



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Milton H. Gallardo**

Instituto de Ecología y Evolución

Facultad de Ciencias

**VARIACIÓN HAPLOTÍPICA MITOCONDRIAL Y ORIGEN  
MÚLTIPLE EN *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae)**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**JOSÉ LUIS BULNES PARDO**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

**Por mi grandiosa familia  
y a todos los que ocupan  
un lugar en mi corazón.**

"Only the strong and good-hearted  
people can achieve noble ideals".

**Seiichi Yoshitaka Akamine**

## AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres, en agradecimiento por todos los sacrificios que han hecho en pos de un futuro próspero para sus hijos. Mi padre, **Bernardo Antonio Bulnes Ortíz**, me ha entregado su apoyo constante y su sabiduría. De mi madre, **Marta Magdalena Pardo Pardo**, he heredado el material genético necesario para ser quien soy!.

A mis hermanos les agradezco por todo lo que han vivido conmigo. Mi hermana **Jimena**, me ha dado clases de cómo luchar por lo que uno quiere y de la fuerza inconmensurable que poseen las mujeres. Gracias por estar ahí en los momentos difíciles de mi vida y por matizar con su sonrisa las penurias del pasado. Mi hermano **Pablo** es, literal y metafóricamente, mi otro yo. Es lejos la persona con la que más me ha tocado sortear las diferentes instancias de mi vida; desde el vientre de nuestra madre hasta el presente. Para muchos somos UNO, y para mí también. Mi hermano **Marco** siempre estará en mi corazón.

A mi tío **Ismael Álvarez Díaz**, por confiar en mi y su apoyo en el comienzo de este camino.

A **Lorena** por compartir gran parte de este periodo conmigo y darme a mi muñeco **Maximiliano**, que representa lo mejor que pude haber hecho en mí vida. Este paso está inspirado en tí, hijo querido.

A mi tutor, el **Dr. Milton Gallardo**, con quien compartí momentos en los cuales fue más que un profesor, fue mi maestro, y lo más importante, fue mi amigo. Confió en mí desde la partida y me apoyó hasta el final. Es por esto que le hago notar mi eterna gratitud, dejándole la frase: *“Al maestro con cariño”*.

Al **Dr. José Nuñez**, por su ayuda desinteresada, en lo académico y en lo personal. Me alegra haberlo conocido, sobretodo por su sentido del humor y los diálogos personales que compartimos. Me llevó un muy grato recuerdo de él.

Al **Dr. Jaime Figueroa**, por aceptar involucrarse en mi proyecto. A todos mis compañeros, de la carrera y del laboratorio. A **Don Fredy Mondaca** le agradezco su optimismo, buena onda y confianza. Muchas gracias tío Freddy!!

A mi maestro, **Oscar Marcelo Silva Frías**, le agradezco que llenara la mitad que faltaba de lo que soy ahora. Espero seguir en el futuro a su lado.

A mis amigos **Belcha, Buba, Cachorro, Jorge Caro, Juanito, Pato, Portiño, Oscar, Rodrigo y Yordan**. A mis amigas **Ale, Caro Herber, Carina, Jany, Katy, Paty y Yaz**. Gracias por tener gestos tan simpáticos conmigo. Las quiero mucho.

La presente investigación contó con el financiamiento del proyecto **FNC 1070217**.

## INDICE DE CONTENIDOS

	pág
1.- Resumen	1
1.1.- Summary	2
2.- Introducción	3
2.1.- Objetivo general	16
2.2.- Objetivos específicos	16
3.- Materiales y Métodos	17
3.1.- Material	17
3.1.1- Materiales biológico	17
3.1.2- Enzimas	21
3.1.3- Reactivos e insumos	21
3.2.- Métodos	23
3.2.1.- Preparación de DNA genómico	23
3.2.2.- Cuantificación del DNA genómico	24
3.2.3.- Amplificación por PCR	25
3.2.4.- Fraccionamiento del producto amplificado por PCR en gel de agarosa	26
3.2.5.- Secuenciación del producto amplificado por PCR	27
3.2.6.- Análisis filogenético de las secuencias	27
4.- Resultados	30
4.1.- Cuantificación de DNA genómico	30
4.2.- Amplificación de un fragmento del gen citocromo b	30
4.3.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas	32
4.4.- Análisis filogenético	32
4.5.- Análisis de los haplotipos	36

5.- Discusión	42
5.1.- Variación haplotípica mitocondrial y origen genético materno en <i>T. barrerae</i> .	45
5.2.- Origen múltiple en <i>T. barrerae</i>	48
5.3.- Implicaciones genéticas y evolutivas del origen múltiple en los poliploides	51
6.- Conclusiones	53
7.- Bibliografía	54

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Localidades de los especímenes utilizados en el estudio.	18-19
<b>Tabla 2.</b> Poblaciones y número de individuos utilizados en el estudio.	20
<b>Tabla 3.</b> Haplotipos identificados para el fragmento del gen citocromo b amplificado en <i>O. gliroides</i> , <i>O. mimax</i> , <i>P. aureus</i> y <i>T. barrerae</i> .	38
<b>Tabla 4.</b> Relación entre el número de individuos y el número de haplotipos identificados por población.	39

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Comparación entre la visión clásica y la visión actual acerca de la formación de un poliploide	5
<b>Figura 2.</b>	Modelo del origen genético de <i>T. barrerae</i> .	13
<b>Figura 3.</b>	Mapa satelital de las localidades donde fueron recolectados los especímenes utilizados en este estudio.	22
<b>Figura 4.</b>	Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 1,2 % de los fragmentos amplificados del gen citocromo b.	31
<b>Figura 5.</b>	Cladograma de consenso obtenido por Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana de un fragmento del gen citocromo b en <i>T. barrerae</i> , <i>P. aureus</i> , <i>O. mimax</i> y <i>O. gliroides</i> .	33-34
<b>Figura 6.</b>	Red de haplotipos del gen mitocondrial citocromo b de los octodóntidos <i>O. mimax</i> , <i>P. aureus</i> y <i>T. barrerae</i> .	41
<b>Figura 7.</b>	Esquema del origen materno mitocondrial en <i>T. barrerae</i> .	47

**ABREVIATURAS**

- DNA** = Ácido desoxirribonucleico.  
**AIA** = Alcohol Isoamílico  
**dNTP** = Desoxinucleótido trifosfato  
**EDTA** = Ácido etilendiamino tetraacético  
**EtBr** = Bromuro de etidio  
**Kb** = Kilobase  
**mA** = Miliampere  
**OD** = Densidad Óptica  
**pb** = Pares de bases  
**PCR** = Reacción en Cadena de la Polimerasa  
**RNA** = Ácido ribonucleico  
**TAE** = Tris acetato EDTA  
**Taq** = DNA polimerasa  
**TE** = Tris EDTA  
**UV** = Ultravioleta



## 1.- RESUMEN

La poliploidía ha sido muy importante en la radiación evolutiva de las angiospermas y en la mayoría de los vegetales. Sin embargo, la especiación por poliploidía es rara en los animales y prácticamente imposible en humanos. El reporte de un roedor sudamericano alotetraploide, *Tympanoctomys barrerae*, causó gran expectación. Su condición alopoliploide se corroboró mediante Southern *blot* de genes de copia única, el uso de sondas de genes ribosomales y del desarrollo epigenético (*Hoxc-8*) y recientes ensayos de GISH. Estos resultados sugerían un proceso de hibridización interespecífica.

En el presente trabajo se analizó la contribución de los linajes parentales que dieron origen a *T. barrerae*, por hibridización. Considerando la transmisión uniparental del gen mitocondrial citocromo b, se usaron secuencias de este gen como marcador molecular materno para determinar las relaciones filogenéticas y genealógicas entre 12 poblaciones de las especies más relacionadas a *T. barrerae*.

Los datos mostraron una distribución parafilética de las secuencias del DNA mitocondrial, reflejando que en el alotetraploide *T. barrerae* existen al menos dos instancias de origen independientes. Además, su origen materno es de tipo recíproco. Esto constituye un gran hallazgo, ya que implica hibridogénesis, recurrencia fenoménica de la alopoliploidía e introgresión génica, procesos hasta ahora desconocidos en mamíferos.

## 1.1.- SUMMARY

Polyploidy has been very important in the evolutionary radiation of the angiosperms and in most of plant species. However speciation by polyploidy is rare in animals and practically impossible in humans. The report of tetraploidy in a South American rodent allotetraploid, *Tympanoctomys barrerae*, caused great expectation. Its allopolyploid condition was corroborated by Southern *blot* of single copy genes, and by the use of probes of rDNA genes. Other assays included FISH of genes involved in epigenetic development (*Hoxc-8*), and recently, GISH analyses. These results suggested a process of interspecific hybridization.

In the present study, the contribution of parental lineages that gave rise to *T. barrerae* by interspecific hybridization were conducted. Considering the uniparental transmission of the mitochondrial gene cytochrome b, its sequences were used as a maternal marker to determine the phylogenetic relation and genealogy between 12 populations of octodontids.

The data show a paraphyletic distribution of the mtDNA sequences, indicating that at least two instances of independent origin of reciprocal type can be recognized in *T. barrerae*. This constitutes an important finding since implies hydrogenesis, recurrence of tetraploidization, and genetic introgression, so far unknown in mammals.

## 2.- INTRODUCCIÓN

La poliploidía, que consiste en la presencia de dos o más genomas completos en las células de un organismo, es un importante mecanismo evolutivo involucrado en el origen y la diversificación de las especies (Ohno, 1970; Soltis y Soltis, 1999; Comai, 2005). Este fenómeno se encuentra ampliamente representado en las plantas, generándoles altos niveles de variabilidad adaptativa. En efecto, los poliploides tienen tasas más altas de recombinación y sus adaptaciones les permiten vivir en ambientes extremos (Song y col., 1995; Soltis y Soltis, 2000; Wendel, 2000).

En relación a los vegetales, cerca del 70% de las angiospermas y un 95% de las pteridófitas han experimentado eventos de poliploidización (Grant, 1981; Masterson, 1994; Soltis y Soltis, 1999), incluyendo entre ellos algunos paleopoliploides como en el caso del maíz (*Zea mays*; Gaut y Doebley, 1997), *Arabidopsis thaliana* (AGI, 2000; Vision y col., 2000) y la levadura (Wolfe, 2001).

Dentro de las formas para producir aumentos del genoma por poliploidía se encuentra la autoploidía. Este fenómeno corresponde a la duplicación total del genoma de una misma especie originaria. Por otro lado, en la alopoliploidía se produce la fusión de dos o más genomas provenientes de especies distintas (Otto y Whitton, 2000).

Debido a que los eventos de hibridación eran considerados como una rareza en la evolución organísmica, inicialmente se suponía que cada especie poliploide tenía un origen único. De tal forma, se generaba uniformidad genética entre los miembros de la nueva especie debido a que provenían de un sólo par de progenitores. Sumado a lo anterior, está el hecho de que los descendientes poliploides quedan aislados reproductivamente de sus ancestros diploides (Stebbins, 1971; Soltis y Soltis, 2000). Por lo tanto, la visión clásica consideraba a los poliploides como un saco evolutivo ciego carente de posibilidades adaptativas (Wagner, 1970).

En contraposición con esta visión clásica, un hallazgo importante respecto de la génesis de los poliploides taxonómicamente reconocidos es que tienen un origen múltiple, independiente y de forma recurrente (Soltis y Soltis, 1995; Soltis y Soltis, 1999). Aun más, en pocos casos se ha reportado un origen único en poliploides (Widmer y Baltisberger, 1999; Sall y col., 2003).

