

Seminario de Investigación para optar al título Licenciado Ciencias Básicas con  
orientación en Biología

Estructura genética de *Phyllotis  
xanthopygus* (Rodentia: Cricetidae) a lo  
largo de un gradiente altitudinal en  
ambientes áridos en los Andes centrales,  
Mendoza.

Alumna: Andrea Carolina Martinez

Directora: Agustina A. Ojeda

Codirectora: Dra. Paola Sassi

Lugar de trabajo: Grupo de Investigaciones de la Biodiversidad,

IADIZA, CCT-Mendoza

Año: 2019

## RESUMEN

La estructura genética se refiere al modo en que se distribuye la variación genética en una población o entre poblaciones y da cuenta del grado de similitud genética entre éstas. La estructura genética de una población puede verse afectada por factores geográficos, ecológicos o comportamentales. En general, se espera que las poblaciones caracterizadas por un alto flujo génico y apareamiento aleatorio estén mucho menos estructuradas que aquellas en las que se mantienen las condiciones inversas. En el presente trabajo nos proponemos examinar la estructura genética de *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia: Cricetidae) a lo largo de un gradiente altitudinal en los Andes Centrales, con el fin de comprender la distribución de la variabilidad genética en esta especie y los procesos que la determinan. Hipotetizamos que las poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo del gradiente altitudinal, presentan distintos niveles de variabilidad genética, producto de eventos de diferenciación relativamente recientes y reflejan un patrón de aislamiento por distancia. A lo largo de una transecta altitudinal, se estudiaron 29 individuos de *P. xanthopygus* pertenecientes a tres poblaciones a 1700, 2300 y 3100 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.); mediante el empleo de un marcador nuclear y un marcador mitocondrial. Para ambos marcadores, se estimaron los niveles de diversidad genética, el grado de estructuración genética y la historia demográfica.

Las poblaciones de *P. xanthopygus* mostraron diferentes niveles de diversidad genética a lo largo del rango geográfico analizado en este estudio. Con el marcador mitocondrial, encontramos diferenciación genética entre las poblaciones y un patrón de aislamiento por distancia. Con el marcador nuclear, las poblaciones de *P. xanthopygus* no presentaron diferenciación genética ni estructura genética poblacional. Los análisis demográficos sugieren un escenario de inestabilidad demográfica y de expansión poblacional reciente en algunas de las poblaciones estudiadas.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ÍNDICE .....	2
INTRODUCCION .....	3
Patrones de estructuración genética en roedores .....	6
Objetivo:.....	7
Hipótesis y predicciones.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	8
Sitios de Muestreo .....	10
Captura y preservación del material colectado.....	11
Análisis moleculares.....	12
Análisis estadísticos de las secuencias .....	15
RESULTADOS.....	20
Diversidad genética intra e interpoblacional basado en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial. ....	20
Estructura de la población y flujo genético .....	22
Historia demográfica.....	23
Diversidad genética intra e interpoblacional basado en el análisis de un segmento de $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear. ....	25
Estructura de la población y flujo genético .....	26
Historia demográfica.....	28
DISCUSIÓN.....	30
Conclusiones y perspectivas futuras:.....	35
AGRADECIMIENTOS: .....	38
BIBLIOGRAFIA: .....	39

## INTRODUCCION

La materia prima del cambio evolutivo es la variabilidad genética, mientras que la unidad de cambio es la población (Ascunce, 2002). Así, las unidades fundamentales para estudiar la variación genética son las poblaciones, es decir, grupos de organismos de la misma especie que habitan dentro de un área geográfica suficientemente restringida, como para que cualquier miembro pueda, potencialmente, aparearse con cualquier otro (Templeton, 2006).

La estructura geográfica de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero interrelacionadas: la estructura demográfica y la estructura genética. La primera está determinada por todos los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de apareamiento y la historia de vida (Roderick, 1996). La segunda resulta de una combinación de procesos poblacionales y moleculares que operan dentro de un contexto espacial y temporal (Guillot y Orlando, 2013) y se refiere al modo en que se distribuye la variación genética en una población o entre poblaciones y puede verse afectada por factores geográficos, ecológicos o comportamentales, como heterogeneidad ambiental, fragmentación de hábitat, aislamiento por distancia, fluctuaciones en la densidad poblacional y variación en los patrones de dispersión (Vázquez-Domínguez et al., 2009).

Cuando hablamos de una especie con alta estructura genética, nos referimos a que se pueden detectar diferencias genéticas entre las poblaciones (Figura 1b). En contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen presentan nulas o muy pocas diferencias en su composición genética (Figura 1a). El conocimiento de la estructura genética de una población es un requisito previo para la comprensión de la evolución de las especies, ya que ayuda a evaluar hasta qué punto cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente y diferenciada (Figura 2a) o permanece vinculada a través del flujo génico (Figura 2b) (Eguiarte et al, 2010). En general, se espera que las poblaciones caracterizadas por un alto flujo génico y apareamiento aleatorio estén mucho menos estructuradas que aquellas en las que se mantienen las condiciones inversas (Patton y Feder 1981).

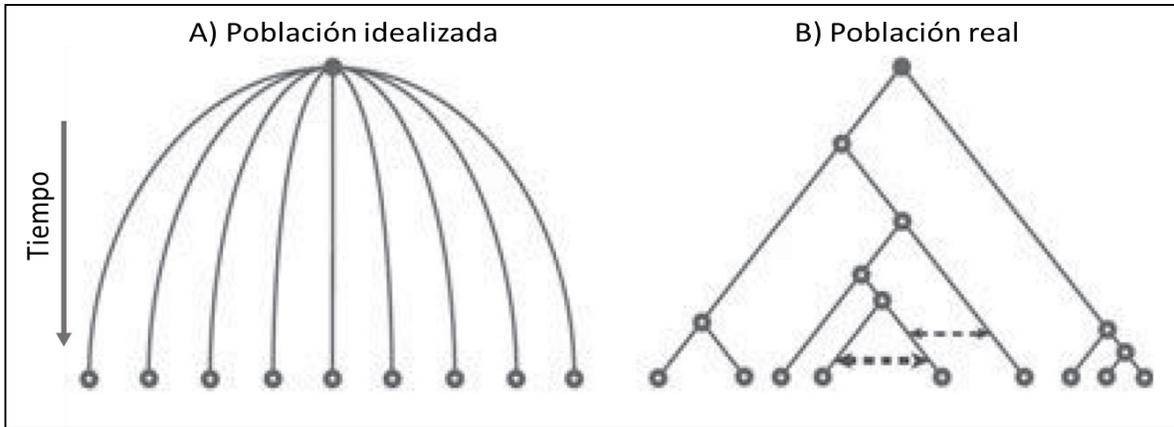


Figura 1: Ejemplos de estructura genética de poblaciones. a) Un modelo idealizado de estructura de población, en la que las subpoblaciones evolucionan independientemente después de la división de la población original. b) Un modelo realista de estructura poblacional en el que algunas subpoblaciones están más estrechamente relacionadas que otras por intercambio genético. El intercambio parcial de genes ocurre entre algunas subpoblaciones (Líneas discontinuas con flechas) (Nei, 2013).

El flujo génico es definido como la suma de mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra (Whorley et al, 2004). Los estudios de flujo génico adquieren relevancia para la interpretación y comprensión de los patrones microevolutivos y la estructura genética de las poblaciones ya que funciona como una fuerza evolutiva cohesiva, produciendo un efecto homogeneizador de la variabilidad genética (Figura 2b) (Planter, 2007).

Por otro lado, definimos "deriva génica" como cambios en las frecuencias génicas por acontecimientos al azar, lo que da como resultado cambios en el acervo génico entre generaciones sucesivas de una población (Slatkin, 1993). La deriva génica es una fuerza evolutiva no direccionada e impredecible que se encuentra en todas las poblaciones y puede alterar la composición genética de una población a través del tiempo.

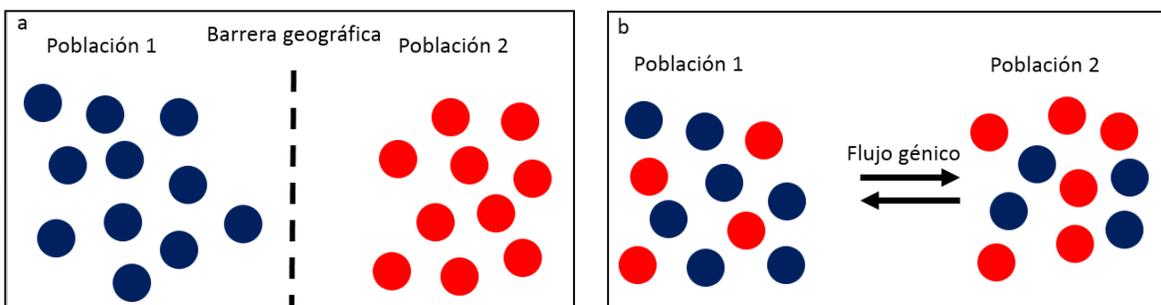


Figura 2: a) El aislamiento geográfico detiene el flujo génico entre subpoblaciones. Eventualmente, una población geográficamente aislada se volvería genéticamente muy diferente b) Los miembros de diferentes poblaciones migran e intercambian genes. Cuanto mayor es el flujo génico, más similar es el pool génico de las dos subpoblaciones. Modificado de <https://socratic.org/questions/how-does-geographic-isolation-contribute-to-evolution>.

En las poblaciones naturales, los efectos del flujo génico sobre la variabilidad dentro y entre poblaciones son opuestos a los efectos de la deriva génica (Templeton, 2006). El flujo génico es considerado uno de los factores fundamentales para mantener elevados niveles de diversidad genética intrapoblacionales al contrario de la deriva génica que, debido a la pérdida o fijación de alelos, reduce la variabilidad genética dentro de las poblaciones (Piñero et al., 2008). Por otro lado, entre poblaciones, el flujo génico tiende a reducir la variabilidad genética, mientras que la deriva génica tiende a incrementarla, debido a la divergencia en las frecuencias alélicas (Templeton, 2006). Para alelos neutrales, cuando el flujo génico se interrumpe, la deriva génica es una fuerza mucho más efectiva para producir diferenciación genética entre las poblaciones (Slatkin y Barton, 1989).

Además, las características biológicas de las especies (sistema de apareamiento, capacidad de dispersión, tamaño efectivo de la población), la fragmentación del hábitat, tanto actuales como históricos, y la disposición espacial de las poblaciones, determina la velocidad a la que se pierde o se repone variación genética a través de la deriva génica y el flujo génico respectivamente (Eckert et al., 2008; Wlasiuk et al., 2003). La predicción general de que las poblaciones geográficamente periféricas deberían exhibir una menor diversidad y una mayor diferenciación genética que las poblaciones del centro, se basa en el “Modelo del centro abundante” (Eckert et al. 2008). Bajo este modelo, se espera que las poblaciones periféricas presenten un menor tamaño efectivo de la población y un mayor aislamiento espacial permitiendo la erosión de la diversidad genética y aumentando la diferenciación genética entre poblaciones, a través de la deriva génica y la reducción del flujo génico (Vucetich y Waite, 2003).

