998, Castillo et al. 2005). Sin embargo, uno de los patrones esperados luego de este evento es que las especies más cercanamente emparentadas comparten alelos con mayor frecuencia que aquellas más lejanamente emparentadas. Aunque los tamaños muestrales empleados en este estudio son bajos, afectando por lo tanto la capacidad de discernir cuán ampliamente son compartidos los alelos en cuestión, los árboles filogenéticos de exones de MHC examinados y del intrón no proveen evidencia de que la distribución de residuos o de alelos idénticos compartidos se encuentre correlacionada con la proximidad filogenética de las especies analizadas. El presente estudio encontró numerosos alelos de los exones de DRB y DQA que se encontraban más cercanamente emparentados a alelos de otras especies que a otros alelos co-específicos, sugiriendo que los patrones observados parecen ser el resultado de la acción predominante de la selección balanceadora actuando sobre los loci examinados. En particular, las secuencias de DQA de *Octodon* sp. , incluidas con el fin de ser empleadas

como grupo externo, no pudieron ser utilizadas para enraizar el árbol del intrón 2 y del exón 2 de este locus debido a que se agruparon junto con otras secuencias alélicas de especies de *Ctenomys*. Estos resultados sugieren que al menos el polimorfismo de DQA antecede a la radiación sufrida por el género *Ctenomys* en su historia temprana y, por lo tanto, la emergencia del polimorfismo de estas regiones de DQA ha precedido a la divergencia de los ctenómidos a partir de sus ancestros.

Detección de recombinación.- Existe gran cantidad de evidencia que apoya la contribución de la conversión génica y el mantenimiento de diversidad alélica de MHC, sin embargo, el debate hoy se centra en el grado de contribución (para una revisión extensa, ver Martinsohn et al. 1999). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la recombinación parece no jugar un rol preponderante en la evolución de los exones de DRB y DQA en el género *Ctenomys*. Por otro lado, fue detectada cierta evidencia, aunque ambigua, de recombinación en el exón 2 de DQA, en un patrón que se asemeja al observado para este mismo gen en voles (Bryja et al. 2006).

Aunque ambos exones de MHC examinados mostraron un patrón de variación que coincide con el de la acción de la selección balanceadora (i.e. mayor variabilidad que para el intrón, acción significativa de la selección positiva sobre aminoácidos particulares), el grado en el cual diferentes especies comparten linajes alélicos o alelos idénticos parece ser mayor para el exón 2 de DQA. En este sentido, la recombinación, aun a tasas muy bajas, puede alterar significativamente la forma de los árboles de genes inferidos y puede causar subestimación tanto del tiempo entre los taxa y su ancestro común como del grado de reciente divergencia (Schierup y Hein 2000). Además, el proceso de recombinación puede dar lugar a polimorfismo aparentemente más antiguos (e.g. evolución trans-específica). Por lo tanto, el origen del polimorfismo del exón 2 de DQA en los ctenómidos estudiados puede ser más reciente que lo previamente sugerido.

Sin embargo, el hecho de que la evidencia de recombinación sea ambigua para dicho locus y que la evidencia de la acción de la selección haya sido obtenida por diferentes métodos, permiten inferir que la selección ha jugado un rol principal en la modelación de la variación de este locus. Por lo tanto, las diferencias entre los patrones de variabilidad entre DRB y DQA también pueden resultar de diferentes intensidades de selección, diferente grado de evolución convergente o ambas. Considerando que la variación de estos dos loci fue examinada a partir de la misma muestra de especímenes, las marcadas diferencias observadas en este estudio entre ellos puede tener también implicancias funcionales.

Conclusiones.- Existen dos características comunes de los roedores subterráneos: su limitada movilidad debido a adaptaciones morfológicas relacionadas al cavado, y una distribución en parche de sus poblaciones locales, dictada por el tipo de suelo en el que habitan (Lacey et al. 2000). Estas características han sido asociadas con sus patrones de diversificación, relacionados a su vez con una alta estructuración geográfica y la organización de la variabilidad genética entre en vez de dentro de las poblaciones (Steinberg y Patton 2000). Asociado a ello, las poblaciones naturales de estos roedores se encuentran particularmente sujetas a una dinámica de extinción-recolonización que puede conducir a la pérdida al azar de variabilidad, tanto neutral como funcional. Por otro lado, sin embargo, la retención de polimorfismos ancestrales es más probable en especies del género *Ctenomys*, debido a que los eventos de divergencia han sido rápidos y recientes. Por lo tanto, estos dos sistemas de fuerzas han contribuido a dar forma a los polimorfismos de MHC observados en tuco-tucos.

La interpretación de patrones de polimorfismo trans-específico como aquellos verificados para los exones de DRB y DQA en este estudio puede variar. Una de las hipótesis es que la mayoría de los polimorfismos que se acumulan en una especie se

deben a mutaciones puntuales y a patrones de “parches” que pueden ser explicados por convergencia (O’Higin 1995). Otros reconocen la existencia de linajes alélicos que preceden a los eventos de especiación, pero apuntan a la selección como fuerza promotora de la persistencia de alelos nuevos (Wakeland et al. 1990). Además, los extremadamente altos niveles de polimorfismo de los loci de MHC (Klein 1986) se consideran el resultado de selección balanceadora mediada por patógenos (revisado en Piertney y Oliver 2006). Como fuera reportado en este último capítulo, el origen de varios linajes alélicos de MHC parece anteceder a los eventos de rápida diversificación del género *Ctenomys*, otros, sin embargo, sólo son compartidos entre ciertas especies de tuco-tucos y han divergido considerablemente de aquellos presentes en el género hermano *Octodon* (i.e. DRB). Este patrón apoya la hipótesis de que los alelos presentes en las poblaciones fundadoras podrían haber sido adecuados para la supervivencia de dichas poblaciones ancestrales de tucos. Pero a medida que estos roedores se expandieron y colonizaron nuevos ambientes, fueron expuestos a diferentes clases de patógenos y parásitos, resultando en la pérdida de ciertos alelos ancestrales y la aparición y permanencia de nuevas variantes a través de una combinación de deriva génica y selección, similar a lo descrito para las tribus humanas de Sud Amerindios (revisado por Parham y Ohta 1996, Cadavid y Watkins 1997). En particular, las diferencias en los números de alelos y en la diversidad nucleotídica de los loci de MHC estudiados entre especies de *Ctenomys* (i.e., la variación de DRB en *C. torquatus* vs. *C. rionegrensis*) refleja la interacción entre la historia demográfica de dichas especies y la selección balanceadora. A partir del presente estudio, se encontró evidencia de la retención de polimorfismo alélicos ancestrales en ciertas especies, y esta tendencia fue más pronunciada para el exón 2 de DQA.

Estudios futuros deberían examinar e identificar las especies de parásitos presentes exclusivamente en el género *Ctenomys*, las cuales podrían constituir candidatos potenciales para la modelación de la evolución del MHC en este grupo. Asimismo, intentaremos detectar las asociaciones entre resistencia / susceptibilidad a ciertos macroparásitos y variantes alélicas específicas de DRB y DQA en especies de tucos.

CONSIDERACIONES FINALES

Históricamente, los estudios en roedores subterráneos han jugado un rol importante en los esfuerzos por comprender los patrones y procesos de diversificación genética. Varios factores han contribuido a la popularidad de estos animales como objeto de estudio en investigación genética, incluyendo su tendencia a una limitada movilidad individual y la distribución en parches de sus poblaciones locales (Nevo 1979, Reig et al. 1990, Busch et al. 2000). Se espera que estos atributos incrementen el grado en el cual la variación genética se encuentra contenida entre vs. dentro de las poblaciones (Steinberg y Patton 2000), aumentando, por lo tanto, las oportunidades de explorar la interacción entre deriva y flujo génico.

Uno de los puntos salientes que ha emergido a partir de estudios de estructura genética en roedores subterráneos es el de la importancia relativa de la selección natural vs. procesos neutrales (por ejemplo, deriva) en la modelación de la variación genética. A través de esta tesis, se han comparado explícitamente los patrones de variación en regiones presuntamente neutrales vs. loci funcionales, a la luz de las características históricas y actuales de las especies y poblaciones de *Ctenomys* examinadas, con el fin de analizar las contribuciones relativas de dichos procesos a la estructuración genética en roedores subterráneos. El empleo conjunto de diferentes marcadores moleculares, múltiples escalas de análisis (inter-poblacional, inter-específica y a través de numerosas especies del género) y de una mirada que engloba la demografía y la genética de poblaciones, hacen de este trabajo un acercamiento novedoso que ha permitido, por un lado, identificar los atributos demográficos que impactan directamente en el tamaño efectivo de las poblaciones naturales de *Ctenomys talarum* (ej., el desvío en el éxito reproductivo de los machos, el grado de movilidad espacial de los diferentes sexos durante la dispersión) y en la intensidad de la deriva que opera sobre ellas. Por otro

lado, ha hecho posible incorporar los datos necesarios para relacionar la evidencia de selección a presiones selectiva específicas, como la exposición a parásitos y el riesgo de apareamientos endogámicos, sobre loci involucrados en la respuesta inmune (genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad: MHC) también en *C. talarum*, relacionando expresamente dichas presiones selectivas con parámetros demográficos actuales, como la densidad poblacional y el grado de filopatría de cada sexo.