Las especies poliploides con origen múltiple presentan mayor diversidad genética, en parte debido a que su proceso de formación se deriva de la fusión de distintos genotipos provenientes de diferentes progenitores. Este proceso aumenta la frecuencia de hibridación y de genotipos dentro de las especies poliploides, como se ilustra en la Figura 1 (Soltis y Soltis, 2003).

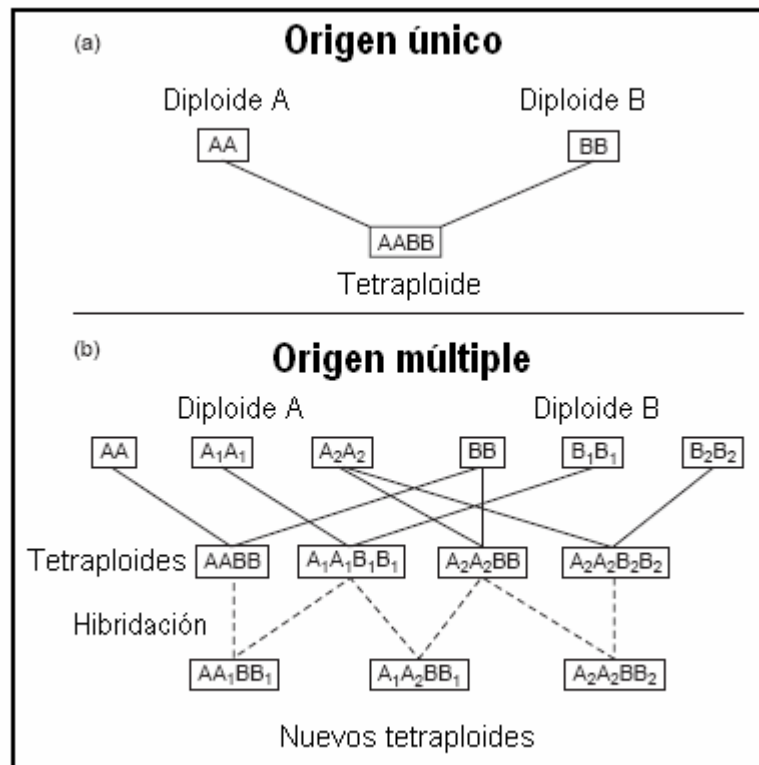


Figura 1.- Comparación entre la visión clásica (a) de la formación de un poliploide y la visión actual (b). El modelo clásico establecía que cada especie poliploide se formaba en tan sólo una instancia, dando como resultado una nueva especie genéticamente uniforme. Actualmente se sabe que cada especie poliploide se origina en forma repetida a partir de diferentes genotipos parentales. Esta dinámica genera una gran diversidad de genotipos en los poliploides. Posteriormente, la hibridación entre estos genotipos da lugar a una variabilidad genética adicional (Soltis y Soltis, 2000). Las letras (A, B, etc.) en los rectángulos indican los genotipos, que en el caso de un origen múltiple generan mayor variabilidad intraespecífica.

Para estudiar la derivación genealógica de una especie poliploide, la diversidad de haplotipos amplificadas usando marcadores moleculares uniparentales entregan valiosas evidencias de las relaciones ancestro-descendiente. Para ello se comparan los haplotipos presentes en la especie derivada y en las especies ancestrales que le dieron origen (Ptacek y col., 1994). Esta estrategia se basa en el hecho de que el DNA mitocondrial es altamente variable y que debido a su herencia exclusivamente materna no sufre recombinación. Por lo tanto, se obtienen datos de herencia uniparental que ayudan a establecer la ancestría de los poliploides en forma inequívoca (Brown y col. 1979).

En estudios desarrollados en vegetales se han aprovechado las ventajas que ofrecen los marcadores moleculares cloroplásticos, que también siguen un modelo de herencia matrilineal. Así, la ausencia de recombinación sumado a la presencia de múltiples copias dentro de las células permite detectar procesos de introgresión génica (Miwasa y Suzuki, 2002; Doyle y col., 2003; Fuertes-Aguilar y Nieto-Feliner, 2003). De este modo, el análisis filogenético de las secuencias de cloroplastos y de mitocondrias en especies pertenecientes al mismo género permite encontrar clados monofiléticos de haplotipos. Así el monofiletismo de los haplotipos es considerado como una evidencia incontrovertible de derivación genética desde un par de progenitores. Pero en otros casos, los haplotipos pueden estar dispersos en las distintas ramas del árbol filogenético, lo que se conoce como distribución parafiletica.

Tradicionalmente, la distribución parafilética de los haplotipos implica origen múltiple (Ptacek y col., 1994). Pero si existe bajo apoyo *bootstrap* en los distintos clados, no existe resolución filogenética para los datos (Tate y Simpson, 2003).

En la práctica, el origen múltiple de los poliploides se ha inferido debido a que diferentes taxa con distribución geográfica dispar forman clados parafiléticos en el árbol filogenético (Segraves y col., 1999). Este hecho se ve fortalecido cuando las especies parentales diploides y sus descendientes poliploides se encuentran en un área geográfica reducida o bien, en simpatria, utilizando el mismo hábitat (Soltis y col., 1995; Hedrén, 2003). Al contrario, el origen único de los poliploides se ve fortalecido cuando los haplotipos provenientes de especímenes con distribución geográfica dispar forman clados monofiléticos en el árbol filogenético (Ptacek y col., 1994; Tate y Simpson, 2003).

Unos de los poliploides vegetales más estudiados corresponden a los alotetraploides formados recientemente, pertenecientes al género *Tragopogon* (Asteraceae). *Tragopogon mirus* y *T. miscellus* se han originados hace no más de 80 años, en una pequeña región de Washington (USA; Soltis y Soltis, 2000). Tomando en cuenta la distribución geográfica que presentan estas dos especies, los estudios filogenéticos de isoenzimas y de DNA ribosomal (genes 18S-26S) han permitido encontrar 21 linajes de *T. miscellus* con orígenes independientes y 11 de *T. mirus* (Soltis y Soltis, 2004).

Otro estudio realizado en el género *Tarasa* (Malvaceae), utilizando como marcadores moleculares los genes nucleares (ITS1 e ITS2) y cloroplásticos (espaciadores psbA-trnH y trnT-trnL y el intrón matK-39 trnK), no apoyó la monofilia en el árbol genealógico de la especie. Por el contrario, se encontró una distribución parafilética que da cuenta de las múltiples instancias en las que fue generada la especie (Tate y Simpson, 2003).

Pero el origen múltiple también ha sido reportado en especies animales, de modo que este fenómeno no es exclusivo de las plantas. Por ejemplo, al analizar las filogenias construídas con secuencias del gen citocromo b en los peces poliploides del género *Barbus* (Cyprinidae), se han encontrado 2 grupos monofiléticos en los tetraploides con origen independiente: los de África del sur y los de Europa mediterránea. Las pequeñas especies diploides africanas forman grupos parafiléticos, mientras que los hexaploides africanos originados en forma reciente constituyen un clado monofilético (Tsigenopoulos y col., 2002; Mabuchi y col., 2005).

En anfibios poliploides ocurren procesos similares de origen múltiple. Por ejemplo, en *Hyla versicolor* se ha encontrado un origen múltiple mediado por múltiples eventos de hibridación que involucran a tres especies diploides distintas como sus ancestros más probables (Ptacek y col., 1994; Holloway y col 2006). También en el género *Bufo* se hallaron dos instancias de origen múltiples. En *Bufo viridis* del subgrupo Euroasiático se empleó DNA mitocondrial para establecer el origen genético. Se encontraron haplotipos



compartidos en los diploides y tetraploides provenientes de las regiones de Turkmenistán y de Irán. Además se reportó un proceso de hibridación entre diploides y tetraploides que genera especies triploides fértiles y totalmente adaptadas al ambiente (Stock y col., 2005).

Otro aspecto interesante de considerar entre los aloploidos generados por hibridación interespecífica es que su origen no puede ser inferido por interrupción del flujo génico. En efecto, en vez de divergencia evolutiva se produce una fusión de los linajes que generan genomas mixtos en la nueva especie formada. Como resultado de estos procesos de hibridación no es un árbol filogenético dicotómico la mejor forma de graficar el intercambio genético, ya que se forma en una red de relaciones haplotípicas (Philippe y Forterre, 1999; Baptiste y Brochier, 2004). En tal caso es recomendable realizar una aproximación por coalescencia y no un análisis filogenético. El análisis de coalescencia busca en forma retrospectiva las secuencias que habrían sido las originales y desde las cuales se derivaron los haplotipos actuales. Así, el poliploide híbrido y sus especies parentales que le dieron origen siguen un patrón de evolución de tipo reticulado (Riesenberg y Noyes, 1998; Lawton y col., 2003; Ritz y col., 2005).

Haciendo uso de la estructura jerárquica ramificada de las genealogías es posible conectar filogenéticamente los haplotipos mediante una red de haplotipos, haciéndolos coalescer hasta llegar al ancestro en común más próximo dentro del grupo de datos analizados (Avice, 2000; Clement y col., 2000).

Con este tipo de análisis se facilita enormemente la exploración y discusión de las hipótesis de relaciones que se pueden establecer entre los taxa en estudio. Así se generan hipótesis que han sido utilizadas como marco conceptual para determinar ancestría y relaciones genéticas entre las especies involucradas en la poliploidización y la progenie surgida por ese proceso (Baumel y col., 2002; Doyle y col., 2003). Todo esto incide en que se pueda confirmar el origen múltiple y recurrente, y determinar efectivamente cuales son los linajes ancestrales que han dado origen a un aloploiploide (Smedmark y coll., 2005).

El reporte del descubrimiento de poliploidía en mamíferos concitó una gran expectación en el medio científico (Gallardo y col., 1999). Esto, debido a que el proceso de poliploidización es inusual en los vertebrados y se le considera prácticamente irrelevante en la diversificación de los mamíferos. La imposibilidad de generar mamíferos poliploides se debe a las serias disrupciones que se producen en el sistema de determinación del sexo y en el mecanismo de compensación de dosis (Orr, 1990; Otto y Whitton, 2000; Mable, 2004).

Por ejemplo, los estudios clínicos indican que los triploides o tetraploides humanos mueren rápidamente luego de nacer, debido a malformaciones congénitas tanto internas como externas (Niebuhr, 1974; Lafer y Neu, 1998; Guc-Scekic, 2002). Por lo tanto, la formación de autotetraploides humanos es un proceso altamente deletéreo, sin posibilidad de éxito reproductivo. Sin embargo, la rata vizcacha colorada, *Tympanoctomys barrerae* ( $2n = 102$ )

derribó la suposición de imposibilidad de encontrar un mamífero poliploide fértil y muy adaptado a las condiciones ambientales de su hábitat.

*Tympanoctomys barrerae* es un roedor octodóntido aloploiploide endémico de Suramérica. Se distribuye en las regiones áridas del oeste-central de Argentina (Díaz y col., 2000; Mares y col., 2000). Presenta el número cromosómico más alto informado hasta la fecha en mamíferos ( $2n = 102$ ) y su contenido de DNA por célula somática (16,8 pg) duplica el encontrado en otros roedores emparentados (Contreras y col., 1990; Gallardo y col., 2003).

Inicialmente, Gallardo y col. (1999) hipotetizaron que el origen de *T. barrerae* se debía a un proceso de autotetraploidía, a partir de su taxón diploide filogenéticamente más cercano, *Octomys mimax* ( $2n = 56$ ). Sin embargo, esta suposición dejaba dudas en torno a la formación de su cariotipo de 102 cromosomas. En efecto, la duplicación de un cariotipo de 56 cromosomas implica la pérdida selectiva de 10 pares cromosómicos, algo excesivamente inusual.