Por otro lado, los cambios históricos, climáticos y geológicos pueden influir en la diversidad y diferenciación genética de las poblaciones a través de cambios en el tamaño de la población y/o las tasas de flujo génico históricos y contemporáneos (Vucetich y Waite 2003). El uso de múltiples marcadores moleculares, puede revelar cómo los cambios en los tamaños poblacionales o la presencia de barreras al flujo génico han influido, histórica y contemporáneamente, en la estructura genética de las poblaciones. Los marcadores nucleares y mitocondriales presentan propiedades moleculares contrastantes que permiten describir de manera complementaria la estructura genética de las poblaciones (Wang, 2010).

## Patrones de estructuración genética en roedores

En muchas poblaciones de roedores se han reportado altos niveles de diferenciación genética y una marcada estructura genética en distancias geográficas cortas. Esta estructura se ha relacionado al menos en parte, con tamaño poblacionales pequeños y limitaciones en la dispersión debido a sistemas sociales, dispersión sesgada por el sexo, sistemas de cría altamente estructurados, barreras geográficas y/o vagilidad reducida (Aars et al., 1998; Brouat et al., 2007; Chesser, 1983; Mapelli et al., 2012; Munger et al., 1983). Sin embargo, también se han reportado estudios en los cuales no se ha evidenciado un patrón de aislamiento por distancia, ni estructuración poblacional (Chiappero et al., 2011; Dobson, 1994; Whorley et al., 2004). Esto puede deberse a múltiples factores: uno de ellos podría ser que una eventual reducción en el tamaño de la población no sea lo suficientemente importante como para que la deriva génica cause divergencia entre las poblaciones (Chiappero et al., 2011), otro factor podría ser que las poblaciones presenten tamaños poblacionales pequeños pero altas tasas de flujo génico en distancias cortas (Dobson, 1994) o que la escala geográfica de estudio exceda en gran medida las distancias de dispersión de los individuos de la especie considerada. De esta manera, aun cuando encontremos que las poblaciones no están en equilibrio entre flujo génico y deriva génica en una escala geográfica regional, podremos detectar que las poblaciones situadas geográficamente cerca, pueden seguir un patrón de aislamiento por distancia (Chiappero et al., 2011).

Los roedores conforman buenos modelos de estudio para poner a prueba hipótesis relacionadas a la distribución de la variabilidad genética bajo un modelo de aislamiento por distancia (Lessa, 1990). En particular, la mayoría de los roedores exhiben una alta dependencia al tipo de hábitat, lo que permite una vista más detallada de los factores que afectan los patrones de variación genética (Fedorov et al., 2008). Asimismo, presentan fluctuaciones periódicas en el tamaño de la población que pueden reducir la cantidad de diversidad genética en las poblaciones. Además, su habilidad relativamente limitada de dispersión restringe el flujo génico manteniendo las señales de divergencia genética de eventos históricos (Munger et al. 1983).

## Objetivo:

El objetivo de este trabajo es examinar la diversidad genética y la estructura genética de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal en los Andes Centrales, mediante el análisis de genes mitocondriales y nucleares. Para este fin, se evaluarán 3 poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal (1.700, 2.400 y 3.100 msnm); donde cada uno de los sitios serán tratados como unidades poblacionales independientes.

## Hipótesis y predicciones

H1- Las poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal presentan distintos niveles de diversidad genética.

- P: La población del centro del gradiente presentará mayor diversidad genética en comparación con las poblaciones de los extremos altitudinales (superior e inferior).

H2- Las poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal presentan un patrón de aislamiento por distancia.

- P: Las poblaciones más cercanas presentarán mayor flujo génico entre sí y, por lo tanto, serán más similares genéticamente que poblaciones más distantes.

H3- En función de la escala geográfica de este estudio, las eventuales diferencias genéticas entre poblaciones serían producto de eventos de diferenciación relativamente recientes.

- P: La variación genética nuclear será mayor que la variación genética mitocondrial entre poblaciones de *P. xanthopygus*, indicando eventos de diferenciación relativamente recientes.

## MATERIALES Y METODOS

### *Phyllotis xanthopygus* como modelo de estudio

Los roedores sigmodontinos constituyen uno de los grupos de mamíferos neotropicales más diversos y ampliamente distribuidos. Dentro de la familia Cricetidae (Subfamilia Sigmodontinae), el género *Phyllotis* incluye alrededor de 13 especies y su rango geográfico se extiende desde Ecuador hasta el sur de Argentina. Al igual que muchos grupos de roedores, se sabe que los filotinos tienen fluctuaciones en el tamaño poblacional y su abundancia aparentemente está limitada por la disponibilidad de alimento (Pearson 1975).

En particular *P. xanthopygus* (Waterhouse, 1837) (Figura 3), también llamado pericote patagónico, es un roedor endémico de Sudamérica, tiene una amplia distribución en Perú, Bolivia, Chile y Argentina, se encuentra en y a lo largo de los Andes desde el sur de Perú hasta la Patagonia (15 ° S a 51 ° S) (Figura 4). Se distribuye en un extenso gradiente altitudinal desde los Andes centrales (5600 m) hasta el nivel del mar (Steppan et al., 2007). Los ejemplares adultos de *P. xanthopygus* presentan una longitud de 121 mm total desde la punta de la nariz hasta la base de la cola y un peso corporal promedio de 55 g (Jones et al., 2009). Tiene una alta capacidad de dispersión, lo que se apoya en observaciones de campo por la presencia de poblaciones pequeñas pero genéticamente diversas que ocupan parches pequeños y aislados (Kramer y Birney, 2001). Sus hábitats incluyen ambientes rocosos con escasa vegetación, y también “islas rocosas” aisladas entre pastizales y matorrales. Kim et al. 1998, ha reportado que los parches de hábitat, adecuado para esta especie, son de tamaños variables (<1 km<sup>2</sup> a docenas de km<sup>2</sup>) y que el grado de aislamiento geográfico entre parches va desde 100 m hasta los 10 km. Además, se ha caracterizado a *P. xanthopygus*, cuyo complemento cromosómico es 2n = 38 (Labaroni et al., 2014), como una especie que presenta profundas divergencias moleculares y una importante estructuración genética desde el punto de vista latitudinal (Albright, 2005; Riverón, 2011).

En particular, para el gradiente altitudinal analizado en el presente estudio, se ha reportado que *P. xanthopygus* se encuentra distribuido solo entre los 1.700 m y 3.100 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Figura 4) y su abundancia es mayor en las zonas de elevación intermedia (2.300 m.s.n.m.) (Novillo y Ojeda, 2014).



Figura 3: Individuo adulto de *Phyllotis xanthopygus*. Fotografías Sassi P.

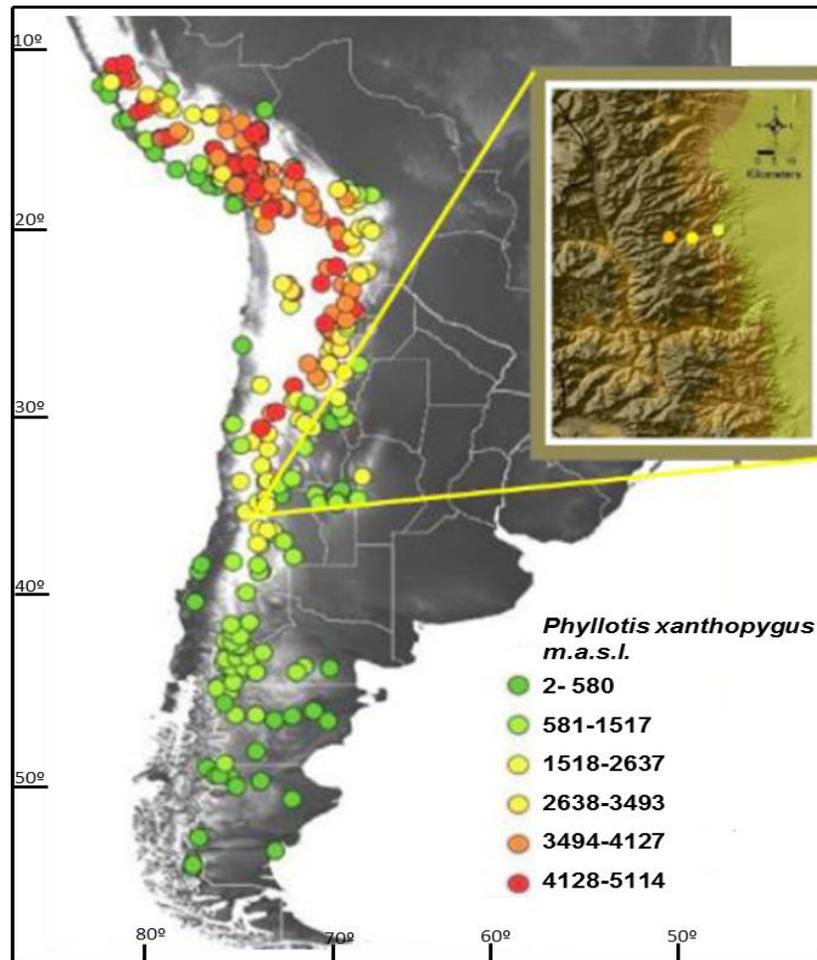


Figura 4: Distribución geográfica de *Phyllotis xanthopygus* y ubicación de las 3 poblaciones a 1700, 2300 y 3100 m.s.n.m (33°36'48,4"S -69°28'42,7"O) en la zona de estudio en los Andes centrales de Argentina, Provincia de Mendoza.

## Sitios de Muestreo

El estudio se realizó dentro de dos áreas protegidas colindantes: la Reserva Provincial del Manzano Histórico y Reserva Manzano Portillo de Piuquenes, localizadas en el departamento de Tunuyán, Mendoza. Entre diciembre de 2012 y febrero de 2014 establecimos sitios de muestreo a lo largo de una transecta altitudinal a 1700 ( $33^{\circ} 35'35.8''S$ ,  $69^{\circ} 24'15.6''O$ ), 2300 ( $33^{\circ} 36'48.4''S$ ,  $69^{\circ} 28'42.7''O$ ) y 3100 ( $33^{\circ} 36'37.9''S$ ,  $69^{\circ} 32'14.5''O$ ) (m. s.n.m.)(Figura 5). Los sitios se encuentran alineados de Este a Oeste separados por distancias comprendidas entre 5 y 12 Km, abarcando cambios graduales en el paisaje (Figura 6). De acuerdo con Méndez (2011), estos sitios pertenecen a diferentes provincias fitogeográficas, donde los sitios a 1700 y 2300 m.s.n.m. corresponden a la provincia Andina, mientras que el sitio a 3100 m.s.n.m. se encuentra dentro de la región Altoandina.



Figura 5: Mapa indicando las localidades analizadas. (Ver tabla 1 para ubicación geográfica exacta).



Figura 6: Paisaje predominante en cada uno de los sitios de muestreo donde se capturaron los ejemplares de *Phyllotis xantophygus*. a) Parche de hábitat a 1700 m.s.n.m. b) Parche de hábitat a 2.300 m.s.n.m.; c) Parche de hábitat a 3.100 m.s.n.m.