Además de la demografía actual, los eventos demográficos históricos, a través de su influencia sobre el balance entre deriva génica y selección, han jugado un papel crucial en el modelado de la variación de loci del MHC. De este modo, los patrones actuales de variabilidad de MHC en *C. australis* parecen haber sido el resultado de eventos demográficos recientes (expansión) predominantemente; sin embargo, los patrones de diversidad molecular de los exones examinados sugieren que la selección ha actuado sobre estos loci a través de tiempos evolutivos. Finalmente, los análisis filogenéticos de esta tesis realizados sobre loci de MHC para numerosas especies del género *Ctenomys* indicaron un patrón de polimorfismo trans-específico, sugiriendo que la selección ha operado sobre estos loci en diferentes momentos de la historia evolutiva del género, tanto en su historia temprana, incluso antes de los eventos de especiación, como también más recientemente, promoviendo evolución convergente. Nuevamente, las diferencias en los niveles de variabilidad de los loci de MHC estudiados entre especies de *Ctenomys* refleja la interacción entre la historia demográfica de dichas especies y la intensidad de la selección balanceadora.

A pesar de que los modelos disponibles son numerosos y proveen predicciones explícitas, el rol de la estructura poblacional en la modelación de la selección que opera sobre los loci de MHC, y en general sobre genes funcionales, permanece poco explorado. Por lo tanto, será particularmente interesante incrementar nuestro

conocimiento de los factores que contribuyen a la selección sobre este grupo de genes a partir de la incorporación de más especies de ctenómidos en los análisis, sumando así al creciente marco comparativo de estudio de la estructura genética desarrollado en este linaje, y facilitando al mismo tiempo los estudios de la evolución del MHC a través de escalas geográficas mayores y escalas temporales más profundas. Asimismo, extender los análisis de variación del MHC y de otros genes funcionales a otras especies de roedores subterráneos que han evolucionado independientemente puede contribuir a comprender el rol de los “hábitos subterráneos” comunes en generar presiones de selección similares sobre estos taxa. Estos estudios jugarán un rol preponderante en la comprensión de las relaciones entre demografía, selección y variación de genes funcionales.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, A., G. Roemer, S. Debenham, M. Binns, D. Garcelon and R.K. Wayne. 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101 (10): 3490-3494.
- American Society of Mammalogists. 1998. Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by The American Society of Mammalogists, *Journal of Mammalogy* 79: 1416-1431.
- Anderson, R.M., and R.M. May. 1979. Population biology of infectious disease: Part I. *Nature* 280:361-367.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Monographs in behavior and ecology. Princeton University Press.
- Antinuchi, C.D. and C. Busch. 1992. Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Zeitschrift für Säugtierkunde* 57: 163-168.
- Apanius, V., D. Penn, P. Slev, L.R. Ruff, and W.K. Potts. 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* 17: 179-224.
- Arneberg, P. 2002. Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: a comparative analysis of directly transmitted nematodes of mammals. *Ecography* 25: 88-94.
- Austin J.D., J.A. Dávila, S.C. Loughheed, and P.T. Boag. 2003. Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, *Rana catesbeiana* (*Ranidae*). *Molecular Ecology* 12, 3165-3172.

- Avise, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Second Edition, 2nd edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Banks, S.C., D. B. Lindenmayer S. J. Ward y A. C. Taylor. 2005. The effects of habitat fragmentation via forestry plantation establishment on spatial genotypic structure in the small marsupial carnivore, *Antechinus agilis*. Molecular Ecology 14:1667-
- Bartley, D., M. Bagley, G. Gall and B. Bentley. 1992. Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. Conservation Biology 6: 365-375.
- Begon, M., C.B. Krimbas and M. Loukas. 1980. The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XV. Effective size of a natural population estimated by three independent methods. Heredity 45: 351-359.
- Bernatchez, L. and C. Landry . 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?. Journal of Evolutionary Biology 16: 363-377.
- Bertorelle, G. y M. Slatkin. 1995. The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. Molecular Biology and Evolution 12: 887-892.
- Bishop, J.M., J.U.M. Jarvis, A.C. Spinks, N.C. Bennett and C.O'Ryan. 2004. Intraspecific variation in both colony composition and patterns of paternity in two populations of the social common mole-rat *Cryptomys hottentotus hottentotus*. Molecular Ecology 13: 1217-1229.
- Bouteiller, C. and N. Perrin. 2000. Individual reproductive success and effective population size in the greater white-footed shrew *Crocidura russula*. Proceedings of the Royal Society of London 267: 701-705.

- Boyce, W.M., P.W. Hedrick, N.E. Muggli-Cockett, S. Kalinowski, M.C.T. Penedo and R.R. Ramey II. 1997. Genetic variation of Major Histocompatibility Complex and Microsatellite Loci: A comparison in Bighorn Sheep. *Genetics* 145: 421-433.
- Bradley, R.D. and D.M. Hillis. 1997. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Molecular Biology and Evolution* 14: 592-593.
- Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger y D.C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
- Brown, J.H., T.S. Jardetzky, M.A. Saper, B. Samraoui, P.J. Bjorkman y D.C. Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign peptide binding site of the Class II histocompatibility molecules. *Nature* 332: 845-850.
- Brown, J.L. y A. Eklund. 1994. Kin recognition and the major histocompatibility complex: An integrative review. *American Naturalist* 143: 435-461.
- Bryja, J., M. Galan, N. Charbonnel y J. F. Cosson. 2006. Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the DQA MHC class II gene in voles (*Arvicolinae*). *Immunogenetics* 58: 191-202.
- Burland, T.M., N.C. Bennett, J.U.M. Jarvis and C.G. Faulkes. 2004. Colony structure in wild colonies of co-operatively breeding Damaraland mole-rats suggest incest avoidance alone may not maintain reproductive skew. *Molecular Ecology*. 2371-2379.

- Busch, C., A.I. Malizia, O.A. Scaglia and O.A. Reig. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 70: 204-208.
- Busch, C., C.D. Antinuchi, J.C. del Valle, M.J. Kittlein, A.I. Malizia, A.I. Vassallo and R.R. Zenuto. 2000. Population ecology of subterranean rodents. Pp. 183-226 in *Life underground: the biology of subterranean rodents* (E.A. Lacey, G. Cameron, and J.L. Patton, eds.). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Cadavid L.F. y D.I. Watkins. 1997. Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americas. *Tissue Antigens* 50:702-11.
- Callen, D.F., A.D.S. Thompson, Y. Sheng, H.A. Phillips, R.I. Richards, J.C. Mulley and G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 53: 922-927.
- Castillo, A.H., M.N. Cortinas y E.P. Lessa. 2005. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyinae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86: 170-179.
- Charnov, E.L. 1990. On evolution of age of maturity and the adult lifespan. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 139-144.
- Chesser, R.K. 1998. Relativity of behavioral interactions in socially structured populations. *Journal of Mammalogy* 79 (3): 713-724.
- Chesser, R.K., O.E. Rhodes Jr, D.W. Sugg, and A. Schnabel. 1993. Effective sizes for subdivided populations. *Genetics* 135: 1221-1232.