El descubrimiento y la descripción de un nuevo roedor octodóntido, *Pipanacoctomys aureus* ( $2n = 92$ ) entregó una nueva pieza a considerar en el esclarecimiento del origen genético de *T. barrerae* (Mares y col., 2000). La condición tetraploide de esta especie fue corroborada mediante la medición del contenido de DNA que posee por célula somática (15,4 pg) y análisis de Southern blot (Gallardo y col., 2004). Mediante análisis filogenéticos de genes nucleares (Receptor de la Hormona del Crecimiento; GHR) y mitocondriales (12S) fue posible demostrar que *P. aureus* es el grupo hermano de *T. barrerae*.

Además, y al igual que en sus ancestros diploides, ambos taxa tetraploides comparten la presencia de un sólo par con constricción secundaria o cromosomas NOR y un sólo cromosoma Y en los machos (Gallardo y col., 2004). *Octomys mimax* ( $2n= 56$ ) es el taxa diploide más próximo a ambos taxa tetraploides (Honeycutt y col., 2003)

Así se propuso que el origen de *T. barrerae* derivaba de la hibridación entre las especies *P. aureus* y *O. mimax*. Este modelo plantea que el genoma mixto de *T. barrerae* se habría originado de la fusión de gametos no reducidos provenientes de *O. mimax* ( $2n= 56$ ) y los gametos diploides de *P. aureus* (46 cromosomas; Gallardo y col., 2007). Bajo este modelo, la combinación numérica de los gametos parentales ( $46 + 56$ ) permite originar un complemento de 102 cromosomas tal como se muestra en la Figura 2.

En estudios recientes de hibridación genómica *in situ* (GISH) se ha corroborado la naturaleza mixta del genoma de *T. barrerae*. Estos resultados apoyan fuertemente el modelo planteado (datos no publicados; ver Figura 2).

Tomando en consideración que *T. barrerae* es un roedor alotetraploide, en el presente trabajo se puso a prueba la hipótesis de su origen múltiple, usando como marcador el gen mitocondrial citocromo b. Un fragmento de este gen fue amplificado tanto en *T. barrerae* como en las especies consideradas parentales. Este gen se ha utilizado en numerosos estudios para establecer relaciones filogenéticas dentro de mamíferos (Irwin y col., 1991; Meyer, 1994). Además, la alta tasa de sustitución nucleotídica lo hace muy útil en las comparaciones interespecíficas o intraespecíficas.

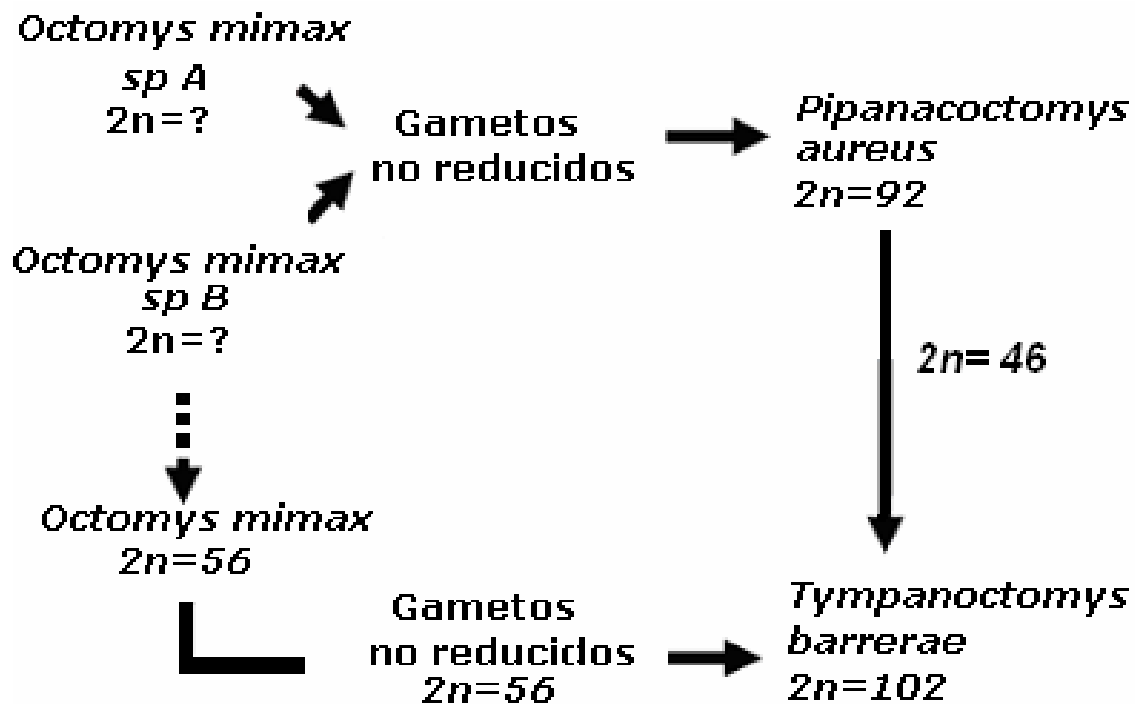


Figura 2.- Modelo del origen genético de *T. barrerae*, a partir de una hibridación interespecífica entre *O. mimax* y *P. aureus*. La formación de gametos no reducidos en *O. mimax* es necesaria para originar a *T. barrerae* (Gallardo y col., 2007).

Los resultados obtenidos en muchos de los estudios filogenéticos donde se han utilizado secuencias del gen citocromo b como marcador molecular han permitido dilucidar las relaciones intraespecíficas en roedores equímidos (Lara, y col., 1996), antílopes (Matthee y Robinson, 1999), avispas (Jousselin y col., 2004) y hienas (Rohland y col., 2005). Es por esta y otras razones ya mencionadas que se decidió utilizar este mismo marcador molecular para realizar análisis filogenéticos, a fin de poder inferir el origen matrilineal de *T. barrerae*.

Finalmente, un aspecto interesante a considerar en los estudios de especies de roedores subterráneos es que estas se distribuyen en ambientes fragmentados (Patton, 1996). Debido a sus restringidas capacidades de dispersión, estos animales se encuentran formando pequeñas unidades reproductivas, con baja variación genética y una alta tasa de diferenciación interpoblacional (Smith y Patton, 1993; Wlasiuk y col., 2003).

En la realización de la presente investigación se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

**Ho:** *T. barrerae* tiene origen único. Esta hipótesis predice que los haplotipos de las poblaciones analizadas forman grupos monofiléticos en el árbol filogenético que comparte con sus respectivos ancestros (*P. aureus* y *O. mimax*)

**H1:** *T. barrerae* tiene un origen múltiple e independiente. Esta hipótesis predice que *T. barrerae* presenta haplotipos únicos (intra- o interpoblacionalmente) que se agrupan parafiléticamente en el árbol filogenético, que también incluye a sus especies ancestrales, *P. aureus* y *O. mimax*.

Así, la topología que se derive del análisis del marcador mitocondrial seleccionado nos permitirá inferir si existe parafilia intra e interpoblacional en *T. barrerae*. En el caso de obtener resultados positivos, se concluirá la recurrencia fenoménica de la tetraploidización en esta especie.

### **2.1.- Objetivo general**

1.- Poner a prueba el origen múltiple de *T. barrerae.*, mediante análisis filogenético de secuencias de un fragmento del gen mitocondrial citocromo b,

### **2.2.- Objetivos específicos**

1.1.- Amplificar y secuenciar un fragmento del gen citocromo b en *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides* para construir la filogenia mitocondrial de este grupo de roedores octodóntidos.

1.2.- Determinar mediante el análisis filogenético de las secuencias mitocondriales si se forman clados monofiléticos o parafiléticos que permitan discriminar si el origen de la poliploidia en *T. barrerae* ha sido un evento único o múltiple.

1.3.- Analizar la red de haplotipos formada por las secuencias mitocondriales de *T. barrerae* y sus especies parentales *P. aureus*, *O mimax* para determinar la contribución genética materna que le dió origen.



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- MATERIAL

##### 3.1.1- Material biológico

Se utilizó el material biológico proveniente de 65 especímenes, provenientes de 12 poblaciones naturales. De éstos, 43 corresponden a *T. barrerae*, 10 a *P. aureus*, nueve a *O. mimax* y tres a *O. gliroides* (Tabla 1). Los especímenes de *O. gliroides* se utilizaron como grupo externo para enraizar el árbol filogenético. En la Tabla 2 se resume el número de individuos recolectados por población.

Todos los especímenes fueron colectados en su hábitat natural, sacrificados por sobredosis de éter y procesados para análisis posteriores. Las localidades de captura se indican en el mapa de la Figura 3. El tratamiento de los animales se realizó de acuerdo a las normas de bioética establecidas por la Universidad Austral de Chile.

Los especímenes se encuentran registrados en la Colección de Mamíferos del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile y en el Centro Regional de Investigación Científicas y Tecnológicas (CRICYT) en Mendoza, Argentina.

**Tabla 1.** Localidades de los especímenes utilizados en el estudio. Las abreviaturas corresponden a TB = *T. barrerae*, PA = *P. aureus*, OM = *O. mimax* y OG = *O. gliroides*. Las localidades se abreviaron con los siguientes códigos: AA = Añelo-Añelo, AC = Añelo-Castillo, AT = Añelo-Agua de Tero, CH = Chusmisa, MGP = Malargüe-Guarda Parque, ML = Malargüe, NI = Nihuil, PI = Salar de Pipanaco, PM = La Pampa, TA = El Tapón y VL = Valle de la Luna.

<b>ESPECIE</b>	<b>Localidad</b>	<b>Abrev.</b>
<i>O. gliroides</i>	Chusmisa, Tarapacá, Chile	OG.CH1
<i>O. gliroides</i>	Chusmisa, Tarapacá, Chile	OG.CH2
<i>O. gliroides</i>	Chusmisa, Tarapacá, Chile	OG.CH3
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL1
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL2
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL3
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL4
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL5
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL6
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL7
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL8
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	OM.VL9
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI1
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI2
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI3
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI4
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI5
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI6
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI7
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI8
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI9
<i>P. aureus</i>	Salar de Pipanaco, Catamarca, Argentina	PA.PI10
<i>T. barrerae</i>	Nihuil, Mendoza, Argentina	TB.NI1
<i>T. barrerae</i>	Nihuil, Mendoza, Argentina	TB.NI2
<i>T. barrerae</i>	El Tapón, Mendoza, Argentina	TB.TA1
<i>T. barrerae</i>	El Tapón, Mendoza, Argentina	TB.TA2
<i>T. barrerae</i>	El Tapón, Mendoza, Argentina	TB.TA3
<i>T. barrerae</i>	El Tapón, Mendoza, Argentina	TB.TA4
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Añelo), Neuquén, Argentina	TB.AA1
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Añelo), Neuquén, Argentina	TB.AA2
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Añelo), Neuquén, Argentina	TB.AA3
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Añelo), Neuquén, Argentina	TB.AA4

<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT1
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT2
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT3
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT4
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT5
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT6
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT7
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT8
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT9
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT10
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero), Neuquén, Argentina	TB.AT11
<i>T. barrerae</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	TB.VL1
<i>T. barrerae</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	TB.VL2
<i>T. barrerae</i>	Valle de la Luna, San Juan, Argentina	TB.VL3
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC1
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC2
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC3
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC4
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC5
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo), Neuquén, Argentina	TB.AC6
<i>T. barrerae</i>	La Pampa, Argentina	TB.PM1
<i>T. barrerae</i>	La Pampa, Argentina	TB.PM2
<i>T. barrerae</i>	La Pampa, Argentina	TB.PM3
<i>T. barrerae</i>	La Pampa, Argentina	TB.PM4
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML1
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML2
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML3
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML4
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML5
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML6
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML7
<i>T. barrerae</i>	Malargüe, Mendoza, Argentina	TB.ML8
<i>T. barrerae</i>	Malargüe (G. Parque), Mendoza, Argentina	TB.MGP

**Tabla 2.** Poblaciones y número de individuos utilizados en este estudio.

Especie	Localidad	N° Individuos
<i>O. gliroides</i>	Chusmisa	3
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna	9
<i>P. aureus</i>	Salar Pipanaco	10
<i>T. barrerae</i>	Valle de la Luna	3
<i>T. barrerae</i>	Nihuil	2
<i>T. barrerae</i>	El Tapón	4
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Añelo)	4
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero)	11
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo)	6
<i>T. barrerae</i>	La Pampa	4
<i>T. barrerae</i>	Malargüe	8
<i>T. barrerae</i>	Malargüe (Guarda Parque)	1

### 3.1.2.- Enzimas

Invitrogen	<i>Taq</i> DNA Polimerasa, RNAsa A y dNTPs
Promega	Proteinasa K

### 3.1.3.- Reactivos e insumos

Genset SA	Oligonucleótidos partidores (PCR)
GibcoBRL	Marcadores DNA $\lambda$ / <i>Hind</i> III y 100 pb.
Merck	Etanol absoluto, isopropanol, cloroformo y ácido clorhídrico 37%.
Winkler	Acetato de amonio, fenol equilibrado saturado básico y alcohol isoamílico.
Sigma	Bromuro de etidio, EDTA.