En el sitio a 1.700 m.s.n.m. y de 2.300 m.s.n.m. predomina vegetación tipo arbustivas, de matorral o herbáceas, encontrándose comunidades de *Eupatorium buniifolium*, *Stipa tenuissima* y *Colliguaja integerrima*, mientras que a los 2.300 m.s.n.m. se encuentran mayormente comunidades de *Junellia scoparia*, *Junellia juniperina* y *Adesmia horrida*. Asimismo, en el sitio de 3.100 m predominan las estepas gramíneas y arbustales achaparrados, encontrándose comunidades de *Berberis empetrifolia* y *Azorella monantha* (Méndez, 2011). En cuanto al clima, se trata de una zona semiárida con temperatura media anual que ronda los 15°C y precipitación media anual de 303 mm (www.climatedata.org). La zona muestra una marcada estacionalidad, con lluvias concentradas en el verano y temperaturas que pueden alcanzar los 30°C mientras que durante el invierno se registran temperaturas bajo cero y las precipitaciones principalmente ocurren en forma de nieve. Particularmente para nuestros sitios de muestreo, los datos de temperatura tomados durante 2 años por dataloggers (Extech®USB Temperature Dataloggers, rango -40 a 70°C, resolución 0,1°C, precisión ± 1,0°C (-10 a 40°C)) muestran un marcado descenso de la temperatura media anual hacia mayores elevaciones: 14,91 ± 6,83 °C (1700 m), 11,15 ± 5,65 °C (2300 m) y 7,40 ± 5,6 °C (3100 m) (Sassi y Novillo, 2015).

Tabla 1: Altura, ubicación geográfica y número de individuos (N), capturados en cada una de las poblaciones estudiadas.

<b>Población</b>	<b>Altura (msnm)</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>N</b>
<b>Población baja</b>	1700	33 ° 35'35.8"S, 69 ° 24'15.6"O	9
<b>Población media</b>	2300	33 ° 36'48.4"S, 69 ° 28'42.7"O	10
<b>Población alta</b>	3100	33 ° 36'37.9"S, 69 ° 32'14.5 "O	10

## Captura y preservación del material colectado

En cada campaña durante 3 noches consecutivas, se colocaron 20 trampas de captura viva tipo Sherman distribuidas en 3 transectas, sumando un total de 60 trampas por sitio de muestreo (a 1700, 2300 y 3100 m s.n.m.). A lo largo de 2 años se realizaron dos campañas anuales en época estival, hasta completar el número de ejemplares. Se capturaron entre 9 y 10 individuos de *P. xanthopygus* por cada sitio, obteniendo un total de 29 individuos. Luego, se procedió a la preservación de tejidos de músculo de oreja en alcohol (96%) para los análisis genéticos. La Colección Mastozoológica del IADIZA (CMI) CCT- CONICET-Mendoza alberga ejemplares (individuos) y muestras de oreja colectado de los tres sitios.

## Análisis moleculares

### Extracción y amplificación de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de muestras de tejido de oreja siguiendo el protocolo *salting out* y los procedimientos estándar propuestos por Sambrook et al. (1989).

Para el total de 29 individuos se amplificaron, por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la región control del genoma mitocondrial (*RCmit*) y el Intrón 7 de  $\beta$ -Fibrinógeno como gen nuclear ( $\beta$ -*FBG*). Las reacciones de amplificación para ambos genes se realizaron a un volumen total de 50  $\mu$ l compuesto por: 5  $\mu$ l de 10X PCR buffer, 1,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50mM, 2  $\mu$ l de dNTP's 10mM, 2  $\mu$ l de primer Reverse, 2  $\mu$ l de primer Forward, 35,5  $\mu$ l de  $H_2O$ , 2  $\mu$ l de templado ADN y 0,25  $\mu$ l Taq polimerasa.

Para la amplificación del fragmento de región control se utilizó el siguiente par de primers: (F1GRA:5'TACCCCAGCACCCAAAGCTG3'; R1GRA:5'TGGCGGGTTGTTGGTTTCAC3'), bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94° C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94° C (30 s), 55° C (45 seg), 72° C (1min) y extensión final a 72° C (7 min).

Para la amplificación del fragmento de  $\beta$ -FBG se utilizó el siguiente par de primers: (Fgb-17U-Rattus: 5'GGGGAGAACAGAACCATGACCATCCAC3'; Fgb-17L-Rattus: 5'ACCCCAGTAFTATCTGCC ATTCGGATT3'), bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94° C por 5 min, seguido por 33 ciclos de 94° C (1 min), 58° C (1 min), 72° C (1min) y extensión final a 72° C (7 min).

Los productos obtenidos de la amplificación se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 8 y Figura 9). El fragmento obtenido de las amplificaciones fue de aproximadamente 388pb para el gen mitocondrial y de 428 pb para el gen nuclear. Los productos de la amplificación se purificaron con el kit *PCR purification* BIONEER. Posteriormente, ambos genes fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos de la unidad genómica Inta Castelar de la provincia de Buenos Aires. La secuenciación se realizó en un equipo 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### *Análisis de la región control de genoma mitocondrial:*

El ADN mitocondrial (ADNmt) de vertebrados (Figura 7) es una molécula circular, relativamente pequeña de alrededor de 16-20 kb de largo. Se encuentra formada por 37 genes que incluyen: 22 ARNs de transferencia (tARNs), 2 ARNs ribosomales (rARNs) y 13 ARNs mensajeros

(mARNs) que codifican para proteínas involucradas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, procesos que tienen lugar en la membrana mitocondrial (Jobling et al., 2004). La única región no codificante del ADNmt, es la región control o D-loop. Esta pequeña región de aproximadamente 1 kb de largo, se encuentra involucrada en procesos de regulación y en el proceso de iniciación y de la transcripción del ADNmt (Jobling et al., 2004; Page y Holmes, 1998).

Esta región es la más utilizada en estudios de vertebrados dado que presenta una tasa de sustitución de nucleótidos alta y un grado importante de polimorfismo intraespecífico, constituyendo una herramienta ideal para estudios enfocados en patrones de variación genética a nivel intraespecífico. Para el caso de mamíferos, el largo de esta región varía aproximadamente entre 880 a 1400 pb (Sbisà et al., 1997).

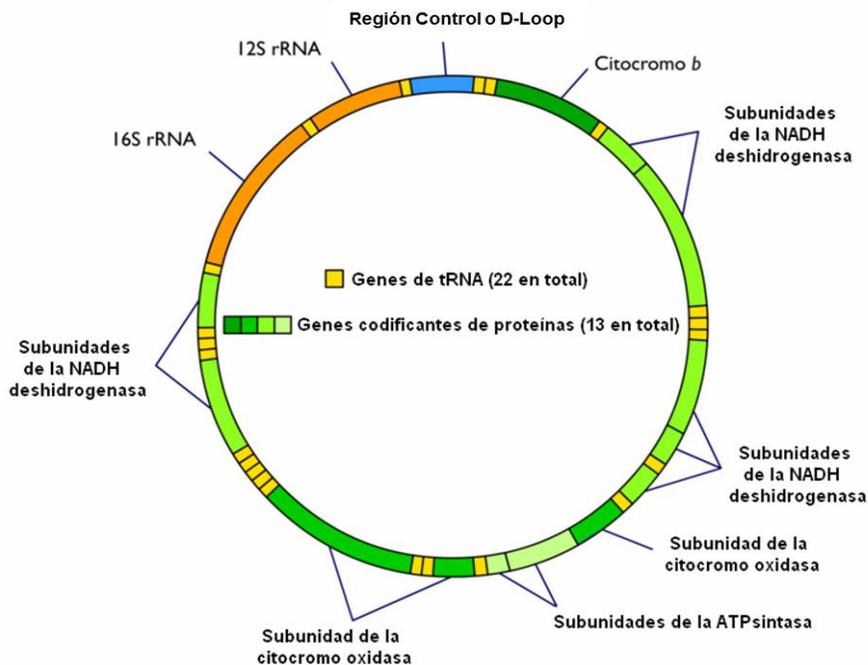


Figura 7: Esquema general del genoma mitocondrial de vertebrados.

*Análisis del Intro 7 de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear:*

El Fibrinógeno, un precursor de la Fibrina, es una proteína soluble involucrada en la coagulación de la sangre que se encuentra en todos los vertebrados y ha sido caracterizada en numerosos mamíferos. En el genoma de vertebrados existe una copia única de cada gen para los tres pares de subunidades homólogas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que forman el Fibrinógeno (Chung y Davie, 1984; Prychitko y Moore, 2003).

El análisis del séptimo Intrón de  $\beta$ -Fibrinógeno ha resultado útil para numerosos estudios filogenéticos, se conoce como gen codificante no proteico y se ha utilizado para análisis filogenéticos por debajo del nivel de familia (Astuti, 2004). Se ha considerado ampliamente que los intrones del genoma nuclear evolucionan de una manera “neutral” y más lentamente que el ADN mitocondrial pero más rápidamente que las secuencias de exón nuclear (Wickliffe, 2003).

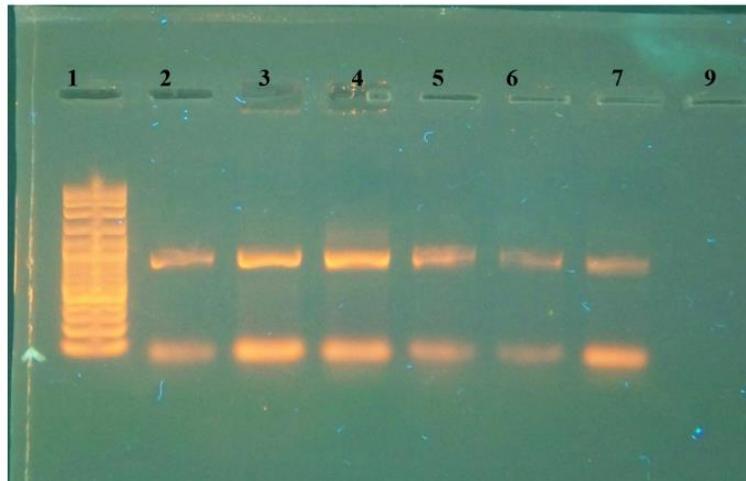


Figura 8: Gel de Agarosa al 1%. Productos obtenidos de amplificaciones de  $\beta$ -FBG de *Phyllotis xanthopygus*.

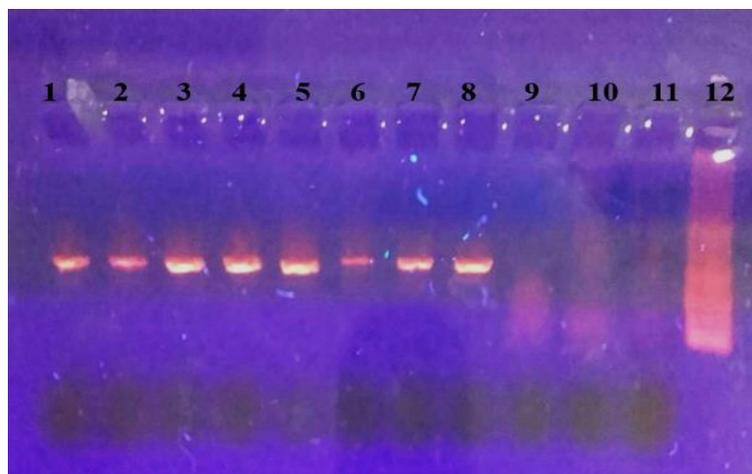


Figura 9: Purificaciones de productos de PCR de  $\beta$ -FBG de *Phyllotis xanthopygus*.