- Clarke, A.B. 1978. Sex ratio and local resource competition in a prosimian primate. *Science* (Washington, D.C.) 201: 163-165.
- Clutton-Brock, T.H. 1989a. Female transfer and inbreeding avoidance in social mammals. *Nature* (London) 337: 70-72.
- Clutton-Brock, T.H. 1989b. Mammalian Mating Systems. *Proceedings of the Royal Society of London. Ser. B* 236: 339-372.
- Cockerham, C.C. and B.S. Weir. 1987. Correlations, descent measures: drift with migration and mutation. *Evolution* 84 (23): 8512-8514.
- Comparatore, V., M. Agnusdei and C. Busch. 1992. Habitat relations in sympatric populations of *Ctenomys australis* and *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) in a natural grassland. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 57: 47-55.
- Comparatore, V.M., N.O. Maceira and C. Busch. 1991. Habitat relations in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha, Octodontidae) in a natural grassland. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 56: 112-118.
- Contreras, J.R. and O.A. Reig. 1965. Datos sobre la distribución del genero *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) en la zona costera de la Provincia de Buenos Aires comprendida entre Necochea y Bahía Blanca. *Physis* 25: 169-186.
- Cook, J. A., y E. P. Lessa. 1998. Macroevolutionary patterns of diversification in subterranean rodents. The case of the South American tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae). *Evolution* 52:1521–1527.
- Cornuet, J-M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

- Coté, I.M. and R. Poulin. 1995. Parasitism and group-size in social animals: a meta-analysis. *Behavioral Ecology* 6: 159-165.
- Crandall, K.A., D.P. Posada and D. Vasco. 1999. Effective population sizes: missing measures and missing concepts. *Animal Conservation* 2: 317-319.
- Daly, J.C. and J.L. Patton. 1990. Dispersal, gene flow, and allelic diversity between local populations of *Thomomys bottae* pocket gophers in the coastal ranges of California. *Evolution* 44 (5): 1283-1294.
- Daly, M. and M. Wilson. 1983. Sex, evolution and behavior. 2nd edition Willard Grant Press, Boston.
- Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, et al. 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 7922-7927.
- Dixon, B. L. A. J. Nagelkerke, A. Ferdinand. E.E. Sibbing y R. J. M. Stet. Evolution of MHC class II β chain-encoding genes in the Lake Tana barbel species flock (*Barbus intermedius* complex). *Immunogenetics* 44: 419-431.
- Dobson, F.S. 1981. An experimental examination of an artificial dispersal sink. *Journal of Mammalogy* 62 (1): 74-81.
- Dobson, F.S. 1982. Competition for mates and predominant juvenile dispersal in mammals. *Animal Behaviour* 30: 1183-1192.
- Dobson, F.S., R.K. Chesser, J.L. Hoogland, D.W. Sugg and D.W. Foltz. 1998. Breeding groups and gene dynamics in a socially-structured population of prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 79: 671-680.

- Dobson, F.S., R.K. Chesser, J.L. Hoogland, D.W. Sugg and D.W. Foltz. 2004. The influence of social breeding groups on effective population size in black-tailed prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 85 (1): 58-66.
- Doherty, P.C. y R.F. Zinkernagel. 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 complex. *Nature* 256: 50-52.
- Doolittle, R.F. 1994. Convergent evolution: the need to be explicit. *Trends Biochem. Sci.* 19: 15-18.
- Doxiadis, G.G.M., A.J.M. Roweler, N.G. de Groot, A. Louwse, N. Otting, E.J. Verschoor y R.E. Bontrop. 2006. Extensive sharing of MHC class II alleles between rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 58: 259-268.
- Edwards, S.V. and P.W. Hedrick. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 13 (8): 305-311.
- Edwards, S.V., K. Chestnut, Y. Satta y E.K. Wakeland. 1997. Ancestral polymorphism of MHC class II genes in mice: implications for balancing selection and the mammalian molecular clock. *Genetics* 146: 655-668.
- El Jundi, T.A.R. and T.R.O. de Freitas. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas* 140: 18-23.
- Emlen, S.T. 1991. Evolution of cooperative breeding in birds and mammals. Pp 46-63 in *Behavioral Ecology* (J.R. Krebs. And N.B. Davis, eds.). Blackwell, Oxford.
- Emlen, S.T. and L.W. Oring. 1977. Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223.
- Endler, J.A. 1992. Genetic heterogeneity and ecology. Pp 281-312 in *Genes in Ecology* (R.J. Berry, T.J. Crawford and G.M. Hewitt GM, eds.). Blackwell Scientific, London.

- Ewens, W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology* 3: 87-112.
- Farve, L., F. Balloux, J. Goudet, and N. Perrin. 1997. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society London B* 264: 127-132.
- Faulkes, C.G., D.H. Abbott, H.P. O'Brien, L. Lau, M.R. Roy, R.K. Wayne, and M.W. Bruford. 1997. Micro- and macro-geographic genetic structure of colonies of naked-mole rats, *Heterocephalus glaber*. *Molecular Ecology* 6: 615-628.
- Fearnhead P. y P. Donnelly. 2001. Estimating recombination rates from population genetic data. *Genetics* 159: 1299-1318.
- Figuroa F., E. Gunther y J. Klein. 1988. MHC polymorphism predating speciation. *Nature* 335: 265-267.
- Ford, M.J. 2002. Applications of selective neutrality tests to molecular ecology. *Molecular Ecology* 11: 1245-1262.
- Foster, S.A. and J.A. Endler. 1999. *Geographic variation in Behavior: Perspectives on Evolutionary Mechanisms*. Oxford University Press, New York and Oxford.
- Foster, S.A., J.A. Baker and M.A. Bell. 1992. Phenotypic integration of life history and morphology: an example from the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *L. Journal of Fish Biology* 41 (suppl.): 21-35.
- Frankham, R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* 66: 95-107.

- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Fraser, D.J., C. Lippé, and L. Bernatchez. 2004. Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology* 13: 67-80.
- Fremont, D.H., D. Monnaie, C.A. Nelson, W.A. Hendrickson y E.R. Unau. 1998. Crystal structure of I-A^k in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity* 8: 305-317.
- Froeschke, G. and S. Sommer. 2005. MHC Class II DRB Variability and Parasite Load in the Striped Mouse (*Rhabdomys pumilio*) in the Southern Kalahari. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5): 1254-1259.
- Gallardo, M.H. and N. Köhler. 1994. Demographic changes and genetic losses in populations of a subterranean rodent (*Ctenomys maulinus brunneus*) affected by a natural catastrophe. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 59: 358-365.
- Gallardo, M.H., N. Köhler and C. Araneda. 1995. Bottleneck effects in local populations of fossorial *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) affected by vulcanism. *Heredity* 74: 638-646.
- Garrigan, D. and P.W. Hedrick. 2003. Detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. *Evolution* 57 (8): 1707-1722.
- Garza, J.C. and E.G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305-318.
- Gerber, A.S. and A.R. Templeton. 1996. Population sizes and within-deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. *Oecologia* 105: 343-350.

- Gillespie, J.H. 1991. *The Causes of Molecular Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Godot, V. S. Harraga, I. Beurton, P. Tiberghien, E. Sarciron, B. Gottstein y D.A. Vuitton. 2000. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans II. Influence of the HLA B8, DR3, DQ2 haplotype. *Clinical and Experimental Immunology* 121: 491-498.
- Goldman, N. and Z. Yang. 1994. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 725-736.
- Gompper, M.E., J.L. Gittleman and R.K. Wayne. 1998. Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Molecular Ecology* 7, 157-163.
- Goudet, J. 1995. FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Goudet, J., N. Perrin and P. Waser. 2002. Tests for sex-biased dispersal using biparentally inherited genetic markers. *Molecular Ecology* 11: 1103-1114.
- Greenwood, P.J. 1980. Mating system, philopatry, and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28: 1140-1162.
- Gustafsson, K., S. Hermans, F. Hirsch, K. Pratt, C. LeGuern, y D.H. Sachs. 1990. Structure of miniature swine class II DRB genes: Conservation of hypervariable amino acid residues between distantly related mammalian species. *Proceedings of the Royal Academy of Sciences USA* 87: 9798- 9802.
- Gyllenstein, U. M. Sundvall, I. Ezcurra and H.A. Erlich. 1994. Genetic diversity at Class II DRB loci of the primate MHC. *Molecular Ecology* 13: 3389-3402.

- Hambuch, T.M. 2000. Major histocompatibility complex diversity in species of the genus *Ctenomys*: the role of selection in the evolution of genetic variation. PhD Thesis, University of California, Berkeley.
- Hambuch, T.M. and E.A. Lacey EA. 2002. Enhanced selection for MHC diversity in social tuco-tucos. *Evolution* 56: 841-845.
- Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1-52.
- Hamilton, W.D. 1967. Extraordinary sex ratios. *Science (Washington, D.C.)* 228: 896-898.
- Harf, R. y S. Sommer. 2005. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the Southern Kalahari. *Molecular Ecology* 14: 85-91.
- Harpending, H.C., M.A. Batzer, M. Gurven, L.B. Jorde, A.R. Rogers y S.T. Sherry. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the Royal Academy of Sciences USA* 95: 1961-1967.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA. 542 pp.
- Hedrick, P. W., and T. J. Kim. 2000. Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of the major histocompatibility complex variation. Pp. 204–234 in R. S. Singh and C. B. Krimbas, eds. *Evolutionary genetics: from molecules to morphology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Hedrick, P.W. y G. Thomson. 1983. Evidence for balancing selection at HLA. *Genetics* 104: 449-456.