Figura 3.- Mapa satelital de las localidades donde fueron recolectados los especímenes utilizados en este estudio. En círculos se individualizan los puntos de recolección en Argentina.

## 3.2.- MÉTODOS

### 3.2.1.- Preparación de DNA genómico.

#### Soluciones.

Tampón de extracción: Tris/HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 0,1 M [pH 8,0], SDS 0,5% y RNAsa pancreática 20 µg/ml

Tampón TE (Tris-EDTA) pH 8,0 : Tris/HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]

El DNA genómico se purificó según el método de extracción por fenol/cloroformo (Sambrook y col., 1989). Se pulverizó aproximadamente 0,50 g de tejido fresco previamente sumergido en nitrógeno líquido. Una vez evaporado el nitrógeno, el tejido pulverizado se traspasó a un tubo Falcón de 15 ml que contenía 10 volúmenes de tampón de extracción. Se incubó por 1 hora a 37°C con agitación ocasional. Luego se agregó proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml, incubando la muestra en baño María a 50°C toda la noche. Después de la incubación, una vez que la suspensión llegó a temperatura ambiente, se agregó un volumen de fenol equilibrado con 0,5 M Tris/HCl [pH 8,0], mezclando suavemente las dos fases, por inversión. Las fases se separaron por centrifugación a 5.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió con una pipeta de punta ancha a un tubo Falcón de 15 ml limpio, repitiéndose el proceso de extracción dos veces. En la última extracción se utilizó un volumen equivalente de

fenol/cloroformo/AIA (25:24:1), separando las fases por centrifugación a 5.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. A la última fase acuosa, se le adicionó 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitar el DNA genómico.

El ácido nucleico se extrajo enrollándolo en una pipeta Pasteur de punta doblada. Este se lavó con etanol al 70% congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se dejó secar al aire. Posteriormente, el DNA se resuspendió en 1 ml de tampón TE pH 8,0 y se procedió al almacenado el material obtenido a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2.- Cuantificación del DNA genómico.**

La concentración del DNA se estimó midiendo su absorbancia a 260 nm, en un espectrofotómetro UV-1203 Shimadzu. Para calcular la concentración se consideró que una unidad de absorbancia a 260 nm (1 OD) corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de doble hebra (Sambrook y col., 1989).

La pureza del DNA se evaluó a través de la razón  $A_{260}/A_{280}$ , que para un DNA puro fluctúa entre 1,7 y 1,85. La calidad del DNA se estimó directamente en un gel de agarosa al 1,2%, teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), bajo luz UV.



### 3.2.3.- Amplificación de secuencias nucleotídicas por PCR

Para la amplificación por PCR de un fragmento del gen citocromo b, de aproximadamente 800 pares de bases, se utilizaron las secuencias de los partidores MVZ05 5`-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3` (ubicado en la cadena liviana) y MVZ16 5`-AAATAGGAAGTATCACTCTGGTTTGAT-3` (ubicado en la cadena pesada), descritos por Smith y Patton (1993). En un tubo de polipropileno estéril de 0,2 ml se agregó 100 ng de DNA genómico, 2 µl de solución 10 µM de cada partidor específico para la amplificación MVZ05 y MVZ16, 2 µl de tampón 10xPCR, 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,4 ul de solución de dNTP 10 mM, 0,2 µl de Taq polimerasa 5U/µl y agua destilada desionizada estéril hasta completar un volumen total de 50 µl.

Como control negativo se agregó un tubo que contiene todos los componentes de la reacción de amplificación, excepto el DNA templado, para descartar cualquier tipo de contaminación por DNA exógeno en el ensayo.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 2400. El protocolo de amplificación consistió en un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 min. A continuación se realizaron 35 ciclos consistentes en: un paso de denaturación a 94°C por 30 seg., un paso de apareamiento de los oligonucleótidos con el templado a 50°C por 1 min y un paso de extensión a 72°C por 1 min. La extensión final se realizó a 72°C por 10 min. El resultado de la amplificación se verificó por electroforesis en gel de

agarosa al 1,2%, con tinción de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizándose 5 µl de producto de PCR por carril. Los tubos se almacenaron a -20°C.

### **3.2.4.- Fraccionamiento de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

#### **Soluciones.**

TAE 1x (Tris-acetato 20 mM, pH 8.0), EDTA 1 mM y acetato de sodio 10 mM.

Tampón de carga 6x: 0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa en agua.

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. La concentración de agarosa fluctuó entre 1,0 y 1,2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a visualizar. Como tampón de corrida se utilizó TAE 1x.

Las muestras de DNA se aplicaron al gel mezclado con tampón de carga. Para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA visualizados en el gel, las muestras se fraccionaron junto con un estándar de tamaño molecular conocido.

La electroforesis se llevó a cabo entre 50 – 75 mA y el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron con cámara digital DC290 Kodak, utilizando filtro fluorescente.

### **3.2.5.- Secuenciación de los productos amplificados.**

Los productos amplificados por PCR fueron etiquetados y enviados a Macrogen (Korea) para su posterior secuenciación, según los protocolos estándares internacionales utilizados por dicha empresa. Una vez realizada la secuenciación, la información de las secuencias fue descargada del servidor de la empresa para su análisis posterior.

### **3.2.6.- Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas.**

Las secuencias del fragmento del gen citocromo b para las cuatro especies de roedores se alinearon utilizando el programa Clustal X (Thompson y col. 1997). Se realizaron alineamientos con penalidades de 30-50 en la apertura de los *gaps* y 10-20 en la extensión, debido a que se trabajó con secuencias mitocondriales que son completamente codificantes.

Los alineamientos fueron revisados mediante inspección visual, excluyendo las secuencias que presentaban un porcentaje de divergencia superior al 50%, obteniéndose una matriz de secuencias exportable a PAUP en formato Nexus.

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron utilizando los programas PAUP\* 4.0b10 (Máxima Parsimonia; Swofford, 2001), GARLI 0.95 (Máxima Verosimilitud; Zwickl, 2006) y MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Como grupo externo en todos los análisis realizados se utilizaron 3 secuencias del mismo fragmento del gen citocromo b amplificado en la especie *O. gliroides*. Los *gaps* en estos análisis fueron tratados como datos faltantes. El soporte de los nodos individuales se estimó mediante el método de remuestreo (iteraciones "bootstrap"; Felsenstein, 1985). Se realizaron 200 iteraciones bootstrap en el análisis de los datos.

Para el análisis de máxima parsimonia (MP) se utilizó la opción de búsqueda heurística, usando secuencias de adición al taxa más cercano e intercambio de ramas por bisección y reconexión (TBR; Swofford, 2001). Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupos externos ("outgroup")

El análisis de máxima verosimilitud (ML) se llevó a cabo utilizando los parámetros del modelo de sustitución de tiempo global reversible (GTR) y el soporte de los nodos individuales se estimó a través de 200 réplicas bootstrap (Zwickl, 2006).

El análisis del árbol filogenético por inferencia bayesiana se realizó utilizando el software Mr.Bayes versión 2.01 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). La matriz de datos fue analizada en  $5 \times 10^6$  generaciones, mediante dos procesos simultáneos, computándose 200 réplicas *bootstrap* de soporte en los árboles generados.

Las secuencias que diferían en una sustitución nucleotídica fueron consideradas como haplotipos distintos.

El análisis de las genealogías se realizó mediante la construcción de una red de haplotipos utilizando el programa TCS 1.21 (Clements y col., 2000) empleando el criterio de conexión bajo 85 pasos mutacionales, con el fin de extender al máximo la red de haplotipos sin excluir ninguno.

## **4.- RESULTADOS**

### **4.1.- Cuantificación de DNA genómico.**

La concentración del DNA purificado de las muestras de tejido provenientes de *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides* fue estimada mediante espectrofotometría. Se utilizó la razón de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  como criterio de pureza, la cual arrojó siempre mayor a 1,5. La concentración del DNA purificado en las muestras fluctuó entre los 1,0 mg/ml y 1,2 mg/ml.

### **4.2.- Amplificación de un fragmento del gen citocromo b mediante PCR.**

La Figura 4 muestra un fraccionamiento electroforético de los productos de PCR de la amplificación del fragmento del gen citocromo b en *T. barrerae*, *P. aureus* y *O. mimax*. Se observan productos amplificados de un tamaño aproximado de 800 pb según lo esperado, en ausencia de cualquier tipo de amplificación inespecífica. En el carril del control negativo no se visualiza ningún producto amplificado, lo que permite descartar la presencia de DNA genómico foráneo contaminante.