### Edición y alineamiento de secuencias

Se analizaron 388 pb de la región control del ADNmt y 428 pb del gen nuclear  $\beta$ -Fibrinógeno. Las secuencias se editaron utilizando el programa ProSeq 3.5 (Filatov, 2009) y se alinearon mediante el programa Clustal X (Thompson et al., 2003) (Figura 10). En ambos programas se mantuvieron por



medio de divergencia nucleotídica entre los individuos presentes en la población. La diversidad haplotípica ( $h$ ) es un parámetro que indica la probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar de una población sean diferentes. Estos índices se calcularon en el programa DnaSP 6.11.01 (Rozas et al., 2017).

La distancia genética, medida como el número de sustituciones nucleotídicas que ocurren entre dos secuencias, haplotipos, individuos o taxa, es un estimador cuantitativo de cuán divergentes son genéticamente (Avice, 2000). Se calculó la misma entre cada par de poblaciones utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura dos parámetros (K2P) que considera una tasa diferencial de transiciones (más frecuentes) y transversiones (menos frecuentes) (Kimura, 1980), en el programa Arlequin 3.5.1 (Excoffier y Lischer, 2010).

## Estructura de la población y flujo genético

### *Flujo génico y aislamiento por distancia*

Existen dos clases de métodos para estimar cuánto flujo génico ocurre en las poblaciones naturales (Slatkin, 1987). Los métodos directos usan estimaciones de distancias de dispersión y del éxito reproductivo de los dispersores para inferir cuánto flujo génico está ocurriendo en el momento en que se realizan las observaciones (Slatkin y Barton 1989). Los métodos indirectos estiman el nivel promedio de flujo génico a partir de un modelo matemático que incluye el flujo génico y otras fuerzas (e.g. mutación, deriva génica, selección) con el fin de predecir cuánto flujo génico debe haber ocurrido para que los datos den lugar a los patrones observados (Slatkin, 1987).

La mayoría de los modelos teóricos de flujo génico surgen de los conceptos desarrollados por Sewall Wright y suponen que los individuos forman poblaciones discretas, denominadas demes (colección de individuos de la misma especie que viven lo suficientemente cerca como para compartir un sistema de apareamiento; Templeton 2006) que intercambian migrantes entre ellos con igual probabilidad a una tasa constante. El modelo se puede caracterizar con sólo dos parámetros: tamaño poblacional  $N$  y tasa de migración  $m$  y se basa en el estadístico  $F_{ST}$  de Wright que mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por lo tanto, la diferenciación genética entre ellas (Slatkin, 1987). El estadístico puede calcularse como:

$$F_{ST} = \frac{1}{(2Nm + 1)} \text{ para genoma haploide}$$

$$F_{ST} = \frac{1}{(4Nm + 1)} \text{ para genomas diploides}$$

El índice  $F_{ST}$  es una medida de diferenciación de poblaciones en cuanto a su estructura genética. Mide la cantidad de varianza que puede ser explicada por la estructura poblacional y por tanto, puede ser interpretado como una medida de similitud de los individuos de una misma población, comparados con la población total. Los valores oscilan entre 0 y 1, indicando 0 una completa panmixia, donde los individuos se cruzan libremente y 1 ausencia de flujo génico.

A partir de  $F_{ST}$  puede obtenerse una estimación indirecta de  $Nm$ :

$$Nm \approx \frac{1}{2} (1/ F_{ST} - 1) \text{ para organismo haploide}$$

$$Nm \approx \frac{1}{4} (1/ F_{ST} - 1) \text{ para organismos diploides}$$

De esta manera, si  $Nm$  es muy pequeño ( $Nm < 1$ ) indica que la deriva génica es importante, si  $Nm > 1$  el flujo génico es el proceso evolutivo determinante (Slatkin, 1987).

Un modelo utilizado en el análisis de la relación entre la dispersión y la estructura genética es el del aislamiento por distancia (Figura 11). Este modelo, para loci neutrales, predice que poblaciones más cercanas geográficamente presentarán mayor flujo génico y, por lo tanto, la similitud genética entre poblaciones disminuirá en tanto se incrementen las distancias geográficas (Crow y Kimura 1970; Slatkin 1993).

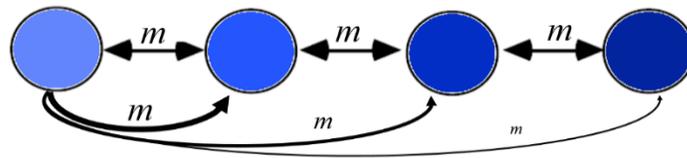


Figura 11: Modelos de aislamiento por distancia. La tasa de flujo génico es función de la distancia geográfica entre poblaciones. “m” representa tasa de migración. Modificado de Eguiarte et al. 2010.

En este trabajo, la estimación del flujo génico se basó en el estadístico  $F_{ST}$  (Wright, 1943) y a partir de este, se obtuvo una estimación indirecta de  $Nm$  (número migrantes), lo cual se realizó en el programa DNAsp 6.11.01 (Rozas et al., 2017). Se realizaron 100 permutaciones con un nivel de significación  $p < 0,05$  (Excoffier y Lischer, 2010). Para examinar la existencia de un patrón de aislamiento por distancia se estimó la relación entre la distancia geográfica (medida en el programa Google Earth) y la tasa de migración entre pares de poblaciones (Slatkin, 1993).

Por último, para evaluar la posible correlación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica se realizó el Test de Mantel (Wright 1943). Este test proporciona la significancia estadística de la correlación entre la matriz de  $Nm$  entre pares de poblaciones y la distancia

geográfica y determina si existe una relación lineal significativa entre el flujo génico y la distancia geográfica entre poblaciones. El análisis se realizó en XLSTAT (Fahmy, 2013).

#### *Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)*

El análisis de la varianza molecular AMOVA permite examinar los componentes de la variación genética y la estructura de la población (Excoffier et al., 1992). Se fundamenta en que la información de la variación nucleotídica entre haplotipos puede ser dividida, de manera jerárquica en: a) diferencias entre los haplotipos dentro de una población; b) diferencias entre los haplotipos de diferentes poblaciones dentro de un grupo; y c) diferencias entre los haplotipos de diferentes grupos. Partiendo de la hipótesis nula de ausencia de estructura genética poblacional, proporciona el porcentaje y significación de variabilidad explicado por cada uno de estos niveles jerárquicos (Excoffier et al. 1992).

Para determinar cómo se encuentra repartida la diversidad genética en distintos niveles jerárquicos (entre y dentro poblaciones), se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 1000 repeticiones para las pruebas de significancia e intervalo de confianza al 95 %, en el programa Arlequin 3.5.1 (Excoffier y Lischer, 2010).

#### Historia demográfica

Se examinó la historia demográfica de *P. xanthopygus* por población y en total, con base en la distribución de diferencias nucleotídicas apareadas (distribución *mismatch*) (Slatkin y Hudson 1991) y el modelo de neutralidad. Este análisis permite saber si las poblaciones de una especie han experimentado una expansión poblacional reciente o se han mantenido estables. Las poblaciones que han sufrido expansión poblacional se espera que exhiban una distribución suave, unimodal y bajo valor de “raggedness”, mientras que las poblaciones que se han mantenido estables o han sufrido cuellos de botella, se espera que exhiban una distribución más errática, multimodal y valores más altos de “raggedness” (Harpending, 1994). Además, se calcularon los estadísticos  $R_2$  y suma de desviaciones cuadradas (SSD) (Macías et al., 2017; Ramos-Onsins y Rozas, 2002) los cuales permiten testear si las distribuciones se ajustan significativamente a lo esperado para una población en expansión. Los test mencionados se realizaron en el programa Arlequin 3.5.1 (Excoffier y Lischer, 2010) y DnaSP 6.11.01 (Rozas et al., 2017).

El modelo de neutralidad tiene como hipótesis nula que la variación molecular es el resultado de un balance entre las mutaciones neutrales o al azar y la extinción de mutaciones por deriva génica, manteniendo las frecuencias génicas en equilibrio (Kimura, 1991). Para buscar desviaciones en este modelo se utilizaron los estadísticos  $D$  (Tajima, 1989) y  $F_s$  (Fu, 1997). Los valores negativos de estos estadísticos son esperados en poblaciones que han experimentado una expansión poblacional relativamente reciente o efecto de selección purificadora. Los valores positivos indican procesos de selección balanceadora o reducción del tamaño poblacional (Tajima 1989). El nivel de significancia estadística de estas estimaciones se evaluó con 1000 repeticiones (con simulación coalescente) en el programa DnaSP 6.11.01 (Rozas et al., 2017).

## RESULTADOS

Diversidad genética intra e interpoblacional basado en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial.

Se obtuvo un fragmento de 388 pb de región control de ADNmt para un total de 29 individuos. Se encontraron 23 sitios polimórficos (número total de mutaciones=25) de los cuales 14 resultaron parsimoniosamente informativos lo que implica que hay al menos dos estados de caracteres diferentes en cada uno de los sitios, y cada uno de esos estados se produce en al menos dos de las secuencias. Los sitios variables se identificaron en base a las sustituciones nucleotídicas y no hubo inserciones o deleciones. Se identificaron catorce haplotipos. La diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) fueron de 0,901 y 0,00933 respectivamente, indicando una alta diversidad haplotípica y una diversidad nucleotídica baja entre todos los individuos analizados (Tabla 2).

Tabla 2: Índices de diversidad molecular total y de cada poblaciones estudiada de *Phyllotis xanthopygus*, basados en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial. Abreviaturas: Tamaño de la muestra (N), número de sitios polimórficos (S), Sitios Parsimoniosamente Informativos (S. P. I.), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad de haplotipos ( $h$ )

Diversidad génica intrapoblacional							
Población	N	S	S. P. I.	$\pi \pm \sigma$	Nº de haplotipos	$h \pm \sigma$	Haplotipos
Baja	9	4	2	0,00401± 0,00076	4	0,750 ±0,112	H4 H6 H12 H14
Media	10	15	6	0,01100± 0,00216	8	0,956 ±0,059	H1 H2 H3 H4 H6 H11 H12 H13
Alta	10	16	6	0,01151± 0,00244	7	0,933 ±0,062	H1 H4 H5 H7 H8 H9 H10
Total	29	23	14	0,00933± 0,00151	14	0,901 ±0,036	

Las poblaciones media y alta presentaron mayor número de sitios polimórficos (S) que la baja. Asimismo, la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue más alta en la población media (0,011) y alta (0,011) en comparación con la población baja (0,004).

La diversidad haplotípica ( $h$ ) fue alta en todas las poblaciones (mayor a 0,5), presentándose un valores cercanos a 1 en las poblaciones media y alta (Tabla 2). El haplotipo H4 es compartido por las 3 poblaciones y es el que se encuentra con mayor frecuencia (7 individuos). Mientras que dos de ellos (H6, H12) fueron compartidos por la población baja y media, y solo uno (H1) es compartido por la población media y alta. El haplotipo H6, se encuentra presente en 6 individuos restringidos solo a

las poblaciones baja y media. De los 14 haplotipos, se encontraron 10 haplotipos únicos, uno perteneciente a la población baja, 4 pertenecientes a la población media y 5 pertenecientes a la población alta (Tabla 3).

Tabla 3: Frecuencia absoluta de haplotipos en total y para cada una de las poblaciones estudiadas de *Phyllotis xanthopygus*, basados en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial.