- Hedrick, P.W., K.M. Parker, E.L. Miller y P.S. Miller. 1999. Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics* 152: 1701-1710.
- Hedrick, P.W., K.M. Parker KM, G.A. Gutierrez-Espeleta, A. Rattink and K. Lievers. 2000. Major histocompatibility complex variation in the Arabian Oryx. *Evolution* 54(6): 2145-2151.
- Hedrick, P.W., T.J. Kim and K.M. Parker. 2001. Parasite resistance and genetic variation in the endangered Gila topminnow. *Animal Conservation* 4:103-109.
- Hoelzel, A.R., J.C. Stephens and S.J. O'Brien. 1999. Molecular Genetic Diversity and Evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. *Molecular Biology and Evolution* 16 (5): 611-618.
- Hood, G.M. 2004. PopTools version 2.6.2. Available on the internet. URL <http://www.cse.csiro.au/poptools>.
- Hudson, R.R. 2001. Two-locus sampling distributions and their applications. *Genetics* 159: 1805-1817.
- Hudson, R.R. y N.I. Kaplan. 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DQA sequences. *Genetics* 111: 336-347.
- Huelsenbeck, J.P y F. Ronquist. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Hughes, A. and M. Hughes. 1995. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 42: 233-243.
- Hughes, A.L. 2002. Natural selection and the diversification of vertebrate immune effectors. *Immunological Reviews* 190: 161-168.

- Hughes, A.L. and M. Nei. 1989. Nucleotide Substitution at Major Histocompatibility Complex Class II loci: Evidence for Overdominant Selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86 (3): 958-962.
- Hughes, A.L. y M. Yeager. 1998. Natural Selection at Major Histocompatibility Complex of vertebrates. *Annual Review of Genetics* 32: 415-435.
- Hughes, A.L., M.K. Hughes, C.Y. Howell CY and M. Nei. 1994. Natural selection at the class II Major Histocompatibility loci of mammals. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 346 (1317): 359-366.
- Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54 (2): 187-211.
- Husband, B.C. and S.C.H. Barrett. 1992. Effective population size and genetic drift in tristylous *Eichornia paniulata* (Pontederiaceae). *Evolution* 46: 1875-1890.
- Isla, F.I. 1998. Holocene coastal evolution of Buenos Aires. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*, A. A. Balkema 11:297-321.
- Isla, F.I., L.C. Cortizo, y H.A. Turno Orellano. 2001. Dinámica y evolución de las Barreras Medanosas, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Brasileira de Geomorfología* 2:73-83.
- Keane, B. 1990. Dispersal and inbreeding avoidance in the white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. *Animal Behavior* 40: 143-152.
- Kennedy, L.J., J.M. Angles, A. Barnes, S.D. Carter, O. Francino, J.A. Gerlack, G.M. Happ, W.E.R. Ollier, W. Thomson and J.L. Wagner. 2001. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility complex (DLA), 2000: a second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics* 32: 193-199.

- Kennedy, L.J., L.S. Hall, S.D. Carter, A. Barnes, S. Bell, D. Bennet, B. Ollier and W. Thomson. 2000. Identification of further DLA-DRB1 and DQA1 alleles in the dog. *European Journal of Immunogenetics* 27: 25-28.
- Kenter, M., N. Otting, J. Anholts, M. Jonker, R. Schipper y R. E. Bontrop. *Mhc-DRB* diversity of the chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Immunogenetics* 37: 1-11.
- Kim, T.J., K.M. Parker and P.W. Hedrick. 1999. Major histocompatibility complex differentiation in Sacramento River Chinook salmon. *Genetics* 151: 1115-1122.
- Kimmel, M. and R. Chakraborty. 1996. Measures of variation at DNA repeat loci under a general stepwise mutation model. *Theoretical Population Biology* 50: 345-367.
- Klein, J. 1980. Generation of diversity at MHC loci: implications for T-cell receptors repertoires. pp. 239–253 in *Immunology 80*, edited by M. Fougereau and J. Dausset. Academic Press, London.
- Klein, J. 1986. Natural history of the Major Histocompatibility Complex. Wiley & Sons, New York.
- Klein, J. 1986. Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley, New York.
- Klein, J. 1987. Origin of the major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology* 19: 155-162.
- Klein, J. y V. Horejsi. 1997. *Immunology*. Blackwell Science, Oxford.
- Klein, J., Y. Satta, C. O' Huigin and N. Takahata. 1993. The molecular descent of the Major Histocompatibility Complex. *Annual Review of Immunology* 11: 269-295.
- Knowles, L.L. y C.L. Richards. 2005. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analyses of genomic variation. *Molecular Ecology* 14: 4023-

- Koenig, W.D., D. Van Vuren and P.N. Hooge. 1996. Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 11 (12): 514-517.
- Kraaijeveld-Smit, F.J.L., D.B. Lindenamy, and A.C. Taylor. 2002. Dispersal patterns and population structure in a small marsupial, *Antechinus agilis*, from two forest analyzed using microsatellite markers. *Australian Journal of Zoology* 50: 325-338.
- Kriener, K., C. O'hUigin, H. Tichy y J. Klein. 2000. Convergent evolution of major histocompatibility complex molecules in humans and New World monkeys. *Immunogenetics* 51: 169-178.
- Kruuk, L.E.B, T.H. Clutton-Brock, K.E. Rose and F.E. Guinness. 1999. Early determinants of lifetime reproductive success differ between the sexes in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London. B* 266: 1655-1661.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Tempe, AZ.
- Kundu, S. and C.G. Faulkes. 2004. Patterns of MHC selection in African mole-rats, family Bathyergidae: the effects of sociality and habitat. *Proceedings of the Royal Society of London* 271: 273-278.
- Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (2000) *Life Underground: The biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Lacey, E.A. 2000. Spatial and Social Systems of Subterranean Rodents. En: Lacey, E.A., J.L. Patton, and G.N. Cameron, eds. *Life Underground: The biology of*

- subterranean rodents*. Pp 257-296. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Lacey, E.A. 2001. Microsatellite variation in solitary and social tuco-tucos: molecular properties and population dynamics. *Heredity* 86: 628-637.
- Lacey, E.A., J.E. Maldonado, J.P. Clabaugh and M. Matocq. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8: 1753-1768.
- Landry, C. and L. Bernatchez. 2001. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon. *Molecular Ecology* 10: 2525-2539.
- Langefors, A., J. Lohm, M. Grahn, O. Andersen y T. von Schantz. 2001. Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 479-485.
- Latek, R.R., A. Suri, S.J. Petzold, C.A. Nelson, O. Kanagawa, E.R. Unaue y D.H. Fremont. 2000. Structure basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12: 699-710.
- Lessa, E. P., y J. A. Cook. 1998. The molecular phylogenetics of tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae) suggests an early burst of speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9:88-99.
- Lessa, E.P. 2000. The evolution of subterranean rodents: a synthesis. Pp 389-415. En: Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (2000) *Life Underground: The biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Lewontin, R.C. 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press, New York.

- Lidicker, W.Z. and J.L. Patton. 1987. Patterns of Dispersal and Genetic Structure in Populations of Small Rodents. En: Chepko-Sade, B.D. and Z. Tang Halpin, eds. Mammalian Dispersal Patterns. The Effects of Social Structure on Population Genetics. pp. 144-161. University of Chicago Press, Chicago.
- Luikart, G., F.W. Allendorf, J-M. Cornuet and W. B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Genetics*: 89, 238-247.
- Lukas, D., B.J. Bradley, A.M. Nsubuga, D. Doran-Sheehy, M.M. Robbins and L. Vigilant. 2004. Major histocompatibility complex and microsatellite variation in two populations of wild gorillas. *Molecular Ecology* 13: 3389-3402.
- Lundberg, A.S. y H.O. McDevitt. 1992. Evolution of Major Histocompatibility Complex Class II allelic diversity: direct descent in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 6545-6549.
- Maher, C.R. and D.L. Lott. 2000. A Review of Ecological Determinants of Territoriality within Vertebrate Species. *The American Midland Naturalist* 143:1-29.
- Malizia, A.I. and C. Busch. 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia* 55: 293-305.
- Malizia, A.I. and C. Busch. 1997. Breeding biology of the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Zoology of London* 242: 463-471.
- Malizia, A.I., A.I. Vassallo and C. Busch. 1991. Population and habitat characteristics of two sympatric species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Acta Theriologica* 36: 87-94.