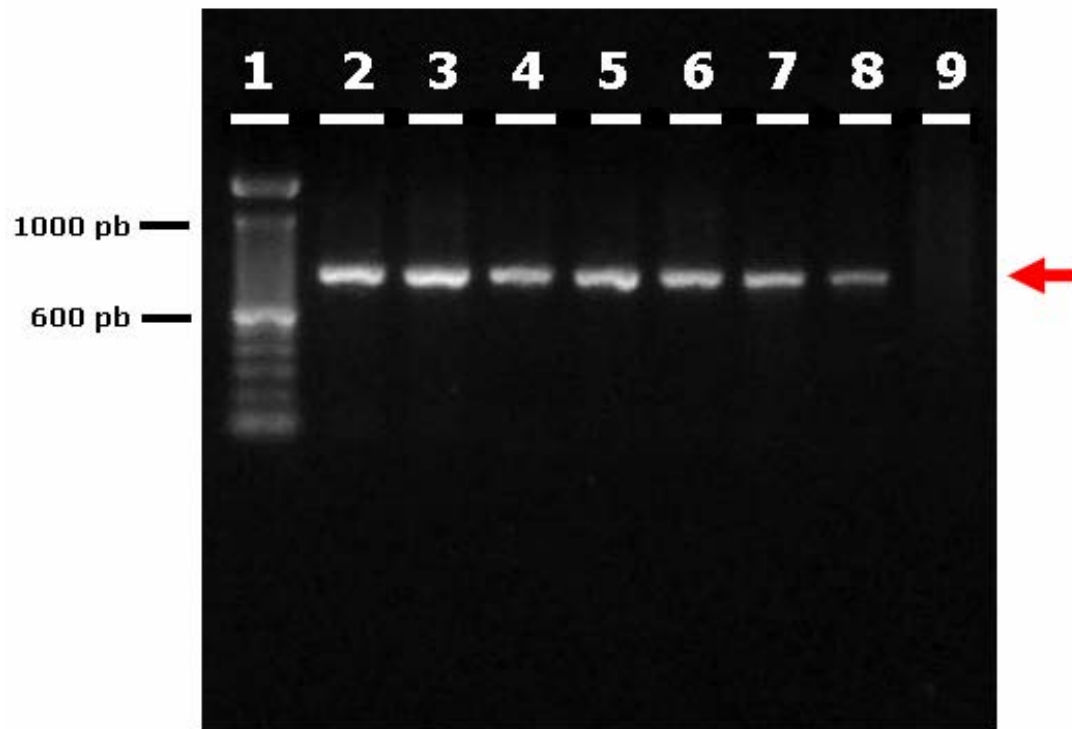


Figura 4.- Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 1,2 % de fragmentos amplificados del gen citocromo b. Carril 1: Estándar de tamaño molecular 100 pb (250 ng); carriles 2 y 3, fragmentos amplificados en *T. barrerae*; carriles 4 y 5 fragmentos amplificados en *P. aureus*; carriles 6 y 7, fragmentos amplificados en *O. mimax*; carril 8, fragmento amplificado en *O. gliroides*; carril 9, control negativo. La flecha roja indica los productos amplificados de un tamaño de 800 pb aproximadamente.

#### **4.3.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de citocromo b en *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides*.**

Las penalidades en la apertura de los *gaps* fue de 50, mientras que en la extensión tuvo un valor de 20 en la extensión, debido a que las secuencias mitocondriales son completamente codificantes. Así, el alineamiento de las 65 secuencias permitió construir una matriz de 672 nucleótidos, libre de *gaps*.

#### **4.4.- Análisis filogenético.**

Los tres criterios utilizados (M. Parsimonia, M. Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) dieron como resultado una única topología (Figura 5). El análisis de los datos por Máxima Parsimonia generó un árbol más parsimonioso de una longitud  $L = 311$  pasos, con un índice de consistencia  $CI = 0,6817$ , índice de homoplasia  $HI = 0,3183$  y un índice de retención  $RI = 0,9353$ . Se identificaron 178 sitios variables, de los cuales 155 eran parsimoniosamente informativos. Estos datos reflejan un bajo porcentaje de homoplasia en las secuencias analizadas.

Los análisis mediante máxima verosimilitud e inferencia bayesiana resultaron en un único árbol, con altos valores de probabilidades *a posteriori* de  $-\ln L = 2315,779$  y  $-\ln L = 2683,713$  respectivamente. Luego de 200 réplicas bootstrap y  $5 \times 10^6$  generaciones, se obtuvo un árbol con la misma topología obtenida mediante el criterio de Máxima Parsimonia y con similares valores de soporte de *bootstrap* (Figura 5).



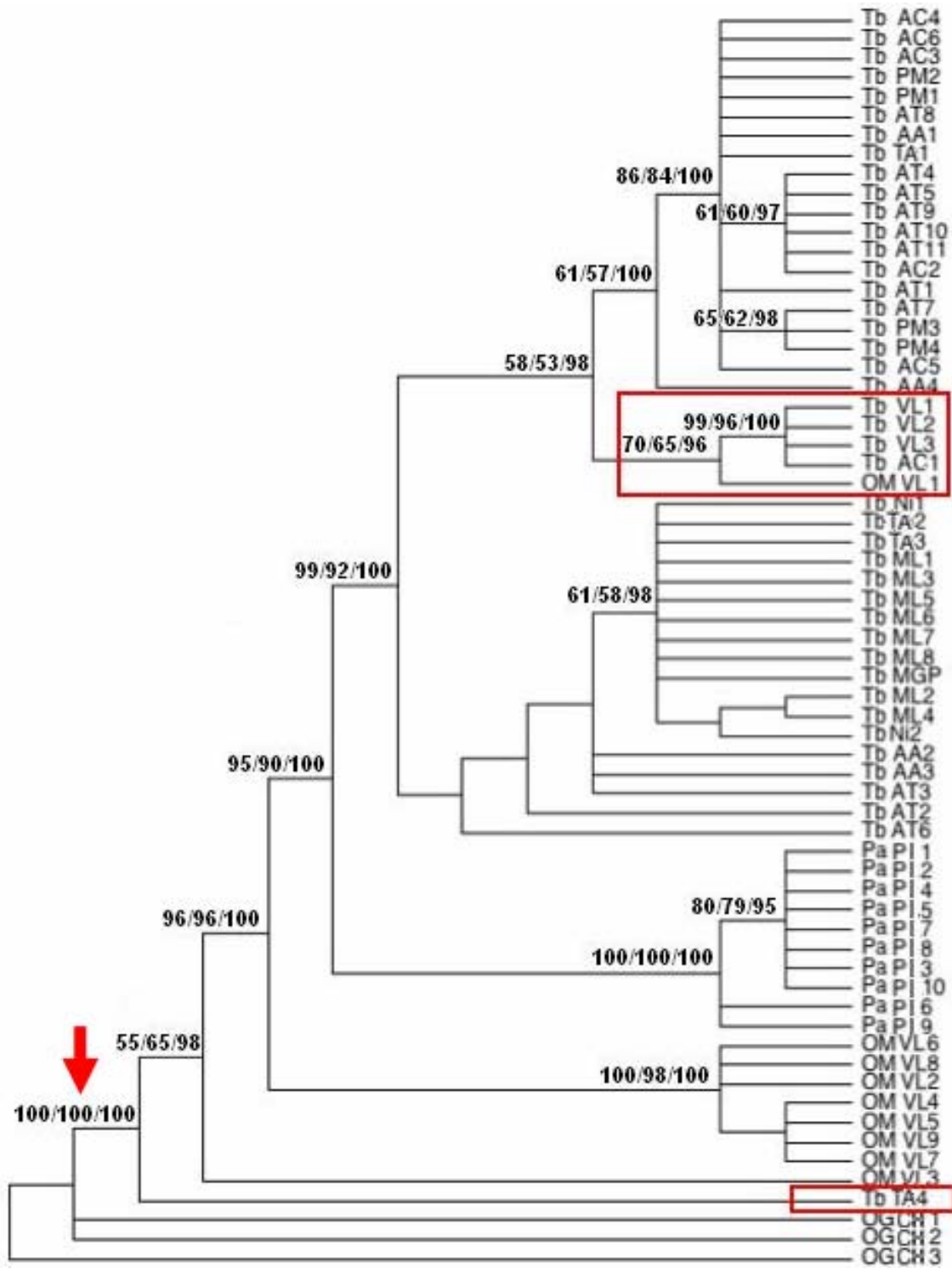


Figura 5.- Cladograma de consenso obtenido por Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana de un fragmento de 675 nucleótidos del gen citocromo b en *T. barrerae*, *P.aureus*, *O. Mimax* y *O.gliroides*. Los números sobre cada rama indican los porcentajes de bootstrap y probabilidad a posteriori de cada nodo. No se indican los valores para aquellos nodos con soporte inferior al 50%. Los casilleros en rojo destacan las secuencias que generan asociaciones parafiléticas. Las abreviaturas corresponden a TB = *T. barrerae*, PA = *P. aureus*, OM = *O. mimax* y OG = *O. gliroides*. Las localidades se abreviaron según se detalla en la Tabla 1: AA = Añelo-Añelo, AC = Añelo-Castillo, AT = Anelo-Agua de Tero, CH = Chusmisa, MGP = Malargüe-Guarda Parque, ML = Malargüe, NI = Nihuil, PI = Salar de Pipanaco, PM = La Pampa, TA= El Tapón y VL = Valle de la Luna.

El árbol de consenso estricto generado mediante los tres análisis filogenéticos muestra que las tres secuencias del citocromo b en *T. barrerae* del Valle de la Luna y una de *T. barrerae* perteneciente a Añelo-Castillo constituyen un clado, con alto soporte de *bootstrap* de 99% y separados por una sustitución nucleotídica (Figura 5). Adicionalmente, este grupo se encuentra conectado a un espécimen de *O. mimax* del Valle de la Luna (recuadro superior rojo), sustentado igualmente por un alto valor de *bootstrap* (70%). Encontrándose tan sólo siete sustituciones nucleotídicas de diferencia entre con las secuencias presentes en el caldo de *T. barrerae* y *O. mimax* pertenecientes al Valle de la Luna.

En la parte inferior del árbol (recuadro y flecha roja) se aprecia que una secuencia de *T. barrerae* del Tapón aparece junto al grupo haplotípico de *O. mimax*, apoyado por un 100% de sustento *bootstrap* en todos los análisis filogenéticos realizados, presentando 44 sustituciones nucleotídicas de diferencia entre su secuencia y las secuencias de los *O. mimax*. Este resultado refleja una estrecha relación de semejanza entre los haplotipos (Figura 5).

Cabe destacar que la divergencia en las secuencias del gen citocromo b en las tres especies en estudio (*T. barrerae*, *P. aureus* y *O. mimax*) a un nivel interespecífico, se presenta con altos valores de *bootstrap*, cercanos al 100%.

En los casilleros rojos se encierran las secuencias correspondientes a *O. mimax* y *T. barrerae* que producen dos eventos de parafilia en los clados del árbol filogenético de las especies en estudio como se muestra en la Figura 5. De este modo se obtienen 2 instancias de formación de la especie aloploidoides *T. barrerae*.

En una visión global, las relaciones intraespecíficas en *T. barrerae* aparecen mayoritariamente en politomías. Esto indica que no hay resolución de los datos, debido a que las secuencias son extremadamente similares.

#### **4.5.- Análisis de los haplotipos.**

De la amplificación y secuenciación del fragmento del gen citocromo b se obtuvieron 27 haplotipos en las cuatro especies analizadas (Tabla 3). Se encontraron seis haplotipos distintos en *O. mimax*, cinco en *P. aureus*, 15 en *T. barrerae* y un sólo haplotipo conformado por el grupo externo, *O. gliroides*.

La relación entre el número de haplotipos encontrados y el número de especímenes amplificados por población se muestra en la Tabla 4. De ésta se desprende que los individuos del Salar de Pipanaco y de Malargüe (en rojo), donde se amplificó la mayor cantidad de especímenes, se observó una baja variabilidad de haplotipos. Asimismo, en el Valle de la Luna (en negro), sólo se encontró un haplotipo el cual representa a los tres especímenes secuenciados provenientes de esa localidad.

Por el contrario, en las poblaciones de Nihuil, el Tapón y Añelo-Añelo (en azul) la mayoría de las secuencias amplificadas en *T. barrerae* se encuentran como haplotipos distinto dentro de la población mostrando una mayor variabilidad de haplotipos aún siendo pequeñas.

Debido a la rigurosidad y reproducibilidad que requieren las investigaciones científicas, la extracción de DNA, su amplificación y secuenciación se realizó en 3 oportunidades independientes en los casos en que se detecto parafilia. En estos ensayos repetidos se obtuvo el mismo resultado.

**Tabla 3.** Haplotipos identificados para el fragmento del gen citocromo b amplificado y secuenciado en las especies en estudio.