Haplotipo	Baja	Media	Alta	Total
H1	0	1	1	2
H2	0	1	0	1
H3	0	1	0	1
H4	3	2	2	7
H5	0	0	2	2
H6	4	2	0	6
H7	0	0	2	2
H8	0	0	1	1
H9	0	0	1	1
H10	0	0	1	1
H11	0	1	0	1
H12	1	1	0	2
H13	0	1	0	1
H14	1	0	0	1

Tabla 4: Distancia Genética (D), Flujo Génico (Nm) calculado a partir de  $F_{ST}$  y distancia geográfica para cada par de poblaciones de *Phyllotis xanthopygus*, basados en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial.

Pares de Poblaciones	D (%)	$F_{ST}$	Nm	Distancia geográfica (Km)
Baja-Media	0,03	0,033	14,56	7,23
Media-Alta	0,03	0,025	19,26	5,47
Baja-Alta	0,09	0,10	4,52	12,42

Las distancias genéticas (D) para la región control muestran valores bajos. Así, entre las poblaciones baja-media y las poblaciones alta-media se encontraron distancias genéticas similares y presentan un valor de 0,03%. La mayor distancia genética se presentó entre la población alta y baja, cuyo valor fue de 0,09% (Tabla 4).

## Estructura de la población y flujo genético

### Flujo génico y aislamiento por distancia

El estimador  $F_{ST}$  global presentó un valor bajo de  $F_{ST} = 0,05$  y una tasa de migración alta  $Nm = 9,41$ . Los valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones presentaron valores bajos que oscilan en 0,025 y 0,1. La estimación de  $Nm$ , a partir de  $F_{ST}$  arrojó en todos los casos valores altos (Tabla 4).

Si bien los valores de  $F_{ST}$  fueron bajos, existe un patrón de aislamiento por distancia evidente al comparar el  $\log Nm$  (calculado a partir del  $F_{ST}$ ) vs. el  $\log$  de distancias geográficas entre las poblaciones (Figura 12). La presencia de un patrón de aislamiento por distancia fue confirmada por el test de Mantel, el cual muestra que hay una correlación negativa significativa entre las comparaciones pareadas del  $\log Nm$  (basado en  $F_{ST}$ ) y el  $\log$  de distancias geográficas ( $r = -0,99$ ;  $p = 0,0001$ ). Dicha correlación entre la distancia geográfica y  $Nm$  indican que cuanto mayor es la distancia geográfica entre poblaciones, menor es el valor de  $Nm$  (flujo génico) por lo que mayor es la diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

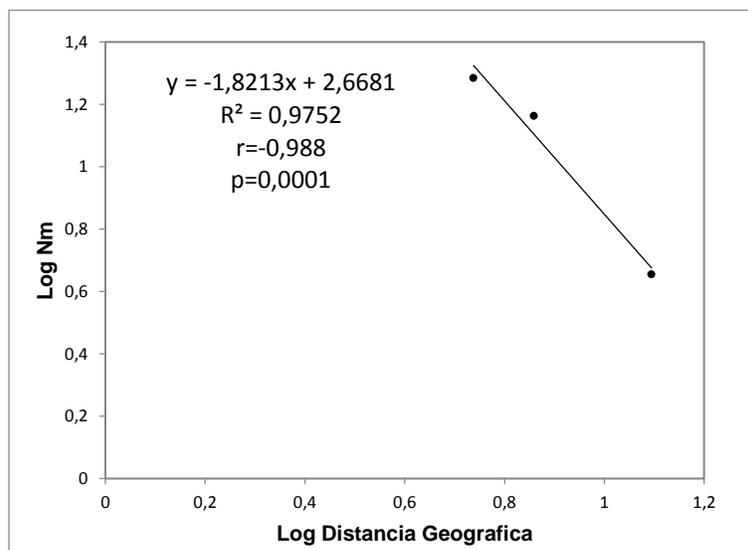


Figura 12: Gráfico que muestra la relación entre la distancia geográfica y el flujo génico ( $Nm$ ) entre pares de poblaciones *Phyllotys xanthopygus*, basado en  $F_{ST}$ , basado en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial ( $r = -0,988$ ;  $p = 0,0001$ ).

### Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado mostró que la mayor parte de la varianza se da dentro de las poblaciones (97,9%) mientras que solo el 2,69% se da entre poblaciones. Asimismo, el índice  $F_{ST}$  resultó bajo y no significativo (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis jerárquico de la varianza molecular basado en el análisis de un segmento de región control del genoma mitocondrial para tres poblaciones de *Phyllotis xanthopygus*. El nivel de significancia (P) del componente de la varianza fue testeado mediante permutaciones siguiendo a Excoffier et al., (1992).

<b>Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)</b>			
<b>Fuente de Variación</b>	<b>% de Variación</b>	<b>Índice de Fijación</b>	<b>P</b>
Entre Grupos	-	-	-
Entre poblaciones dentro de grupos	2,69	0,03	0,19
Dentro de poblaciones	97,31	-	-

## Historia demográfica

Para la muestra total, esto es, tomando en cuenta todas las poblaciones como una sola, las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu presentaron valores negativos pero no significativos ( $D = -1,54638$ ,  $p > 0.10$ ;  $F_s = -1,48$ ,  $p > 0.10$ ); para cada una de las poblaciones estos tests tampoco resultaron significativos. De la misma manera, el test  $R_2$  y SSD resultaron no significativos en todos los casos y fallan en rechazar la hipótesis nula de expansión poblacional (Tabla 6) (Rogers, 1995).

Para la muestra total el análisis de distribuciones pareadas o “*mismatch distribution*” sugiere una historia demográfica estable, reflejando una distribución multimodal y un promedio alto en el número de diferencias pareadas ( $k = 3,62$ ). Por otro lado, los resultados del análisis de “*mismatch distribution*” para cada una de las poblaciones sugieren una historia de expansión poblacional para la población baja, reflejado en una distribución unimodal y un bajo número de diferencias pareadas ( $K_{\text{Pob.baja}} = 1,50$ ) y una historia demográfica estable para la población media y la población alta, reflejado en una distribución bimodal suave y con un alto número de diferencias pareadas ( $K_{\text{Pob.media}} = 4,26$ ;  $K_{\text{Pob.alta}} = 4,26$ ) (Figura 13).

Tabla 6: Pruebas estadísticas de la distribución *mismatch* e índices de neutralidad de tres poblaciones de *Phyllotis xanthopygus*, basadas en un segmento de 388 pb del gen mitocondrial de Región Control: tamaño de la población (N), estadístico D (Tajima 1989), estadístico FS (Fu, 1997), Raggedness statistic (rg) (Rogers y Harpending, 1992), suma de desviaciones cuadradas (SSD) (Schneider y Excoffier, 1999) y estadístico R2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Nivel de significancia estadística: \*  $p \leq 0,05$  (significativo).

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>F<sub>s</sub></b>	<b>K</b>	<b>rg</b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>SSD</b>
<b>Baja</b>	9	0,23	-0,16	1,50	0,07	0,17	0,02
<b>Media</b>	10	-0,90	-0,93	4,26	0,05	0,12	0,01
<b>Alta</b>	10	-0,97	-1,04	4,46	0,05	0,14	0,02
<b>Total</b>	29	-1,55	-1,48	3,62	0,04	0,08	0,02

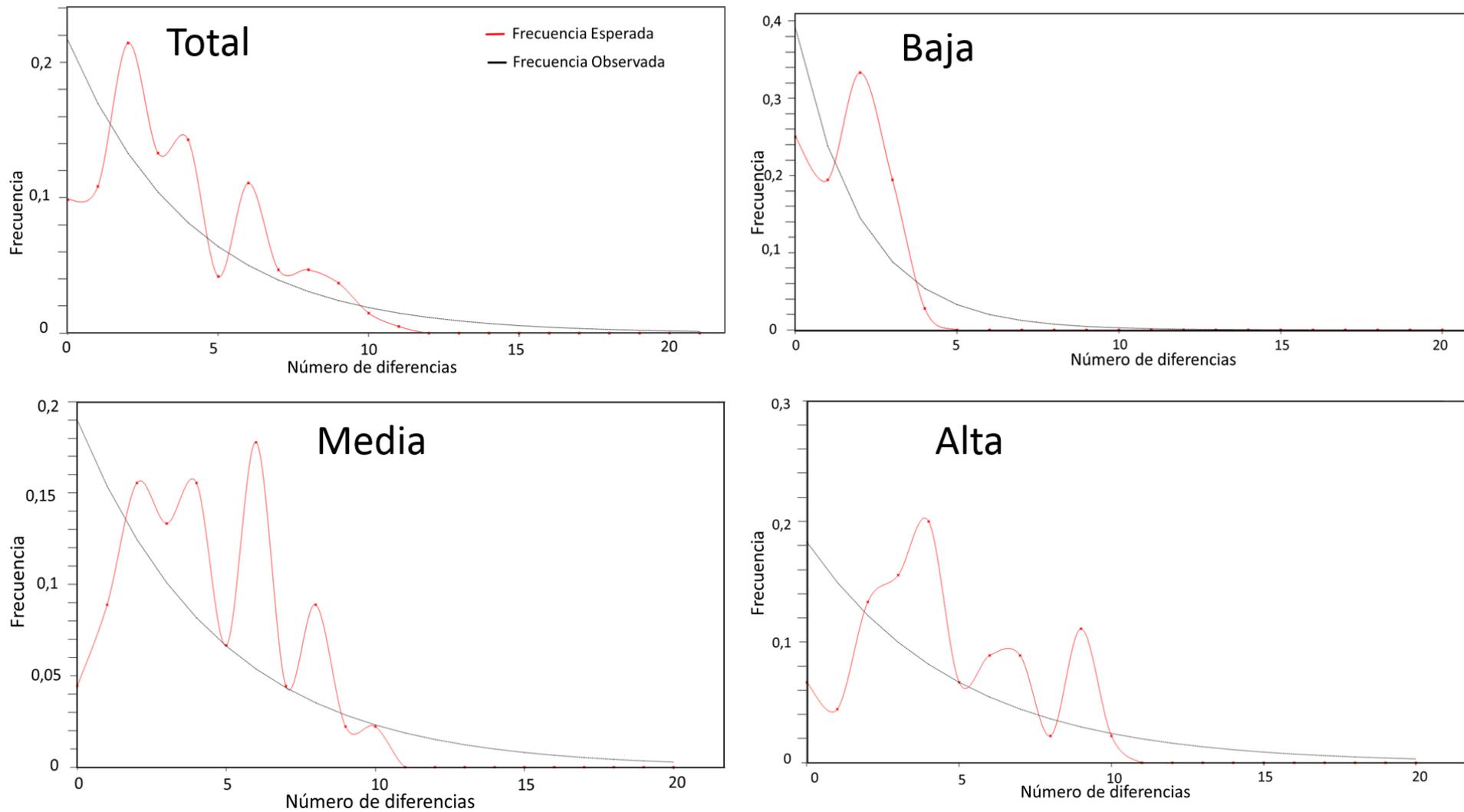


Figura 13: Gráficos de distribución *mismatch* para tres poblaciones de *Phyllotis xantophygus* basadas en un segmento de 388 pb del gen mitocondrial de Región Control. El eje x muestra el número de diferencias de pares, el eje y muestra la frecuencia de las comparaciones de pares. Las frecuencias observadas fueron representadas por una línea roja. La frecuencia esperada bajo la hipótesis del modelo de expansión de la población fue representada por una línea negra.