- Malizia, A.I., R.R. Zenuto and C. Busch. 1995. Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Canadian Journal of Zoology* 73: 732-738.
- Marshall, T.C., J. Slate, L.E.B. Kruuk and J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Martinson J.T., A.B. Sousa, L.A. Guethlein y J.C. Howard. 1999. The gene conversion hypothesis of MHC evolution: a review. *Immunogenetics* 50: 168-200.
- Matocq, M.D. 2004. Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*). *Molecular Ecology* 13: 1635-1642.
- Matocq, M.D. and E.A. Lacey. 2004. Philopatry, kin clusters, and genetic relatedness in a population of woodrats (*Neotoma macrotis*). *Behavioral Ecology* 15 (4): 647-653.
- Matocq, M.D., J.L. Patton and M.N.F. Da Silva. 2000. Population genetic structure in two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution* 54 (4): 1423-1432.
- McDonald, J.H. y M. Kreitman. 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 351, 652 – 654.
- McVean, G.A.T., P. Awadalla y P. Fearnhead. 2002. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* 160: 1231-1241.
- Meyer, D. and G. Thomson. 2001. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Annals of Human Genetics* 65: 1-26.

- Meyers, L.A. and J.J. Bull. 2002. Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 551-557.
- Mikko, S. and L. Andersson. 1995. Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4259-4263.
- Miller, H.C. and D.M. Lambert. 2004. Genetic drift outweighs balancing selection in shaping post-bottleneck major histocompatibility complex variation in New Zealand robins (Petroicidae). *Molecular Ecology* 13: 3709-3721.
- Miller, K.M. y R.E. Whitler. 1997. MHC diversity in Pacific salmon: population structure and trans-species allelism. *Hereditas* 127: 83-95.
- Mones A., y L. R. Castiglioni. 1979. Additions to the knowledge on fossil rodents of Uruguay (Mammalia: Rodentia). *Paleontologische Zeitschrift* 53:77-87.
- Mora, M.S., E.P. Lessa, M.J. Kittlein y A.I. Vassallo. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: Evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87:
- Moran, P.A.P. 1975. Wandering distributions and the electrophoretic profile. *Theoretical Population Biology* 8: 318-330.
- Murray, B.G. Jr. 1967. Dispersal in vertebrates. *Ecology* 48: 975-978.
- Musolf, K., Y. Meyer-Lucht y S. Sommer. 2004. Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics* 56: 420-426.

- Nachman, M.W., S.N. Boyer and C.F. Aquadro. 1996. Nonneutral mitochondrial DNA variation in humans and chimpanzees. *Genetics* 142: 953-963.
- Nagl, S., H. Tichy, W.E. Mayer, N. Takahata y J. Klein. 1998. Persistence of neutral polymorphisms in Lake Victoria cichlid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 14238-14243.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. 1991. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. En: *Phylogenetic analysis of DNA sequences* (Miyamoto, M.M. y J.L. Cracraft, eds.), Oxford University Press, NY, pp. 90-128.
- Nei, M. and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3: 418-426.
- Nei, M. y T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3: 418-426.
- Nielsen, R. 2001. Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity* 86: 641-647.
- Nielsen, R. and Z. Yang. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* 148: 929-936.
- Nozawa, K. 1970. Estimation of the effective size in *Drosophila* experimental populations. *Drosophila Information Service* 45: 117-118.
- Nunney, L. 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* 47: 1329-1341.

- Nunney, L. 1995. Measuring the ratio of effective population size to adult numbers using genetic and ecological data. *Evolution* 49: 389-392.
- Nunney, L. and D.R. Elam. 1994. Estimating the effective population size of conserved populations. *Conservation Biology* 8: 175-184.
- O'hUigin, C. 1995. Quantifying the degree of convergence in primate MHC-DRB genes. *Immunological Reviews* 143: 123-140.
- Otting, N., N.G. de Groot, G.G.M. Doxiadis y R.E. Bontrop. 2002. Extensive MHC-DQB variation in humans and non-human primate species. *Immunogenetics* 54: 230-239.
- Paetkau, D., W. Calvert, J. Stirling, and C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Parham, P. y T. Ohta. 1996. Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules. *Science* 272: 67 – 74.
- Paterson, A.H., Y.-R. Lin, Z. Li, K.F. Schertz, J.F. Doebley, S.R.M. Pinson, S.-C. Liu, J.W. Stansel y J.E. Irvine, 1995. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science* 269: 1714– 1718.
- Paterson, S., K. Wilson K and J.M. Pemberton. 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries L.*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 3714-3719.
- Patton, J.L. and J.H. Feder. 1981. Microspatial genetic heterogeneity in pocket gophers: Non-random breeding and drift. *Evolution* 43: 12-30.
- Patton, J.L., and M.F. Smith. 1989. Population structure and the genetic and morphologic divergence among pocket gopher species (genus *Thomomys*). En: Otte, D. and

- J.A. Endler. Speciation and its consequences. pp. 284-304. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
- Peacock, M.M. and A.T. Smith. 1997. The effect of habitat fragmentation on dispersal patterns, mating behavior, and genetic variation in a pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Oecologia* 112: 524-533.
- Pearson, O.A., N. Binsztein, L. Boiry et al. 1968. Estructura social, distribución espacial y composición por edades de una población de tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 13: 47-80.
- Penn, D. y W.K. Potts. 1998. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 391-396.
- Penn, D.J. and W.K. Potts. 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *The American Naturalist* 153 (2): 145-164.
- Perrin, N. and V. Mazalov. 1999. Dispersal and Inbreeding Avoidance. *American Naturalist* 154: 282-292
- Perrin, N. and V. Mazalov. 2000. Local competition, Inbreeding, and the Evolution of Sex-Biased Dispersal. *American Naturalist* 155 (1): 116-127.
- Perry, J.N. 1995. Spatial analysis by distance indices. *Journal of Animal Ecology* 64: 303-314.
- Piertney, S.B. y M.K. Oliver. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96: 7-21.
- Piry, S., G. Luikart and J-M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502-503.

- Pope, T.R. 1992. The influence of dispersal patterns and mating system on genetic differentiation within and between populations of the red howler monkey (*Alouatta seniculus*). *Evolution* 46: 1112-1128.
- Pope, T.R. 1998. Effects of demographic change on group kin structure and gene dynamics of populations of red howling monkeys. *Journal of Mammalogy* 79: 692-712.
- Posada, D. 2002. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Molecular Biology and Evolution* 19: 708-717.
- Posada, D., 2002 Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Molecular Biology and Evolution* 19: 708-717.
- Posada, D., and K. A. Crandall, 2001 Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 13757-13762.
- Potts, W.K. y E.K. Wakeland. 1993. The evolution of MHC genetic diversity: A tale of incest, pestilence and sexual preference. *Trends in Genetics* 9: 408-412.
- Poulin, R. y S. Morand. 1999. Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations. *Parasitology* 119: 369-374.
- Pusey, A.E. 1987. Sex-biased dispersal and inbreeding avoidance in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution* 2: 295-299.
- Pusey, A.E. and M. Wolf. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 201-206.
- Queller, D.C. and K.F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Radwan, J., A. Kawalko, J.M. Wojcik y W. Babik. 2006. MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology*. In press.

- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Reeve, H.K., D.F. Westneat, W.A. Noon, P.W. Sherman, and C.F. Aquadro. 1990. DNA “fingerprinting” reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked-mole rat. *Nature* 358: 147-149.
- Reig, O.A. 1964. Roedores y Marsupiales del Partido de General Pueyrredón y Regiones Adyacentes (Prov. de Buenos Aires). Publicaciones del Museo Municipal de Ciencias Naturales de Mar del Plata 1 (6): 203-224.
- Reig, O.A., C. Busch, M.O. Ortells, and J.R. Contreras. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology, and speciation in *Ctenomys*. En: Nevo, E. and O.A. Reig. Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels. *Progress in Clinical and Biological Research*. pp. 71-96, vol. 335. Wiley Liss, New York.
- Reusch, T.B.H., M.A. Häberli, P.B. Aeschliman y M. Milinski. 2001. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature* 414: 300-302.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Richman, A. 2000. Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology* 9: 1953-1963.
- Richman, A.D., L.G. Herrera y D. Nash. 2003a. Evolution of MHC class II E β diversity within the genus *Peromyscus*. *Genetics* 164: 197-289.
- Richman, A.D., L.G. Herrera, D. Nash y H.M Schierup. 2003b. Relative roles of mutation and recombination in generating allelic polymorphism at an MHC