Especie	Haplotipo	Espécimen
<i>O. gliroides</i>	A	OG.CH 1, OG.CH 2 y OG.CH3
<i>O. mimax</i>	B	OM.VL1
	C	OM.VL2
	D	OM.VL3
	E	OM.VL4, OM. VL5 y OM.VL9
	F	OM.VL6 y OM.VL8
	G	OM.VL7
	<i>P. aureus</i>	H
I		PA.PI3
J		PA.PI6
K		PA.PI9
L		PA.PI10
<i>T. barrerae</i>	M	TB. ML 1, TB. ML 3, TB. ML 5, TB. ML 6, TB. ML 7, TB. ML8, TB. MGP, TB.NI 1, TB.TA 2 y TB.TA 3.
	N	TB.NI 2
	Ñ	TB.AA1, TB. AC3, TB. AC4, TB.AC6, TB.AT8, TB. PM1, TB. PM 2 y TB.TA 1.
	O	TB.TA4
	P	TB.AA2, TB.AA3 y TB.AT3
	Q	TB.AA4
	R	TB.AT1
	S	TB.AT2
	T	TB.AC2, TB.AT4, TB.AT5, TB.AT9, TB.AT10 y TB.AT11.
	U	TB.AT6
	V	TB.AT7, TB. PM3 y TB. PM4
	W	TB.VL1, TB.VL2 y TB.VL3
	X	TB.AC1
Y	TB. AC5	
Z	TB. ML2, TB. ML3 y TB. ML4	

**Tabla 4.** Relación entre el número de individuos y el número de haplotipos identificados por población para las secuencias del el fragmento del gen citocromo b en las especies analizadas.

Especie	Localidad	N° Individuos	N° Haplotipos
<i>O. gliroides</i>	Chusmisa	3	1
<i>O. mimax</i>	Valle de la Luna	9	6
<b><i>P. aureus</i></b>	<b>Salar Pipanaco</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b><i>T. barrerae</i></b>	<b>Valle de la Luna</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b><i>T. barrerae</i></b>	<b>Nihuil</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b><i>T. barrerae</i></b>	<b>El Tapón</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<b><i>T. barrerae</i></b>	<b>Añelo (Añelo)</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
<i>T. barrerae</i>	Añelo (A. de Tero)	11	7
<i>T. barrerae</i>	Añelo (Castillo)	6	4
<i>T. barrerae</i>	La Pampa	4	2
<b><i>T. barrerae</i></b>	<b>Malargüe</b>	<b>8</b>	<b>2</b>
<i>T. barrerae</i>	Malargüe (Guarda Parque)	1	1

La red de haplotipos mitocondriales que conecta a las especies *T. barrerae*, *P. aureus* y *O. mimax* se muestra en la Figura 6. En ella se puede observar una conexión entre los haplotipos de *T. barrerae* y los haplotipos de *O. mimax*, encasillados en cuadrados rojos.

En el casillero a se aprecia la conexión del haplotipo B de un *O. mimax* y el haplotipo W que corresponde al de los *T. barrerae* provenientes del Valle de la Luna; ambos separados del haplotipo Ñ por nueve y 10 pasos mutacionales, respectivamente. Este hallazgo es muy importante, debido a que es en esta localidad donde diploide y poliploide comparten área geográfica en común (simpatría).

En el casillero b se ubican dos haplotipos muy distantes (D y O). El haplotipo D pertenece a *T. barrerae* y el O a *O. mimax*. La distancia de separación por pasos mutacionales que conecta ambos haplotipos a la red con los haplotipos de *T. barrerae* requiere de 47 pasos mutacionales para llegar a un ancestro en común. Esta distancia es igual a la encontrada en la conexión entre los haplotipos de *T. barrerae* (azul) y los de *P. aureus* (morado).

La separación de los haplotipos C, E, F y G pertenecientes a *O. mimax* (color verde) comprende una distancia de 62 pasos mutacionales de conexión al haplotipo más cercano a los hallados en *T. barrerae*. En cambio los haplotipos en *P. aureus* se encuentran más próximos en la red, separados por una distancia de 47 pasos mutacionales de *T. barrerae*.



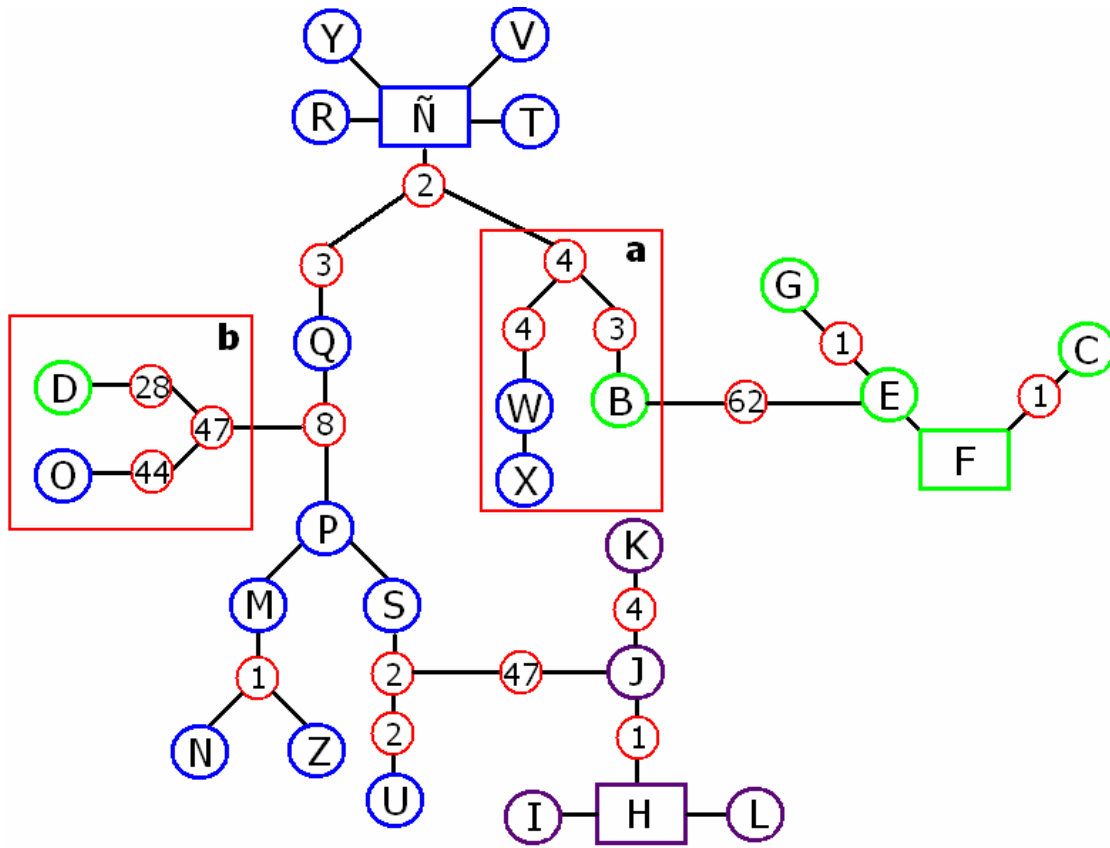


Figura 6.- Red de haplotipos del gen mitocondrial citocromo b de los octodóntidos *O. mimax*, *P. aureus* y *T. barrerae* creada mediante análisis de coalescencia (TCS 1.21; Clements y col., 2000). Los haplotipos observados están representados por círculos y cuadrados. De estos, los cuadrados encierran los haplotipos con mayor representación de especímenes. Los círculos rojos indican el número de pasos mutacionales que los separan. Los haplotipos de *T. barrerae* se representan de color azul, los de *P. aureus* en morado y los de *O. mimax* en verde. Las letras A, B, etc., representan los haplotipos identificados según Tabla 1. Los recuadros rojos a y b muestran las asociación de haplotipos que generan instancias de origen múltiple en *T. barrerae*.

## 5.- DISCUSIÓN

Inicialmente se creía que los poliploides tenían un origen único y que, por lo mismo, carecían de variabilidad genética. Dado que la variabilidad genética es la base para los cambios adaptativos que permiten a las poblaciones naturales existir en su medio ambiente, se suponía que esta falta de variabilidad era una gran barrera en el éxito de los poliploides. En otras palabras, el esquema clásico consideraba que los poliploides eran un saco evolutivo ciego, sin posibilidades de seguir evolucionando (Wagner, 1970). Además se postulaba que la poliploidía no desempeñaba un rol creativo a nivel macroevolutivo, debido a que los genes duplicados podrían diluir los efectos fenotípicos de nuevas mutaciones potencialmente benéficas (Stebbins, 1971).

Esta imagen cambió cuando el advenimiento de las técnicas moleculares permitió estudiar los genomas nucleares y citoplasmáticos. Con estos avances metodológicos fue posible escudriñar en las similitudes y diferencias que no son apreciables por comparación morfológica. Aunque la especiación por poliploidía ocurre en mucho menor grado en los animales, en contrapartida a lo que ocurre en las plantas, la poliploidía es considerada como un proceso significativo en la macroevolución de los animales (Ohno, 1970; Orr, 1990).

Las mitocondrias, al igual que los cloroplastos, son organelos semiautónomos que tienen una herencia matrilineal. Esto implica que su estudio equivale a trabajar con organismos haploides, dado que la contribución que se estudia es sólo la del progenitor materno. En los genes nucleares, en

cambio, los procesos de recombinación que ocurren en la profase meiótica 1 producen intercambios génicos entre los progenitores, por lo tanto, es muy difícil establecer si un determinado alelo se originó por la contribución materna o paterna. Los genes mitocondriales y cloroplásticos están libres de esta limitación y por lo tanto, son mejores marcadores para establecer relaciones genealógicas y evolutivas entre y dentro de las poblaciones (Awise y col., 1987; Rubinoff y Holland, 2005). Es importante recordar aquí que las mitocondrias de un macho son las que ha heredado de su madre y éstas, a su vez, son el reflejo de lo que heredó por descendencia de su abuela. Este tipo de herencia provee por lo tanto de una forma inequívoca para determinar los ancestros de organismos con genomas compuestos como en el caso de los alopoliploides. Al respecto, esta misma aproximación se ha usado en estudios en la soya (Doyle y col., 1990), el maíz (Gaut y Doebley, 1997) y el algodón (Cornn y col., 2002), entre otros, para determinar sus especies progenitoras. Estos estudios son especialmente relevantes en las plantas de importancia comercial porque el conocimiento de sus ancestros permite establecer programas de mejoramiento genético mediante cruzamientos dirigidos. Así se logran fijar ciertas características deseadas, presentes en las especies parentales o en otras, estrechamente relacionadas a ellas.

Entre los antecedentes que permiten sugerir origen múltiple se menciona la distribución geográfica que presentan los distintos haplotipos. Por ejemplo, el origen múltiple se puede presentar en pequeñas áreas geográficas de cercanía entre los descendientes poliploides y los diploides que los

originaron, y en cortos periodos de tiempo. Tal es el caso de *Tragopogon minus* y *T. micellus*, ambos poliploides que se han formado en 9 y 21 instancias, respectivamente. Estas instancias han ocurrido en una pequeña región del este de Washington durante los últimos 80 años (Soltis y col., 1995). Tres especies diferentes (*Tragopogon dubius*, *T. pratensis* y *T. porriifolius*) fueron introducidas accidentalmente desde Europa a principios del siglo pasado. Desde entonces, esas plantas, que se dan en campos abandonados, cunetas de carreteras y patios, han florecido en diferentes poblaciones. *T. pratensis* y *T. porriifolius* tienden a quedar restringidas a los estados de Washington e Idaho, mientras que *T. dubius* se ha extendido por la mayor parte del norte del país. El poliploide *T. mirus* se encuentra en buenas condiciones de conservación en un área de 25 x 75 km en el estado de Washington (Soltis and Soltis, 1991). En cuanto a *T. miscellus*, este tiene una amplia distribución. Se ha extendido sobre grandes partes de la zona oriental de Washington y occidental de Idaho, transformándose en una de las plantas más comunes del grupo en estos lugares (Soltis y col., 2004).