## Diversidad genética intra e interpoblacional basado en el análisis de un segmento de $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear.

Se obtuvo un fragmento de 428 pb de  $\beta$ -Fibrinógeno en un total de 29 individuos. Se encontraron 17 sitios polimórficos (número total de mutaciones=17), de los cuales 8 resultaron parsimoniosamente informativos. Los sitios variables se identificaron en base a las sustituciones nucleotídicas y no hubo inserciones o deleciones. Además, se identificaron 11 haplotipos. Para la muestra total la diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) fue de 0,901 y 0,00618 respectivamente, indicando una alta diversidad haplotípica y una diversidad nucleotídica baja. Las poblaciones media y baja presentaron mayor número de sitios polimórficos ( $S$ ) que la población alta. Asimismo, la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue más alta en la población baja (0,008) en comparación con la población media (0,005) y alta (0,003) (Tabla 7).

Tabla 7: Índices de diversidad molecular total y de cada poblaciones estudiada de *Phyllotis xanthopygus*, basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear. Abreviaturas: Tamaño de la muestra ( $N$ ), número de sitios polimórficos ( $S$ ), Sitios Parsimoniosamente Informativos (S. P. I.), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad de haplotipos ( $h$ ).

Diversidad génica intrapoblacional							
Población	N	S	S.P.I.	$\pi \pm \sigma$	Nº de haplotipos	$h \pm \sigma$	Haplotipos
Baja	9	13	3	0,00844 $\pm$ 0,00279	5	0,833 $\pm$ 0,098	H1 H2 H3 H7 H11
Media	10	10	3	0,00578 $\pm$ 0,00195	7	0,911 $\pm$ 0,077	H2 H3 H4 H5 H6 H8 H10
Alta	10	4	3	0,00363 $\pm$ 0,00068	6	0,889 $\pm$ 0,075	H1 H2 H3 H4 H5 H9
<b>Total</b>	29	17	8	0,00618 $\pm$ 0,00119	11	0,901 $\pm$ 0,026	

La diversidad haplotípica ( $h$ ) fue alta en todas las poblaciones, presentándose un valor cercano a 1 en la población media ( $h=0,911$ ) y valores de 0,833 y 0,889 para las poblaciones baja y alta, respectivamente. Los haplotipos H2 y H3 son compartidos por las 3 poblaciones y, junto con el haplotipo H1, son los que se encuentran con mayor frecuencia (5 individuos). El haplotipo H1 se encuentra presente en las poblaciones baja y alta, mientras que los haplotipos H4 y H5 son compartidos por la población alta y media. De los 11 haplotipos, se encontraron 6 haplotipos únicos presentes en una sola población: los haplotipos H7 y H11 pertenecientes a la población baja, H6; H8 y H10 pertenecientes a la población media y el haplotipo H9 se encuentra en 2 individuos pertenecientes a la población alta (Tabla 8).

Tabla 8: Frecuencia absoluta de haplotipos en total y para cada una de las poblaciones estudiadas de *Phyllotis xanthopygus* basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear.

Haplotipo	Baja	Media	Alta	Total
H1	3	0	2	5
H2	3	1	1	5
H3	1	1	3	5
H4	0	2	1	3
H5	0	3	1	4
H6	0	1	0	1
H7	1	0	0	1
H8	0	1	0	1
H9	0	0	2	2
H10	0	1	0	1
H11	1	0	0	1

Las distancias genéticas para  $\beta$ -Fibrinógeno, muestran valores bajos. La mayor distancia genética se presentó entre la población baja y media, cuyo valor fue de 0,08% (Tabla 9).

Tabla 9: Divergencia nucleotídica (D) entre las tres poblaciones estudiadas de *Phyllotis xanthopygus*, expresadas en porcentaje (%), Flujo Génico (Nm) calculado a partir de  $F_{ST}$  y distancia geográfica para cada par de poblaciones basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear.

Pares de Poblaciones	D (%)	$F_{ST}$	Nm	Distancia geográfica (Km)
Baja-Media	0,08	0,09	2,68	7,23
Media-Alta	0,06	0,17	1,23	5,47
Baja-Alta	0,06	0,06	4,65	12,42

### Estructura de la población y flujo genético

#### Flujo génico y aislamiento por distancia

Los estimadores de flujo génico entre pares de poblaciones presentaron valores bajos. El estimador  $F_{ST}$  global presentó un valor de  $F_{ST} = 0,07$  y de  $Nm = 3,45$ . El mayor valor de  $F_{ST}$  fue para las poblaciones media y alta. La estimación de Nm, a partir de  $F_{ST}$ , arrojó en todos los casos valores

mayores a 1 (Tabla 9). El análisis de aislamiento por distancia mostró que si bien hay una coeficiente de correlación alto ( $r=0,961$ ), este no resultó estadísticamente significativo ( $p= 0,16$ ), por lo cual no es posible inferir la presencia de un patrón de aislamiento por distancia (Figura 14).

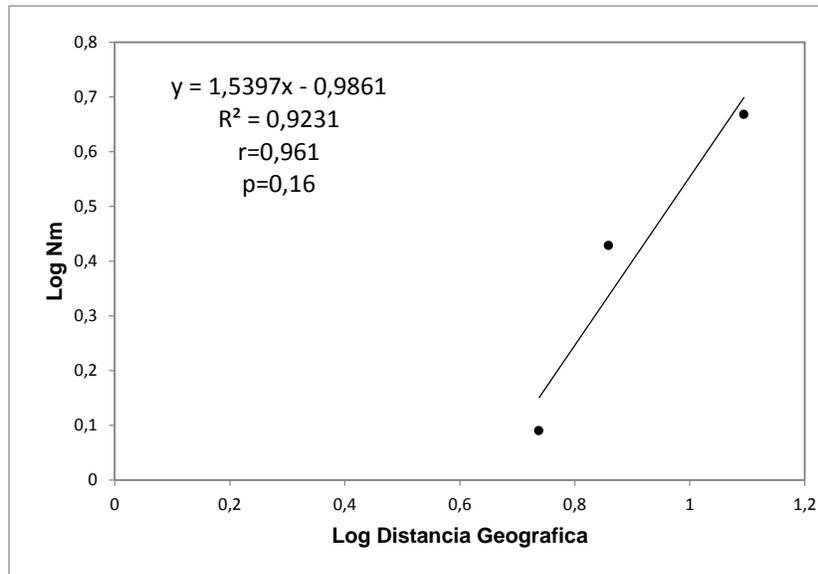


Figura 14: Gráfico que muestra la relación entre la distancia geográfica y del flujo génico (Nm) entre pares de poblaciones de *Phyllotis xantophygus*, basado en  $F_{ST}$  basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear ( $r=0,961$ ;  $p=0,16$ ).

#### Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la varianza se da dentro de las poblaciones (96,5%) mientras que solo el 3,5% se da entre poblaciones. Asimismo, el índice  $F_{ST}$  resulto bajo y no significativo (Tabla 10).

Tabla 10: Análisis jerárquico de la varianza molecular basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear. El nivel de significancia (P) del componente de la varianza fue testeado mediante permutaciones siguiendo a Excoffier et al., (1992).

<b>Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)</b>			
<b>Fuente de Variación</b>	<b>% de Variación</b>	<b>Índice de Fijación</b>	<b>P</b>
<b>Entre Grupos</b>	-	-	-
<b>Entre poblaciones dentro de grupos</b>	3,5	0,03	0,16
<b>Dentro de poblaciones</b>	96,5	-	-

## Historia demográfica

Para la muestra total, esto es, tomando en cuenta todas las poblaciones como una sola, las pruebas de neutralidad de Tajima y  $F_s$  presentaron valores negativos pero no significativos ( $D = -0,71$ ;  $F_s = -2,98$ ); al igual el test  $R_2$  fue no significativo ( $R_2 = 0,0816$ ). Para la población baja, los valores del test  $F_s$  no fueron significativos, mientras que para las poblaciones media y alta se obtuvo un valor de  $F_s = -2,62$  y  $-2,52$  con un nivel de significancia menor a  $0,002$ . El Test de Tajima resultó no significativo en todo los casos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 11).

Para la muestra total, el análisis de distribuciones pareadas o “*mismatch distribution*” sugiere una historia demográfica estable, reflejado por una distribución multimodal, pero con un número bajo de diferencias pareadas ( $k = 2,64$ ) (Tabla 11). Por otro lado, los resultados del análisis de “*mismatch distribution*” para cada una de las poblaciones sugieren una historia demográfica estable, reflejado en una distribución bimodal para la población baja y media, y una expansión poblacional reflejado por una distribución unimodal para la población alta (Figura 15). Los valores de los estadísticos “*raggedness*” ( $rg$ ),  $R_2$  y de SSD no fueron significativos para ninguna población, por lo tanto, se ajustan a lo esperado bajo el modelo de expansión poblacional reciente (Tabla 11).

Tabla 11: Pruebas estadísticas de la distribución de las diferencias pareadas (distribución *mismatch*) e índices de neutralidad de tres poblaciones de *Phyllotis xanthopygus*, basadas en un segmento de 428 pb del gen nuclear  $\beta$ -Fibrinógeno: tamaño de la población (N), estadístico D (Tajima 1989), estadístico  $F_s$  (Fu 1997), *Raggedness statistic* ( $rg$ ) (Rogers y Harpending 1992), suma de desviaciones cuadradas (SSD) (Schneider y Excoffier, 1999) y estadístico  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas 2002). Nivel de significancia estadística:  $*P \leq 0.002$  (significativo).