- class II locus in *Peromyscus maniculatus*. *Genetical Research Cambridge* 82: 89-99.
- Roberts, R.L., J.R. Williams, A.K. Wang and C.S. Carter. 1998. Cooperative breeding and monogamy in prairie voles: Influence of the sire and geographical variation. *Animal Behaviour* 55: 1131-1140.
- Roitt, I.M. 1997. *Essential immunology*, 9th edn. Blackwell Science, Oxford.
- Rozas, J. J.C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rozas, J., J.C. Sanchez-Del Barrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Saitou, N. 1991. Book review: *Molecular Systematics*. En: Hillis, D.M. y Moritz, C. (eds). *Molecular Biology and Evolution*. 4: 559-551.
- Salamon, H., W. Klitz, S. Eastal, X. Gao, H.A. Erlich, M. Fernandez-Viña, E.A. Trachtenberg, S.K. Mc Weeney, M.P. Nelson and G. Thomson. 1999. Evolution of HLA Class II Molecules: Allelic and Amino Acid Site Variability Across Populations. *Genetics* 152: 393-400.
- Satta, Y., C. O' Huigin, N. Takahata and J. Klein. 1994. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 7184-7188.
- Sawyer, S.A. 1999. GENECONV: a computer package for statistical detection of gene conversion. Available at <http://www.math.wustl.edu/~sawyer/mbprogs/>

- Sawyer, S.A. 1999. Geneconv: a computer package for the statistical detection of gene conversion. Department of Mathematics, Washington University, St. Louis. Available at: <http://www.math.wustl.edu/~sawyer/geneconv/>
- Schad, J., J.U. Ganzhorn and S. Sommer. 2005. Parasite burden and constitution of major histocompatibility in the Malagasy mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Evolution* 59 (2): 439-450.
- Scharf, S.J., C.M. Long and H.A. Erlich. 1988. Sequence analysis of the HLA DR beta and HLA DQ beta loci from the *Pemphigus vulgaris* patients. *Human Immunology* 22: 61-69.
- Schaschl, H., F. Suchentrunk, S. Hammer y S.J. Goodman. 2005. Recombination and the origin of sequence diversity in the DRB MHC class II locus in chamois (*Rupicapra* spp.). *Immunogenetics* 57: 108-115.
- Schaschl, H., P. Wandeler, F. Suchentrunk, G. Obexer-Ruff y S.J. Goodman. 2006. selection and recombination drive the evolution of MHC class II DRB diversity in ungulates. *Heredity*: 1-11.
- Schierup, M., A.M. Mikkelsen y J. Hein. 2001. Recombiantion, balancing selection and phylogenies in MHC and self-incompatibility genes. *Genetics* 159: 1833-1844.
- Schierup, M.H. y J. Hein. 2000. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics* 156: 879-891.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin version 2000: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*. University of Geneva. Switzerland.
- Schwartz, M.K., D.A. Tallmon and G. Luikart. 1998. Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Animal Conservation* 1: 293-299.

- Scott, C.A., P.A. Peterson, L. Teyton y I.A. Wilson. 1998. Crystal structures of two I-A^d-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 8: 319-329.
- Seddon, J.M. and H. Ellegren. 2002. MHC Class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics* 54: 490-500.
- Seddon, J.M. and P.R. Baverstock. 1999. Variation on islands: major histocompatibility complex (Mhc) polymorphism in populations of the Australian bush rat. *Molecular Ecology* 8: 2071-2079.
- Sherman, P.W. 1981. Kiship, demography, and Belding's ground squirrel nepotism. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 8: 251-259.
- Sherman, P.W., E.A. Lacey, H.K. Reeve, and L. Keller. 1995. The eusociality continuum. *Behavioral Ecology* 6: 102-108.
- Slade, R.W., C. Moritz, A. Heideman and P.T. Hale. 1993. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology* 2: 359-373.
- Slade, R.W., P.T. Hale PT, D.I. Francis, J.A. Marshall Graves and R.A. Sturm. 1994. The marsupial MHC: the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, contains an expressed DNA-like gene on chromosome 1. *Journal of Molecular Evolution* 38: 496-505.
- Slamovits, C.H., J. A. Cook, E. P. Lessa, y M. S. Rossi. 2001. Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A Phylogenetic Approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1708-1719.
- Smulders, M.J.M., L.B. Snoek, G. Booy and B. Vosman. 2003. Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands: Consequences for conservation strategies. *Conservation Genetics* 4: 441-451.

- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1995. Biometry. 2nd edition. WH Freeman and Company, New York.
- Solomon, N.G. 2003. A reexamination of factors influencing philopatry in rodents. *Journal of Mammalogy* 84: 1182-1197.
- Sommer, S. 2005. The importance of immune genetic variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* 2: 16-34.
- Sommer, S., D. Schwab and J.U. Ganzhorn. 2002. MHC diversity of endemic Malagasy rodents in relation to geographic range and mating system. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51: 214-221.
- Spong, G. and S. Creel. 2004. Effects of kinship on territorial conflicts among groups of lions, *Panthera leo*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55(4): 325-331.
- Steinberg, E.K., and J.L. Patton. 2000. Genetic Structure and the Geography of Speciation in Subterranean Rodents: Opportunities and Constraints for Evolutionary Diversification. En: Lacey, E.A., J.L. Patton and G.N. Cameron, eds. *Life Underground: The biology of subterranean rodents*. pp. 301-331. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Storz, J.F. and M.W. Nachman. 2003. Natural selection on protein polymorphism in the rodent genus *Peromyscus*: evidence from interlocus contrasts. *Evolution* 57: 2628-2635.
- Storz, J.F., U. Ramakrishnan and S.C. Alberts. 2002. Genetic effective size of a wild primate population: influence of current and historical demography. *Evolution* 56: 817-829.
- Strickberger M.W. 1996. *Evolution*, 2nd edn. Jones and Bartlett, Sudbury, Mass.

- Sugg, D.W., R.K. Chesser, F.S. Dobson and J.L. Hoogland. 1996. Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 11(8): 338-342.
- Sumner, J., F. Rousset, A. Estoup and C. Moritz. 2001. "Neighbourhood" size, dispersal and density estimates in the prickly forest skink (*Gnypetoscincus queenslandiae*) using individual genetic and demographic methods. *Molecular Ecology* 10: 1917-1927.
- Swofford, D.L. (ed). 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Takahata, N. 1995. MHC diversity and selection. *Immunological Reviews* 1: 225-
- Takahata, N. y M. Nei. 1990. Allelic genealogy under over-dominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* 124: 967-978.
- Takahata, N., V. Satta and J. Klein. 1992. Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility loci. *Genetics* 130: 925-938.
- Travis, S.E., C.N. Slobodchikoff and P. Keim. 1995. Ecological and Demographic Effects on Intraspecific Variation in the Social System of Prairie Dogs. *Ecology* 76 (6): 1794-1806.
- Valdes, A.M., M. Slatkin and N.B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 135: 737-749.
- Van Den Bussche, R.A., S. R. Hooper, y R. L. Lochmiller. 1999. Characterization of Mhc-DRB allelic diversity in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) provides insight into Mhc-DRB allelic evolution within Cervidae. *Immunogenetics* 49: 429-437.

- Van Den Bussche, R.A., T.G. Ross and S.R. Hooper. 2002. Genetic variation at a major histocompatibility locus within and among populations of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Mammalogy* 83 (1): 31-39.
- Van der Walt, J.M., L.H. Nel and A.R. Hoelzel. 2001. Characterization of major histocompatibility complex DRB diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: a comparison in two subspecies with different demographic histories. *Molecular Ecology* 10: 1679-1688.
- Vassallo, A. I. 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., M.J. Kittlein and C. Busch. 1994. Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 75(3): 725-732.
- Verzi, D. H. 2002. Patrones de evolucion morfologica en Ctenomyiinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoologia Neotropical* 9:309-328.
- Vrba, E. S., y S. J. Gould. 1986. The hierarchical expansion of sorting and selection: sorting and selection cannot be equated. *Paleobiology* 12:217-228.
- Wakeland, E.K., S.B. Boehme y J.X. She.1990. The Generation and Maintenance of MHC Class II Gene Polymorphism in Rodents: *Immunological Reviews* 113: 207-
- Watterson, G. 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88: 405-417.
- Weber, D.S., B.S. Stewart, J. Schienman and N. Lehman N. 2004. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology* 13 (3): 711-718.
- Weber, J.L. and C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.

- Wegner, K.M., T.B.H. Reusch and M. Kalbe. 2003. Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 224-232.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wlasiuk, G., J.C. Garza and E.P. Lessa. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57 (4): 913-926.
- Wood, T.E., J.M. Burke y L.H. Rieseberg. 2005. Parallel genotypic adaptation: when evolution repeats itself. *Genetica* 123-157-170.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1938. Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* 87: 430-431.
- Wright, S. 1969. Evolution and the genetics of populations. Vol 2: The theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago Press.
- Yang, Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Computer Applications in BioSciences* 13: 555-556.
- Yang, Z. 2001. Phylogenetic analysis by maximum likelihood (PAML). Version 3.11. University College London.
- Yang, Z., W.J. Swanson and V. D. Vacquier. 2000. Maximum-likelihood analysis of molecular adaptation in abalone sperm lysine reveals variable selective pressures among lineages and sites. *Molecular Biology and Evolution* 17 (10): 1446-1455.