### **5.1.- Variación haplotípica mitocondrial y origen genético materno en *T. barrerae*.**

Un hallazgo interesante en el presente estudio tiene relación con el número de haplotipos encontrados versus el número de individuos por población en *T. barrerae* ("n"; Tabla 2). En las poblaciones con menor número de individuos analizados se encontró la mayor cantidad de haplotipos diferentes; en cambio, en las poblaciones con mayores números de individuos analizados, el número de haplotipos encontrados es bajo. Si se encuentran pocos haplotipos dentro de una población estamos en presencia de poblaciones formadas recientemente (Posada y Crandal, 2001). Por lo tanto, se puede inferir que el origen genético no está circunscrito a las zonas que habitan las poblaciones con baja diversidad haplotípica, sino más bien donde hay una gran diversidad de haplotipos. Así, los haplotipos de *T. barrerae* obtenidos en este estudio nos muestran que las poblaciones actuales del Nihuil, el Tapón y Añelo presentan la mayor diversidad de haplotipos en relación al número de especímenes analizados. Además, comparten haplotipos mitocondriales de diferentes ancestros, en contraposición a la población del Valle de la Luna, representada por un sólo haplotipo. Esto muestra que existe una gran variabilidad haplotípica a nivel interpoblacional en *T. barrerae*; que si se hubiese originado en forma única debería contener mayoritariamente los mismos haplotipos distribuidos dentro y entre las poblaciones, con una baja diversidad de los mismos (Kochert y col., 1996). En el caso de la población del

Valle de la Luna, la baja diversidad de haplotipos puede deberse al escaso número de especímenes amplificados para esa población.

La red de haplotipos nos muestra que existe una menor separación por pasos mutacionales entre *T. barrerae* y *P. aureus* (47 pasos mutacionales) que la separación entre *T. barrerae* y *O. mimax* (62 pasos mutacionales). Por lo tanto, estos datos sugieren que la especie más cercana en la línea materna de *T. barrerae* es *P. aureus*, y que esta especie actuó como el linaje progenitor materno. Estos resultados son consistentes con el modelo planteado por Gallardo y col. (2007). Sin embargo, un haplotipo de *O. mimax* (haplotipo B) se une al grupo de los *T. barrerae* por tan sólo 3 pasos mutacionales, como muestra el casillero a de la Figura 6. Además, el haplotipo D de *O. mimax* se conecta por 28 pasos mutacionales al haplotipo O presente en *T. barrerae*. Estos datos nos indican lo opuesto a lo ya expresado, de modo que tanto *P. aureus* como *O. mimax* podrían haber sido el linaje materno que formaría a *T. barrerae*. Esta situación se conoce como origen materno recíproco en los poliploides (Soltis y Soltis, 2001). De este modo, *P. aureus* habría hibridizado con sus ancestros diploides *O. mimax* pudiendo aportar tanto el constituyente materno como el paterno, como se desprende de la Figura 7. Resultados similares han sido encontrados en los poliplodes: *Polypodium vulgare*, *Platanthera huronensis* y en *Tragopogon micellus* (Haufler, Soltis y Soltis, 1995; Wallace, 2003; Soltis y col., 2004).

## ORIGEN MATERNO RECÍPROCO

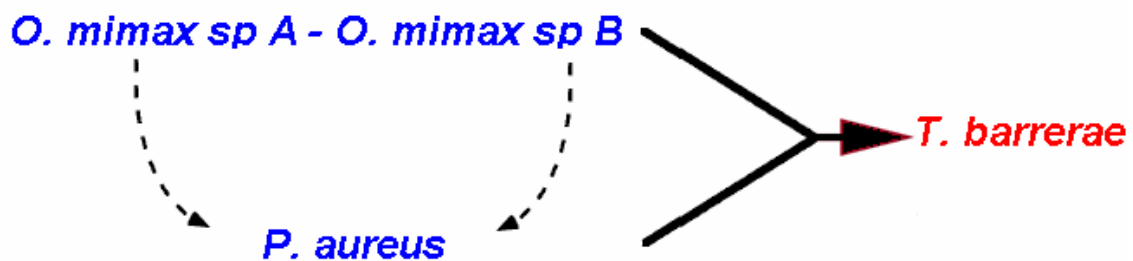


Figura 7.- Esquema del origen materno según DNA mitocondrial en *T. barrerae* a partir de la especie diploide *O. mimax* y tetraploide, *P. aureus*. La hibridación de dos especies de *O. mimax* genera a *P. aureus* la cual mediante retrocruza con sus parientes diploides genera a *T. barrerae*, pudiendo cualquiera de las dos especies parentales entregar la constitución materna de su genoma.

Para esclarecer el origen paterno, un dato clave que permitiría obtener mayores conclusiones la entregaría la secuenciación de genes o fragmentos génicos ligados al cromosoma Y. Estos marcadores reflejan el aporte genético netamente paterno, como es el caso del gen SRY. Este gen ha sido utilizado para tratar de esclarecer el origen paterno en macacos y bovinos (Tosi y col., 2000; Verkaar y col., 2004). Con la obtención de filogenias construídas en base al cromosoma Y se puede establecer claramente si el origen híbrido es de tipo recíproco, donde cualquiera de ambas especies implicadas pudieron haber entregado el constituyente de tipo materno/paterno (Tosi y col., 2000) ó una total predominancia de una especie por aportar uno de los dos constituyentes en forma mayoritaria (Soltis y Soltis., 1989). De este modo, se podría profundizar la investigación de la dinámica genética y molecular de las especies progenitoras de *T. barrerae*.

## **5.2.- Origen múltiple en *T. barrerae*.**

En *T. barrerae* los análisis filogenéticos generados a través de los diferentes algoritmos permiten inferir un origen múltiple, debido a la distribución parafilética en el árbol filogenético (Ptacek, 1994; Rauscher y col., 2004). Dichas parafilias ocurren porque las secuencias de *T. barrerae* provenientes del Valle de la Luna conforman un clado monofilético con una secuencia de su ancestro diploide *O. mimax* proveniente de la misma localidad (Figura 5).



En otro extremo del árbol, una secuencia de *T. barrerae* del Tapón se asocia con las secuencias de los *O. mimax* provenientes del Valle de la Luna.

Según las expectativas teóricas, se esperaba encontrar una asociación entre las secuencias de *T. barrerae* y de *O. mimax* provenientes del Valle de la Luna, ya que en este lugar ancestros y descendiente co-habitan la misma zona geográfica. En general, las zonas de simpatria pueden representar las regiones ancestrales de distribución de las especies. Por lo tanto, si el descendiente poliploide comparte un haplotipo muy similar al de su especie parental, la hipótesis más parsimoniosa para explicar este resultado es que el descendiente lo heredó de la especie diploide ancestral que participó en la hibridación (Ptacek, 1994; Soltis y col., 2004). Cabe destacar que Valle de la Luna es la única zona de simpatria (con *O. mimax*) que se conoce para *T. barrerae*, cuya distribución es mayoritariamente disjunta, localizada entre salares que están separados por kilómetros de desierto inhabitable (Díaz y col., 2000; Mares y col., 2000). Dada la distribución en parches de la especie, el Valle de la Luna provee un escenario ideal para suponer que el haplotipo compartido por las dos especies se debe a hibridización interespecífica. Los millones de años de divergencia que separan a ambos linajes dan cuenta de las diferencias nucleotídicas observadas. Además, tomando en cuenta la alta tasa de sustituciones que se pueden dar en los genes mitocondriales, es altamente improbable que ambas especies compartieran una misma secuencia por puro azar.

Al analizar el cladograma en la Figura 5 se evidencian politomias a nivel intra-específico dentro de la conformación de los clados en *T. barrerae*, lo cual nos indica una estrecha relación entre los miembros de las distintas poblaciones estudiadas, aún cuando la localidad de Añelo y el Tapón se encuentran separados por más de 800 kilómetros de distancia (ver Figura 3). De igual modo, analizando el clado formado por los *T. barrerae* provenientes del Valle de la Luna, éste no aparece como monofilético, sino que se incluye una secuencia proveniente de Añelo, la localidad más ancestral de recolección de los especímenes. Así podemos observar parafilia a nivel interpoblacional en *T. barrerae*. Este agrupamiento demuestra la cercanía entre los linajes mitocondriales maternos que dieron origen a estas poblaciones, ya que la distribución fragmentada de esta especie no permite suponer la hipótesis de flujo génico entre las poblaciones. Más bien esto puede deberse a que algunas poblaciones de *T. barrerae* migraron posterior a su formación o debido a que algunos de los ancestros maternos que generaron la especie lo hicieron en más de una instancia y en más de una localidad, pudiendo rastrear estos linajes en localidades tan distantes.

Considerando que el salar de Pipanaco y el Valle de la Luna son localidades cercanas en donde se encuentran los ancestros de la especie *T. barrerae*, y la simpatria entre *T. barrerae* y *O. mimax* del Valle de la Luna, se puede suponer que en un lugar aledaño al Valle de la Luna ocurrió uno de los procesos de hibridación que originó a *T. barrerae*. El otro evento ocurre por la parafilia que representa un haplotipo de *T. barrerae* proveniente del Tapón.

Esta localidad es la más cercana al Valle de la Luna, lo cual apoyaría la suposición de que *T. barrerae* se formó en el Valle de la Luna o una zona aledaña, por retrocruza de *O. mimax* y *P. aureaus* del Valle de la Luna.

### **5.3.- Implicaciones genéticas y evolutivas del origen múltiple en los poliploides.**

Considerando que la poliploidía es un mecanismo importante y efectivo en los procesos de especiación y diversificación, tanto de animales como vegetales, los análisis filogenéticos muestran una gran diversidad de haplotipos presentes en los poliploides estudiados. Estos estudios han demostrado que la mayoría de las especies estudiadas no se han originado mediante un origen único sino más bien múltiple y recurrente (Soltis y Soltis, 1993; Segraves y col., 1999; Sharbel y Mitchell-Olds, 2001; Tate y Simpon, 2003; Soltis y col., 2004). Encontrándose los mismos patrones de formación en organismos muy disímiles genéticamente. Así, los datos moleculares indican que el origen múltiple en los poliploides es una regla y no una excepción o particularidad evolutiva (Soltis y Soltis, 1993).

Dentro de las implicaciones genéticas presentes en el origen múltiple de los poliploides se contemplan:

a) La mayoría de los poliploides analizados no generan agrupaciones monofiléticas sino parafiléticas en los árboles mitocondriales o cloroplásticos. Esto implica múltiples instancias de origen desde sus progenitores diploides.

b) Existen procesos de hibridación interespecífica en los linajes haplotípicos presentes en las poblaciones. Como resultado se produce introgresión génica y aumento de la variabilidad genética en la especie resultante.

c) Se ve incrementado el acervo genético mediante hibridación, debido a la presencia de alelos distintos aportados por los diferentes progenitores, lo cual es útil para originar nuevas vías metabólicas o del desarrollo.