Población	N	D	$F_s$	K	$rg$	$R_2$	SSD
Baja	9	-1,17	0,46	3,60	0,26	0,17	0,12
Media	10	-1,34	-2,62*	2,40	0,14	0,16	0,04
Alta	10	0,38	-2,52*	1,50	0,16	0,19	0,02
Total	29	-0,71	-2,98	2,60	0,06	0,08	0,06

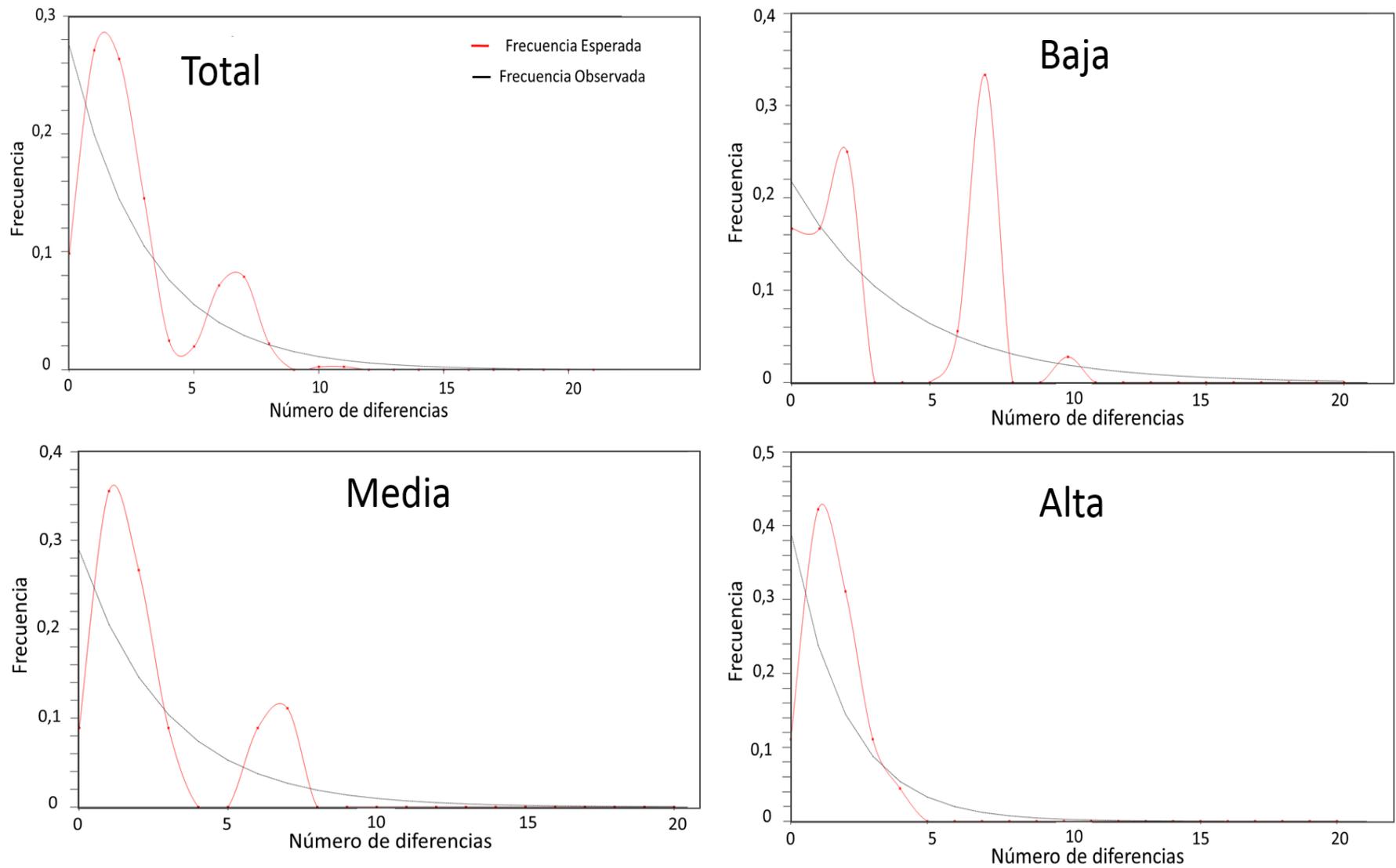


Figura 15: Gráficos de distribución *mismatch* para poblaciones de *Phyllotys xanthopygus* basado en el análisis de un segmento de  $\beta$ -Fibrinógeno del genoma nuclear. El eje x muestra el número de diferencias de pares, el eje y muestra la frecuencia de las comparaciones de pares. Las frecuencias observadas fueron representadas por una línea roja. La frecuencia esperada bajo la hipótesis del modelo de expansión de la población fue representada por una línea negra.

## DISCUSIÓN

Los marcadores nucleares y mitocondriales ofrecen propiedades moleculares y sensibilidades diferentes a los procesos poblacionales que incluyen: herencia biparental y uniparental, historias recombinantes y no recombinantes y una proporción de 4: 1 de los tiempos de coalescencia esperados. Estas propiedades de contraste son valiosas cuando se emplean para investigar patrones de diversidad genética entre poblaciones (Godinho et al., 2006). Los marcadores nucleares, aportan información sobre el flujo génico más reciente, a diferencia de los marcadores mitocondriales que aporta información sobre el flujo génico histórico. Las poblaciones de *P. xanthopygus* mostraron diferentes niveles de diversidad genética a lo largo del rango geográfico analizado en este estudio. Encontramos diferenciación genética baja entre las poblaciones y una estructura espacial moderada para la variación mitocondrial, en contraste con la homogeneidad genética y la ausencia de estructura genética, encontrada con el marcador nuclear. En este sentido, teníamos como hipótesis que las poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal presentan distintos niveles de diversidad genética, sin embargo los resultados obtenidos permiten asegurar que la diversidad genética en las poblaciones de *P. xanthopygus* es alta y relativamente homogénea.

También hipotetizamos que las poblaciones presentarían un patrón de aislamiento por distancia. En este aspecto debemos decir que con el marcador mitocondrial región control se observa un patrón de aislamiento por distancia, donde la distancia genética y el índice  $F_{ST}$  aumentan con la distancia geográfica, mientras que el valor de  $Nm$  disminuye apreciablemente (Figura 12) (Wright, 1943). Además, encontramos un solo haplotipo (H4) compartido por las tres poblaciones (Tabla 3), esto sugiere que el flujo de genes entre poblaciones está determinado, al menos en parte, por la proximidad geográfica de las mismas y por tanto, existe cierto grado de aislamiento genético entre las poblaciones (Stefanovic et al., 2016). Estudios previos en los que se han utilizado marcadores mitocondriales, han reportado que *Phyllotis* presenta, desde el punto de vista latitudinal, una estructuración genética fuertemente marcada en escalas geográficas mucho más amplias que en el presente análisis (Albright, 2005; Riverón, 2011; Steppan et al., 2007). En este trabajo, llevado a cabo en una escala mucho más pequeña y en un gradiente altitudinal, si bien se aprecia un patrón de aislamiento por distancia, no se evidencian niveles de diferenciación genética entre las poblaciones: la conexión genética entre las poblaciones de *P. xanthopygus* es sostenida por el resultado del AMOVA (Tabla 5), el cual indica que el mayor porcentaje de diversidad genética se reparte entre los individuos dentro de las poblaciones. Este resultado posiblemente se deba a la

cantidad de haplotipos únicos presentes en cada una de las poblaciones y es concordante con los bajos valores obtenidos de distancia genética (D) y de  $F_{ST}$  y los elevados valores de Nm (Tabla 4). Por lo tanto, las poblaciones no presentan diferenciación genética y ni estructuración genética como se espera para poblaciones no aisladas que funcionan como una unidad panmíctica (Caldera et al., 2013).

En cuanto al marcador nuclear intron 7 de  $\beta$ -Fibrinógeno, las poblaciones de *P. xanthopygus* no presentaron diferenciación ni estructura genética evidente. Asimismo, no hubo patrón de aislamiento por distancia (Figura 14): esperábamos encontrar mayores valores de flujo génico entre las poblaciones más cercanas es decir entre las poblaciones media-alta y media-baja. Sin embargo, los resultados de los estadísticos D,  $F_{ST}$  y Nm (Tabla 9) mostraron que existe mayor conexión genética entre las poblaciones alta y baja que entre éstas con la población media. En este mismo sentido, cerca del 50% de los haplotipos encontrados son compartidos por al menos dos poblaciones, y dos de ellos (H2; H3) se encuentran presentes en las tres poblaciones estudiadas (Tabla 8). Por lo tanto, los niveles de diferenciación genética entre poblaciones obtenidos con el marcador nuclear indican que la distancia geográfica entre las poblaciones, no es un factor limitante para mantener elevados niveles de flujo génico (Stefanović et al. 2016). Además, el resultado del AMOVA (Tabla 10) indica que el mayor porcentaje de variación genética se reparte entre los individuos dentro de las poblaciones, lo que indica baja diferenciación y ausencia de estructura genética entre poblaciones. De esta manera, el patrón encontrado con el marcador  $\beta$ -Fibrinógeno es una composición genética relativamente homogénea y una alta conectividad genética entre poblaciones.

Por otro lado, para ambos marcadores, las distancias genéticas (D) y los índices de diferenciación ( $F_{ST}$ ) son bajos (Tabla 4; Tabla 9), lo que es atribuible a un alto flujo génico entre poblaciones. Detectamos una estructura poblacional con el marcador mitocondrial que no se vio reflejada con el marcador nuclear, este patrón es característico de poblaciones que se están diferenciando genéticamente bajo un flujo génico relativamente alto (Rašić et al., 2015). Las estimaciones del número efectivo de migrantes (Nm) proporcionadas en la Tabla 9 y la ausencia de patrón de aislamiento por distancia observada en nuestros datos con el marcador nuclear, son indicativas del flujo génico elevado en curso entre las poblaciones estudiadas. De esta manera, si las tasas de flujo génico son suficientes y constantes, las diferencias genéticas entre las poblaciones podrían mantenerse bajas (Pearson, 1975). En particular, los valores de  $F_{ST}$  obtenidos (Tabla 4; Tabla 9), con ambos marcadores, para la población media dan cuenta de un flujo génico más regular y de mayor magnitud desde y hacia esta población.

A partir de los Test de neutralidad (Tabla 6 y Tabla 11) y las distribuciones *mismatch* (Figura 13 y Figura 15), observamos fluctuaciones demográficas históricas y actuales en cada una de las poblaciones. Se evidencian indicios de reducciones de los tamaños poblacionales tanto para la población baja (con Región Control) como para la población alta (con  $\beta$ -Fibrinógeno), mientras que la población media mostró distribuciones *mismatch* multimodales con ambos marcadores, este resultado sugeriría que esta población es demográficamente estable (Castillo-Olguín et al., 2012; Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Sin embargo, esto podría explicarse a partir de la estructura genética encontrada en las poblaciones de *P. xanthopygus* con el marcador mitocondrial, lo cual pueden producir un patrón multimodal incluso en poblaciones demográficamente inestables (Aris-Brosou y Excoffier, 1996; Marjoram y Donnelly, 1994). La gran diversidad de haplotipos, la baja diversidad de nucleótidos, las distribuciones de desajustes unimodales y los valores significativamente negativos de la estadística de  $F_s$  respaldan una expansión reciente a partir de una población fundadora más pequeña como la explicación más plausible para las desviaciones significativas observadas de la neutralidad en la población alta (Nyakaana et al., 2008).

Los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica ( $h$ ) encontrados con ambos marcadores (Tabla 2 y Tabla 7) y la presencia de haplotipos comunes en baja frecuencia y abundancia de haplotipos únicos, encontrados principalmente en el marcador mitocondrial, es un patrón frecuentemente atribuido a poblaciones que han experimentado una expansión poblacional reciente (Rogers y Harpending, 1992; Slatkin y Hudson, 1991). Las señales de expansión poblacional ya han sido documentadas en estudios previos: Steppan et al. (2007) y Albright et al. (2005) afirman que *P. xanthopygus* es una especie que se caracteriza por profundas divergencias genéticas entre poblaciones y una alta diversidad genética en toda su distribución.