- Yang, Z.H., W.S.W. Wong y R. Nielsen. 2005. Bayes Empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1107-1118.
- Zenuto, R.R. 1999. *Sistema de apareamiento en el roedor subterráneo Ctenomys talarum (Rodentia: Octodontidae)*. PhD Thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Zenuto, R.R., A.I. Malizia and C. Busch. 1999b. Sexual size dimorphism, testes size and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Natural History* 33: 305-314.
- Zenuto, R.R., A.I. Vassallo and C. Busch. 2001. A method for studying social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriologica* 46(2): 161-170.
- Zenuto, R.R., A.I. Vassallo and C. Busch. 2002b. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 165-177.
- Zenuto, R.R., C.D. Antinuchi and C. Busch. 2002a. Bioenergetics of reproduction and pup development in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *Physiological and Biochemical Zoology* 75: 469-478.
- Zenuto, R.R., E.A. Lacey and C. Busch. 1999a. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Molecular Ecology* 8: 1529-1532.
- Zhang, J. y M. Nei. 1997. Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *Journal of Molecular Evolution*. S139-S146.
- Zhang, J. y S. Kumar. 1997. Detection of Convergent and Parallel Evolution at the Amino Acid Sequence Level.

APENDICE

Secuencias nucleotidicas de alelos del exon 2 de DRB para C. australis

DRB_Ctau0101	CGG	ATC	CTT	CGT	GTC	CCC	ACA	GCA	CGT	TTC	TTG	GAG	TAT	ATT	AAG	TGG	GAG	TGT	CGT	TTC	TCC	AAT	GGG	ACT	GAG	CAT
DRB_Ctau0102CC
DRB_Ctau0106G.
DRB_Ctau0107AC
DRB_Ctau0112
DRB_Ctau0114
DRB_Ctau0117
DRB_Ctau0121
DRB_Ctau0124
DRB_Ctau0125A	...

DRB_Ctau0101	GTT	CAG	ATG	GTG	GTC	AGA	CAC	ATC	TAC	AAG	CAG	GAG	GAG	TTC	TTA	CGC	TAC	GAC	AGT	GAC	CTG	GGC	AAG	TAC	CTG	GCA
DRB_Ctau0102
DRB_Ctau0106
DRB_Ctau0107G.G.
DRB_Ctau0112GG	...
DRB_Ctau0114
DRB_Ctau0117
DRB_Ctau0121
DRB_Ctau0124
DRB_Ctau0125C.GTA.

DRB_Ctau0101	GTG	ACT	GGG	CTA	GGG	CGG	CAG	GAG	GCA	GAA	GAC	TGG	AAC	ACC	AGG	AAA	GAC	CTC	CTG	GAG	CAG	AGG	CGT	TCC	CAG	CTG
DRB_Ctau0102
DRB_Ctau0106
DRB_Ctau0107	T.
DRB_Ctau0112
DRB_Ctau0114G.G
DRB_Ctau0117G	..AT.	..T.
DRB_Ctau0121CT.G.
DRB_Ctau0124C.	...
DRB_Ctau0125	T.

DRB_Ctau0101	GAC	ACC	TTG	TGC	AGA	CAC	AAC	TAC	GGG	GTT	GGG	GAG	AA
DRB_Ctau0102
DRB_Ctau0106
DRB_Ctau0107
DRB_Ctau0112
DRB_Ctau0114
DRB_Ctau0117
DRB_Ctau0121
DRB_Ctau0124	...	G.
DRB_Ctau0125

secuencias amioacidicas DRB_CA

Secuencias aminoacidicas de alelos del exon 2 de DRB para C. australis

DRB_Ctau0101 RILRVPTARF LEYIKWECRF SNGTEHVQMV VRHIYKQEEF LRYDSDLGKY LAVTGLGRQE AEDWNTRKDL LEQRRSQLDI
 DRB_Ctau0102
 DRB_Ctau0106G.....
 DRB_Ctau0107H.....R.....G.....
 DRB_Ctau0112
 DRB_Ctau0114G.....K.....
 DRB_Ctau0117II.....
 DRB_Ctau0121G.....
 DRB_Ctau0124P.A.....
 DRB_Ctau0125N.....

DRB_Ctau0101 LCRHNYGVGE
 DRB_Ctau0102
 DRB_Ctau0106
 DRB_Ctau0107
 DRB_Ctau0112
 DRB_Ctau0114
 DRB_Ctau0117
 DRB_Ctau0121
 DRB_Ctau0124
 DRB_Ctau0125

DQA CA secuencias nucleotidicas

Secuencias nucleotidicas de alelos del exon 2 de DQA para C. australis

DQA_Ctau0101	GGA TCC CAG TAC ACC CAT GAA TTT GAT GGA GAT GAG CTG TAC TAC GTG GAC CTG GAT AAG AAA GAG ACT GTC CAT TGG
DQA_Ctau0113G
DQA_Ctau0118G
DQA_Ctau0119G
DQA_Ctau0159G
DQA_Ctau0176G
DQA_Ctau0185C
DQA_Ctau0188G
DQA_Ctau01130G .GA CC. C.C .C.
DQA_Ctau0101	ATG CCT GGG CTT AAG GAA ATT GAA GGT TTT GAC CCA CAA GGT GCA CTG AAT AAC ATA GTC ATA TTG AAA CAC AAC TTG
DQA_Ctau0113C
DQA_Ctau0118C
DQA_Ctau0119C
DQA_Ctau0159C
DQA_Ctau0176C
DQA_Ctau0185C
DQA_Ctau0188C
DQA_Ctau01130C
DQA_Ctau0101	AAC ATC CTT ATT AAA CGG TCG
DQA_Ctau0113C
DQA_Ctau0118C
DQA_Ctau0119C
DQA_Ctau0159C
DQA_Ctau0176C
DQA_Ctau0185C
DQA_Ctau0188C
DQA_Ctau01130C

DQA CA secuencias aminoacidicas

Secuencias aminoacidicas de alelos del exon 2 de DQA para C. australis

DQA_Ctau0101	GSQYTHEFDG	DELYYVLDL	KETVHWMPGL	KEIEGFDPQG	ALNNIVILKH	NLNILIKRS
DQA_Cau0113
DQA_Ctau0118	G.....
DQA_Ctau0119S.....
DQA_Ctau0159P.....
DQA_Ctau0176
DQA_Ctau0185	R.....
DQA_Ctau0188	R.....
DQA_Ctau01130	G..PH...A.

Cpearsoni_DRB0101
 Cgoodfellowi_DRB0101
 Cpearsoni_DRB0102
 Cpearsoni_DRB0103
 Cpearsoni_DRB0104
 Cporteousi_DRB0101
 Crionegrensis_DRB0101
 Ctorquatus_DRB0101
 Ctorquatus_DRB0102
 Ctorquatus_DRB0103
 Ctorquatus_DRB0104
 Ctorquatus_DRB0105
 Ctorquatus_DRB0106
 Ctorquatus_DRB0107
 Ctalarum_DRB0102
 Ctalarum_DRB0103
 Ctalarum_DRB0109
 Ctalarum_DRB0110
 Cargentinus_DRB0101
 Cargentinus_DRB0102
 Cconoveri_DRB0101
 Cmendocinus_DRB0101
 Crionegrensis_DRB0102
 Csociabilis_DRB0101
 Caustralis_DRB0101
 Chaigi_DRB0102
 Chaigi_DRB0107 .G.
 Cmaulinus_DRB0101 .G.
 Octodon_DRB0101AT .AC