En relación al proceso de formación de *T. barrerae* surgen las siguientes inquietudes: ¿Cuál es la peculiaridad genómica del alopoliploide *P. aureus* que le permite retrocruzarse con su ancestro diploide *O. mimax* y generar a *T. barrerae*? A la inversa, ¿Cuál es la peculiaridad del género *Octomys* que se hibridiza para originar a *P. aureus*, y luego da origen a *T. barrerae*? ¿Cómo interactúan los componentes genéticos maternos y paternos dentro de las células de los diferentes linajes presentes en *T. barrerae*? ¿Existen poblaciones de *T. barrerae* con mayores propiedades adaptativas que otras? ¿Qué relación existiría entre el proceso de hibridación interespecífica y estas adaptaciones en las distintas poblaciones, respecto de los hábitat que ocupan?

## 6.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la secuenciación de un fragmento del gen citocromo b y su posterior análisis filogenético permiten concluir que el origen de la especie alotetraploide *Tympanoctomys barrerae* es múltiple, debido a la parafilia que se observa en el árbol filogenético construido con este marcador molecular. Además, los datos permiten inferir que por los menos existen dos instancias de origen múltiple en *T. barrerae*. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula que proponía su origen único.

Respecto del origen matrilineal, los datos moleculares reflejan un posible origen materno recíproco en *T. barrerae*, dado que no fue posible encontrar una marcada separación en la red de haplotipos que nos indicara la contribución exclusiva de una de las dos especies parentales (*P. aureus* o de *O. mimax*) sobre la otra en el aporte materno hacia *T. barrerae*.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- AGI. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography. The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise, J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E, Reeb C.A., and Saunders N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 489-522.
- Bapteste, F. and Brochier C. (2004). On the conceptual difficulties in rooting the tree of life. *Trends in Microbiol.*, 12: 9-13.
- Baumel, A., Ainouche M. L., Bayer R. J., Ainouche A. K. and Misset M. T.. (2002). Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 22: 303-314.
- Brown W., George M. and Wilson A. (1979). Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 76: 1967-1971.
- Clement, M, D. Posada, and K. A. Crandall. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9: 1657-1659.
- Contreras L.C., Torres-Mura J.C. and Spotorno A.E. (1990). The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent. *Experientia*, 46: 506-508.

- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Genet.*, 6: 836-846.
- Cornn, R., Small, R., Haselkorn, T. and Wendel, J. (2002). Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *Am. J. Bot.*, 89:707-725.
- Díaz, G. B., Ojeda R. A., Gallardo M.H. and Giannoni S.M. (2000). *Tympanoctomys barrerae*. *Mamm. Species*, 646:1-4
- Doyle, J. J., Doyle J. L., Brown A. and Grace J. (1990). Multiple origins of polyploids in the *Glycine tabacina* complex inferred from chloroplast DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 87: 714-717.
- Doyle, J. J., Doyle J. L., Rauscher J.T., and Brown A.H.D. (2003). Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*). *New Phytol.*, 161: 121-132.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fuertes-Aguilar J., and Nieto-Feliner G.. (2003). Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28:430-447.
- Gallardo, M.H., Bickham J. W., Honeycutt R. L., Ojeda R. A., and Köhler N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, 401: 341.
- Gallardo, M.H., Kausel G., Jiménez A., Bacquet C., González C., Figueroa J., and Ojeda R. (2004). Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). *Biol. J. Linnean Soc.*, 82: 443-451.

- Gallardo, M.H., Ojeda R., González C. and Ríos C. (2007). The Octodontidae Revisited en: *The Quintessential Naturalist: Honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. University of California Press.
- Gaut B.S., Doebley J.F. (1997) DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 94: 6809-6814.
- Grant, H. (1981). *Plant speciation*. Columbia University Press, New York.
- Guc-Scekic M., Milasin J., Stevanovic M., Stojanov L. J., and Djordjevic M. (2002). Tetraploidy in a 26-month-old girl (cytogenetic and molecular studies). *Clin. Genet.*, 61: 62-65.
- Haufler, C., Soltis, D. and Soltis P. (1995). Phylogeny of the *Polypodium vulgare* Complex: Insights from chloroplast DNA restriction site data. *Syst. Bot.*, 20: 110-119.
- Hedrén, M. (2003). Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae). *Mol. Ecol.*, 12: 2669-2680.
- Holloway, A., Cannatella, D., Gerhardt, H.C., and Hillis, D.H. (2006). Polyploids with different origins and ancestors from a single sexual polyploid species. *Am. Nat.*, 167:88-101.
- Honeycutt, R.L., Rowe, D.L. and Gallardo, M.H.. (2003). Molecular systematics of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family Octodontidae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 476-489.



- Huelsenbeck J.P., and Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Irwin, D., Kocher, T., and Wilson A. (1991) Evolution of cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.
- Jousselin E., van Noort S. and Greeff J. (2004). Labile male morphology and intraspecific male polymorphism in the *Philotrypesis* fig wasps. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 3: 706-718.
- Kochert G., Stalker H.T., Gimenes M., Galgaro L., Lopes C.R., and Moore K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence of the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *Am. J. Bot.*, 83:1282-1291.
- Lafer, C.Z, and Neu R. L. (1998). A liveborn infant with tetraploidy. *Am. J. Med. Genet.*, 31: 375-378.
- Lara, M., Patton J. and da Silva M. (1996). The simultaneous diversification of echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome b sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5:403-413.
- Lawton, A., Rauh R., Robichaux H. and Purugganan M. D.. (2003). Patterns of nucleotide variation in homologous regulatory genes in the allotetraploid Hawaiian silversword alliance (Asteraceae). *Mol. Ecol.*, 12: 1301-1313.
- Mable, B. K. (2004). Why polyploidy is rarer in animals than plants: myths and mechanisms. *Biol. J. Linnean Soc.*, 82: 453-366.

- Mabuchi K., Senou H., Susuki T., and Nishida M. (2005). Discovery of an ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of koi. *J. Fish Biol.*, 66: 1516-1528.
- Mares, M. , Braun, J., Barquez, R. y Diaz M. (2000). Two new genera and species of halophytic desert mammals from isolated salt flats in Argentina. *Occas. Papers, Museum of Texas Tech Univ.*, 203:1-27.
- Masterson, J. (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in the majority of angiosperms. *Science* 264: 421- 424.
- Matthee, C. and Robinson T. (1999). Mitochondrial DNA population structure of roan and sable antelope: implications for the translocation and conservation of the species. *Mol. Ecol.* 8:227-238.
- Meyer, A. (1994). Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 278-280.
- Miwasu, M. A. and Suzuki H. (2002). Evolutionary networks of maternal and paternal gene lineages in voles (*Eothenomys*) endemic to Japan. *J. Mamm.*, 83: 856-865.
- Niebuhr, E. (1974). Triploidy in man. *Human Genetik*, 21: 103-125.
- Ohno S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, New York.
- Otto, S. P. and Whitton J. (2000). Polyploid incidence in evolution. *Ann. Rev. Genet.*, 34: 401-437.
- Orr, H.A . (1990). "Why polyploidy is rarer in animals than in plants" revisited, *Am. Nat.*, 136: 759-770.

- Patton, J.L., dos Reis S.F. and da Silva M.N.F. (1996). Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene. *J. Mamm. Evol.*, 3:3-29.
- Philippe H. and Forterre P. (1999). The rooting of the universal tree of life is not reliable. *J. Mol. Evol.*, 49: 509-523.
- Ptacek M., Gerhardt H. and Sage R. (1994). Speciation by polyploidy in treefrogs: multiple origins of the tetraploid, *Hyla versicolor*. *Evolution*, 48: 898-908.
- Riesenberg, L. H. and Noyes R. D.. (1998). Genetic map-based studies of reticulate evolution in plants. *Trends Plant Sci.*, 3: 254-259.
- Ritz, C. M., Schmutz H. and Wissemann V. (2005). Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*. *J. Hered.*, 96: 4-14.
- Rohland, N., Pollack, J., Nagel, D., Beauval, C., Airvaux, J., Pääbo, S., and Hofreiter, M. (2005). The population history of extant and extinct hyenas. *Mol. Biol. Evol.*, 22: 2435-2443.
- Rubinoff, D. and Holland, B. (2005). Between two extremes: Mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetics and taxonomic inference. *Syst. Biol.*, 54: 952-961.
- Sall, T., Jakobsson, Lind-Halldén C. and Halldén C. (2003). Chloroplast DNA indicates a single origin of the allotetraploid *Arabidopsis suecica*. *J. Evol. Biol.* 16: 1019-1029.

- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Segraves, K. A., Thomson J. N., Soltis P. S., and Soltis D. E. (1999). Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossularifolia*. *Mol. Ecol.*, 8: 253-262.
- Sharbel, T.F. and Mitchell-Olds T. (2001). Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboelli* complex (Brassicaceae). *Heredity*, 87: 59-68.
- Smedmark, J. E., Eriksson T., and Bremer B. (2005). Allopolyploid evolution in Geinae (Colurieae : Rosaceae) - building reticulate species trees from bifurcating gene trees. *Org. Divers. Evol.*, 5: 275-283.
- Smith, M. F., and Patton J. L. (1993). The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol. J. Linnean Soc.*, 50: 149-177.
- Soltis D.E., and Soltis P.S. (1989). Allopolyploid speciation in *Tragopogon*: insights from chloroplast DNA. *Am. J. Bot.* 76: 1119–1124.
- Soltis, P. and Soltis, D. (1991). Multiple origins of the allotetraploid *Tragopogon mirus* (Compositae): rDNA evidence. *Syst. Bot.*, 16: 407–413.
- Soltis D.E., and Soltis P.S. (1995). The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 92: 8089-8091.
- Soltis, D. E, and Soltis P.S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 348-352.

- Soltis P.S., and Soltis D.E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 97: 7051-7057.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Tate, J.A. (2003). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytol.*, 161: 173-191.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Pires J.C., Kovarik A., Tate J., and Mavrodiev E. (2004). Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae) cytogenetic, genomic and genetic comparison. *Biol. J. Linnean Soc.*, 82: 485-501.
- Song, K., Tang L.P., and Osborn T.C. (1995). Rapid genome changes in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 92: 7719-7723.
- Stebbins, G. L. (1971). Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold Publishers, London.
- Stock, M., Steinlein C., Lamatsch D. K., Schartl M., and Schmidt M. (2005). Multiple origins of tetraploid taxa in the Eurasian *Bufo viridis* subgroup. *Genetica*, 124: 255-272.
- Swofford, D. (2001). PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony\* and other methods), 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tate, J.A. and Simpson B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.*, 28: 723-737.

- Templeton, A. R., Routman E., and Phillips C. A. (1995). Separating population structure from population story: a cladistic analysis of geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140. 767-784.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24:4876-4882.
- Tosi, A. J., Morales J. C., and Melnick D. J. (2000). Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Molec. Phylogenet. Evo.*, 17: 133-144.
- Tsigenopoulos, C. S., Ráb P., Naran D., and Berrebi P. (2002). Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. *Heredity*, 88: 466-473.
- Verkaar E.L., Vervaecke H., Roden C., Romero-Mendoza L., Barwegen M., Susilawati T., Nijman I.J., and Lenstra J.A. (2003). Paternally inherited markers in bovine hybrid population. *Heredity*, 91: 565-569.
- Vision T.J., Brown D.G., and Tanksley S.D. (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science*, 290: 2114-2117.
- Wagner, W. (1970). Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon*, 19:146-51.
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 42: 225-249.

- Widmer, A. and Baltisberger, M. (1999). Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 86:1282-1289.
- Wallace L. (2003). Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *Int. J. Plant Sci.*, 164: 907–916.
- Wlasiuk, G., Garza J.C. and Lessa E.P. (2003). Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution*, 57: 913-926.
- Wolfe, K.H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Rev. Genet.*, 2: 333-341.
- Zwickl, D. J., (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. Dissertation, The University of Texas at Austin.