DRBaa

Cboliviensis_DRB0101	RILRVPTARF	LEYIKWECHF	SNGTEHVQMV	VRHIYKQEEF	LRYDNDLGKY	LAVTGLGRQE	AEDWNTRKDL	LEQRHSQLDL
Cfrater_DRB0102
Cgoodfellowi_DRB0101
Csteinbachi_DRB0101	W.....
Cfrater_DRB0101	W.....	R.....	R.....
Copimus_DRB0101	R.....
Copimus_DRB0102	R...G.
Chaigi_DRB0107	R.....	R...G.
Cmaulinus_DRB0101	R.....	R...G.
Crionegrensis_DRB0101	R.....	S.....	R.....
Cporteوسي_DRB0101	R.....	R.....	SN.....	R.....
Ctorquatus_DRB0101	R.....	K.....	R.....
Ctorquatus_DRB0105	R.....	K..N.	R.....
Ctorquatus_DRB0106	R.....	K..N.	R.....
Ctalarum_DRB0102	R.....	S.....	A.....	R.....
Ctalarum_DRB0103	R.....	A.....	R.....
Ctalarum_DRB0109	S.....	A.....	R.....
Ctalarum_DRB0110	S.....	A.....	R.....
Cargentinus_DRB0101	R.....	R.....
Cargentinus_DRB0102	R.....	S.....	R.....
Cconoveri_DRB0101	R.....	S.....	R.....
Cmendocinus_DRB0101	R.....	S.....	R.....
Crionegrensis_DRB0102	R.....	S.....	R.....
Csociabilis_DRB0101	R.....	R.....
Caustralis_DRB0101	R.....	S.....	R.....
Chaigi_DRB0102	R.....	W.....	R.....
Ctorquatus_DRB0103	W.....	S.....	K.....	R.....
Ctorquatus_DRB0104	W.....	K.....	R.....
Cpearsoni_DRB0101	W.....	SG.....	R.....
Cpearsoni_DRB0102	W.....	SG.....	K..KP	R.....
Cpearsoni_DRB0103	W.....	SG.....	K..N.	R.....
Cpearsoni_DRB0104	W.....	SG.....	K..N.	R.....
Ctorquatus_DRB0107	W.....	SG.....	K..N.	R.....
Ctorquatus_DRB0102	W.....	K..N.	R.....
Octodon_DRB0101Y	...L.S..L.R.RFL	EKY.HN...N	V.F.S.V.E.	R...E..LP.	.KS..SQ...	...KRA.V.N

Cboliviensis_DRB0101	LCRHNYGVGE
Cfrater_DRB0102
Cgoodfellowi_DRB0101
Csteinbachi_DRB0101
Cfrater_DRB0101
Copimus_DRB0101
Copimus_DRB0102
Chaigi_DRB0107
Cmaulinus_DRB0101
Crionegrensis_DRB0101
Crionegrensis_DRB0102
Csociabilis_DRB0101
Caustralis_DRB0101
Chaigi_DRB0102
Ctorquatus_DRB0103
Ctorquatus_DRB0104
Cpearsoni_DRB0101
Cpearsoni_DRB0102
Cpearsoni_DRB0103
Cpearsoni_DRB0104
Ctorquatus_DRB0107
Ctorquatus_DRB0102
Octodon_DRB0101	Y.....

Secuencias Exon 2 de DQA

Cmendocinus_DQA0101 G.G TC. A.. ..C
Octodon_DQA0101 G.G TC. A.. ..C
Octodon_DQA0102 TA.A. ..A

DQA aa

	YTHEFDGDEL	FYVDLDKKT	VHWMPGLKEI	EGFDPQGALN	NIVIAKHNLN	NLIKRS
Csociabilis_DQA0101						
Cmaulinus_DQA0104	I.....
Cboliviensis_DQA0103	I.....
Cfrater_DQA0102	I.....
Caustralis_DQA0101	Y.....	L.....
Cmaulinus_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cargentinus_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cbonettoi_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cconoveri_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cgoodfellowi_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cboliviensis_DQA0102	Q.....	IF..Q.
Cfrater_DQA0101	Q.....	IF..Q.
Cpearsoni_DQA0102	Q.....	V.....
Cpearsoni_DQA0103	Q.....	V.....
Octodon_DQA0102	Q.....	Y..Q.
Ctalarum_DQA0101	Y.....	.F.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Ctalarum_DQA0102	Y.....	.F.....	A V.....	.A.....	K I.VS..
Ctalarum_DQA0103	Y.....	.F.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Chaigi_DQA0103	Y.....	IF.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Copimus_DQA0102	Y.....	IF.....	A V.....	.A.V....	K .VS..
Copimus_DQA0103	Y.....	IF.....	A V.....	.A.V....	K .VS..
Cmaulinus_DQA0103	Y.....	IF.....	GA V.....	.A.V....	K I.VS..
Copimus_DQA0101	Y.....	IF.....	GA V.....	.A.V....	K I.VS..
Csteinbachi_DQA0101	Y.....	IF.....	GA V.....	.A.V....	K I.VS..
Csteinbachi_DQA0102	Y.....	IF.....	A V.....	.A.V....	K .VS..
Csteinbachi_DQA0103	Y.....	IF.....	A V.....	.A.V....	K .VS..
Cportecusi_DQA0101	Y.....	IL.....	A V.....	.A.G....	K I.VS..
Ctorquatus_DQA0101	Y.....	IF.....	A V.....	.A.V....	K .VS..
Ctorquatus_DQA0102	Y.....	IF.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Crionegrensis_DQA0102	Y.....	IF.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Cmendocinus_DQA0101	Y.....	IF.....	A V.....	.A.....	K .VS..
Octodon_DQA0101	Y.....	IF.....	A VD.....	.A.V....	K .VS..
Cgoodfellowi_DQA0102S.....
Cpearsoni_DQA0101S.....	L.....
Crionegrensis_DQA0101	Y.....S.....	L.....
Cboliviensis_DQA0101	Q.....	.F.....	GS.....	L.....
Cmaulinus_DQA0102	Q.....	.F.....	GS.....	L.....
Cfrater_DQA0103	Q.....	.F.....	GS.....	L.....

Secuencias Intron 2 de DQA

Octodon_DQA0101	AACTCTACTG	CTGCTACCAA	CGGTATGTC	TCACCATT--	---CTGCCAC	ACCTGACTGA	ACTTTTCCTC	TCACATTAGT
Octodon_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csociabilis_DQA0101	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Chaigi_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Caustralis_DQA0101	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cmaulinus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cmaulinus_DQA0102	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..AC	
Cmaulinus_DQA0103	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cmaulinus_DQA0104	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cargentinus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cbonettoi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cporteousi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Copimus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TTCG..C..A	
Copimus_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Copimus_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cconoveri_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cgoodfellowi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cgoodfellowi_DQA0102	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cboliviensis_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cboliviensis_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cboliviensis_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csteinbachi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csteinbachi_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csteinbachi_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cfrater_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cfrater_DQA0102	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cfrater_DQA0103	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cpearsoni_DQA0101	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cpearsoni_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cpearsoni_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctorquatus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctorquatus_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Crionegrensis_DQA0101	C.....	AA..TTT	TCCTCA..TCC..AC	
Crionegrensis_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cmendocinus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCGAC	

Octodon_DQA0101	TTCACATTC	TTCTTTCCAA	GGTAATTCT	GATGCTCTCT	CTTCCCACAA	ATTACATATT	TCCATGCAAT	ACAGG-TCCC
Octodon_DQA0102-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Csociabilis_DQA0101-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Chaigi_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctalarum_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Caustralis_DQA0101-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cmaulinus_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cmaulinus_DQA0102-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cmaulinus_DQA0103-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cmaulinus_DQA0104-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cargentinus_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cbonettoi_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cporteousi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Copimus_DQA0101-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAA	
Copimus_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Copimus_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cconoveri_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cgoodfellowi_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cgoodfellowi_DQA0102-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cboliviensis_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cboliviensis_DQA0102-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cboliviensis_DQA0103-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Csteinbachi_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csteinbachi_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Csteinbachi_DQA0103	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cfrater_DQA0101-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cfrater_DQA0102-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cfrater_DQA0103-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cpearsoni_DQA0101-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cpearsoni_DQA0102-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Cpearsoni_DQA0103-AC	..-G.G.C.	A..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Ctorquatus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Ctorquatus_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Crionegrensis_DQA0101-AC	..-G.G.C.	C..-.....	..-C.-AG.GT.	G-....TGA	.G.-..TCCC	TTCCCACAAA	
Crionegrensis_DQA0102	AA..TTT	TCCTCA..TCC..A	
Cmendocinus_DQA0101	AA..TTT	TCCTCA..TGA.G....	

Octodon_DQA0101	TGCATT-GTG	TATTCATTAC	-
Octodon_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Csociabilis_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Chaigi_DQA0103	-
Ctalarum_DQA0101	-
Ctalarum_DQA0102	-
Ctalarum_DQA0103	-
Caustralis_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cmaulinus_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cmaulinus_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cmaulinus_DQA0103	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cmaulinus_DQA0104	-
Cargentinus_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cbonettoi_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cporteousi_DQA0101	-
Copimus_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Copimus_DQA0102	-
Copimus_DQA0103	-
Cconoveri_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cgoodfellowi_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cgoodfellowi_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cboliviensis_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cboliviensis_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cboliviensis_DQA0103	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Csteinbachi_DQA0101	-
Csteinbachi_DQA0102	-
Csteinbachi_DQA0103	-
Cfrater_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cfrater_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cfrater_DQA0103	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cpearsoni_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cpearsoni_DQA0102	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Cpearsoni_DQA0103	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C
Ctorquatus_DQA0101	-
Ctorquatus_DQA0102	-
Crionegrensis_DQA0101	.TACA.ATCT	CCA.TTAATG	C

Crionegrensis_DQA0102-... -
Cmendocinus_DQA0101-... -