Tenemos una mala comprensión de si la diferenciación genética entre poblaciones es el producto de los procesos evolutivos en curso en las poblaciones contemporáneas o un legado de fluctuaciones históricas en el tamaño efectivo de la población y el flujo de genes (Eckert et al., 2008). Los procesos demográficos históricos y actuales afectan de manera diferente la variabilidad genética en el genoma nuclear y mitocondrial (Canino et al., 2010). La dinámica de las poblaciones y los eventos estocásticos que varían espacial y temporalmente se reflejan en una mayor estructura genética en los marcadores mitocondriales en comparación con los marcadores nucleares (Rašić et al., 2015). En este sentido, la ausencia de estructura genética encontrada en el marcador nuclear puede ser el resultado de tiempo insuficiente para que las poblaciones alcancen un equilibrio entre migración y deriva génica (Dever et al., 2002). Se espera que los genes nucleares heredados

biparentalmente, tengan tamaños poblacionales efectivos ( $N_e$ ) que son 4 veces mayores que los genes heredados uniparentalmente, como los marcadores de ADNmt. Esto hace que los genes nucleares sean menos susceptibles a la erosión de la variación genética neutra y menos propensos a detectar expansión poblacional, como resultado de eventos fundadores o eventos de recuperación poblacional (Fijarczyk y Babik, 2015). En este sentido debemos decir, que una explicación alternativa sería que los patrones de marcadores nucleares observados pudieran deberse a un flujo de genes con sesgo masculino, con una dispersión recurrente de machos y una dispersión rara de hembras que conduce a un patrón de contraste de estructuración entre el ADNmt y el ADNn (Nicolas et al., 2012). Nada se sabe sobre el comportamiento de apareamiento y dispersión en esta especie, por lo que esta hipótesis requiere la ampliación de estudios genéticos poblacionales con un análisis estadístico exhaustivo y cuidadoso, la utilización de marcadores moleculares de herencia uniparental y la incorporación de estudios ecológicos poblacionales que contemplen marcaje y recaptura de individuos, las distancias de dispersión y del éxito reproductivo de los dispersores (Slatkin & Barton 1989).

Aunque los factores históricos podrían explicar parte de la diversidad genética evidenciada en las poblaciones de *P. xanthopygus*, la siguiente pregunta es ¿qué mantiene esta diversidad? Whitlock (1992) ha argumentado que la inestabilidad en la disponibilidad de recursos y la variación demográfica pueden desempeñar un papel importante en el surgimiento y el mantenimiento de la variabilidad genética. Un aspecto importante a considerar en este contexto, son las consecuencias genéticas de vivir en hábitats fragmentados o naturalmente irregulares. En la provincia de Mendoza, los Andes alcanzan una gran altitud en una distancia lineal relativamente corta, lo cual implica cambios abruptos en el paisaje, el ambiente y la calidad y disponibilidad de recursos. Particularmente, el rango altitudinal estudiado aquí, cubre un amplio gradiente de temperatura y precipitación en una pendiente pronunciada, lo que implica fuertes variaciones ambientales (Sassi et al., 2017). De esta manera las poblaciones se encuentran en un mosaico de paisaje, donde la cantidad y la estabilidad de recursos varían temporalmente, restringiendo o promoviendo movimientos de individuos y genes que afectan, como consecuencia, los patrones de migración entre las poblaciones y la estructura genética de las poblaciones (Munger et al., 1983). Asimismo, el grado en que los tamaños poblacionales fluctúan a través del tiempo determina la velocidad a la que se pierde o se repone variación genética a través de la deriva génica y del flujo de genes, respectivamente (Pearson, 1975). Cuando la variación en los parámetros demográficos y ambientales es estocástica, los individuos se enfrentan a eventuales periodos de condiciones

desfavorables para la supervivencia y reproducción, que impulsan caídas abruptas en los tamaños poblacionales. De manera que, la recuperación de la población se da esencialmente mediante el aporte de migrantes, provenientes de otras poblaciones (Hansson y Henttonen, 1985).

Se ha estudiado la densidad poblacional y los cambios en los tamaños poblacionales en *P. andium* y *P. darwini*, especies ecológicamente similares a *P. xanthopygus* (Kim et al., 1998). Tienen un tiempo generacional corto y son especies irruptivas, donde la abundancia y densidad poblacional están relacionadas con la estacionalidad (Crespin y Lima, 2006; Hernández-Betancourt et al., 2008). Existe evidencia de altas densidades poblacionales luego de condiciones ambientales inusuales como grandes cantidades de precipitaciones (Pearson, 1975; Torres, 1994). En los años de "brotes", *P. darwini* exhibe una rápida maduración de los jóvenes (tanto machos como hembras) con intervalos mínimos entre camadas, lo que resulta en un rápido crecimiento de la población. Además, estudios demográficos de *P. darwini* demostraron que, por lo general, ninguno de los adultos sobrevivió más allá de una estación reproductiva y la población reproductora total consistió en adultos inmigrantes y animales jóvenes residentes nacidos en la misma estación. Estos datos sugieren una alta rotación anual de la población *P. darwini* (Meserve y Le Boulengé, 1987). También se ha informado un paralelo interesante en *Microtus agrestis* en Suecia y Finlandia. Esta especie se caracteriza por un ciclo de vida corto, ciclos reproductivos rápidos y eventos de dispersión cortos pero frecuentes (Kim et al., 1998). Se ha sugerido que la combinación de altas tasas de dispersión con altas densidades poblacionales y la variación espacio-temporal en la calidad del hábitat puede explicar las altas tasas de flujo genético entre poblaciones (Gauffre et al., 2008).

*P. xanthopygus* es una especie que muestra una gran plasticidad fisiológica y ecológica con una alta capacidad de dispersión pero, al mismo tiempo es altamente dependiente de hábitats rocosos que le proveen zonas de refugio ante la presencia de predadores (Kramer y Birney, 2001; Nespolo et al., 1999; Steppan et al., 2007). En este contexto, la plasticidad fenotípica juega un rol central en la aclimatización a la variación ambiental (Sassi et al., 2017). Si bien no se espera que la variación genética en marcadores neutros responda a los efectos ambientales, se prevé que los organismos que muestran una gran plasticidad, presenten altas tasas de flujo de genes y en consecuencia estructuras genéticas débiles en todas las poblaciones (Sexton et al., 2014). En este contexto, las características genéticas de las poblaciones deben ser dictadas por la interacción de la deriva genética, el flujo genético y la selección natural, procesos que pueden estar fuertemente influenciados por la demografía y la distribución espacial de las poblaciones (Hollander et al., 2017). En este sentido, estudios realizados en este mismo gradiente altitudinal, han permitido observar

que existen variaciones periódicas en la densidad y abundancia de *P. xanthopygus* que se manifiestan en el éxito de captura en y entre los tres sitios (Paola Sassi en comunicación personal). Además, se han reportado diferencias significativas en el patrón de actividad, la selección de ítems alimenticios y el tamaño de camada entre las tres poblaciones aquí estudiadas (Sassi et al., 2015, 2017, 2018). Estas diferencias se dan principalmente entre las poblaciones alta y baja y, probablemente, se ven reforzadas por los rangos térmicos que difieren entre los sitios de muestreo a lo largo del año (Sassi y Novillo, 2015).

En este contexto, la teoría de metapoblación proporciona una base para considerar los resultados obtenidos en términos de demografía de población y dinámica de fuente-sumidero (Pulliam, 1988). Quizás sea más adecuado pensar a las poblaciones aquí estudiadas en términos colectivos más que en términos de poblaciones individuales. De esta manera, cada uno de los sitios aquí muestreados puede actuar como fuente o sumidero de diversidad genética potencial en el sentido de que, si bien proporciona un refugio fijo, la disponibilidad de recursos y las condiciones ambientales varían de forma estacional promoviendo una migración esporádica suficiente entre las poblaciones para mantener elevados niveles de diversidad genética (Kim et al., 1998). Cada población se desplaza entre las fuentes y los sumideros cuando la estocasticidad ambiental es grande y esto podría acentuarse por parámetros de la historia de la vida de *P. xanthopygus*, como una alta rotación anual de individuos, dispersión sesgada por sexo, sistemas de cría altamente estructurados y/o barreras geográficas (Munger et al. 1983; Chesser 1983). De esta manera, la combinación de parches de hábitat a lo largo del gradiente y factores de la historia de vida de *P. xanthopygus* sugiere que en la actualidad es poco probable que las poblaciones locales logren un equilibrio demográfico. Para *Microtus arvalis* y *Phyllotis darwini* se ha sugerido una dinámica poblacional similar de fuente-sumidero entre hábitats permanentes y temporales, donde tanto factores endógenos como exógenos se retroalimentan y operan juntos, influyendo en los procesos demográficos de estas especies (Gauffre et al., 2008; Lima et al., 2001).

#### Conclusiones y perspectivas futuras:

El objetivo inicial de este trabajo era la caracterización genética de las poblaciones de *P. xanthopygus* a lo largo de un gradiente altitudinal en los Andes Centrales de Mendoza. En este sentido, encontramos que la diversidad genética en las poblaciones de *P. xanthopygus* es alta y

relativamente homogénea, con un patrón de aislamiento por distancia que se evidenció analizando el genoma mitocondrial pero no se detectó analizando el genoma nuclear.

Es necesario resaltar que cuando el número de individuos y de poblaciones analizadas es bajo, los resultados están sujetos a grandes errores y deben interpretarse con cautela. Resulta necesario garantizar la selección de una muestra representativa en cada uno de los sitios de estudio. Sin bien, asignar el esfuerzo de muestreo depende de múltiples factores, para organismos diploides se recomienda que 30 individuos por población deberían ser suficientes para determinar con precisión los parámetros genéticos poblacionales como los estimados en el presente estudio (Hale et al., 2012). En este sentido, también es conveniente adecuar el diseño de muestreo considerando un mayor número de poblaciones por sitio, esto permitiría comprobar si los resultados obtenidos son producto de diferenciación biológica o un efecto del muestreo.

Por otro lado, la importancia de los marcadores utilizados en el presente estudio para la identificación de la estructura poblacional está bien documentada. Sin embargo, estos marcadores presentan niveles de polimorfismo genético bajos, reduciendo la facultad para detectar niveles de diferenciación genética significativa a pequeña escala (Aars et al. 1998). Los análisis de estructura de población que proporcionan mayor información, combinan múltiples loci independientes. En este aspecto, podremos reforzar las conclusiones obtenidas en este estudio y adquirir mayores detalles, utilizando marcadores microsatélites que son regiones del genoma en las que una secuencia corta, 2-6 pares de bases, se repite un cierto número de veces (Ascunce, 2002). Estos marcadores se heredan de manera codominante, permitiendo diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, presentan altas tasas de mutación, lo que permite diferenciar individuos estrechamente emparentados y han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos ya que resultan muy informativos en cuanto a la cantidad y distribución de la diversidad genética y de los procesos que determinan la estructura y la variación dentro y entre poblaciones naturales. Permiten estimar la estructura genética de la población aun cuando existe un alto flujo génico y la diferenciación entre las poblaciones es baja (Fasanella, 2012). Sin embargo, los microsatélites presentan algunos inconvenientes, uno de ellos es que en muchos casos resulta necesario aislar y caracterizar marcadores específicos para la especie objeto de estudio, lo que supone un elevado esfuerzo en términos de tiempo y recursos económicos.

Por último, es necesario analizar aspectos ecológicos de *P. xantophygius* ya que para comprender completamente el flujo de genes y la estructura de las poblaciones en los sistemas naturales, necesitamos la integración de otras formas de información incluidos datos detallados de

comportamiento de dispersión, sistema de apareamiento, tolerancias ecológicas e historias de vida. Cuando se utilizan los datos y análisis adecuados, la filogeografía y la genética del paisaje pueden proporcionar excelentes complementos para examinar cómo los modos y patrones de los procesos que operaron en el pasado y en la actualidad, afectan la estructura genética de las poblaciones y la conectividad entre sitios. Ya que los gradientes ambientales pueden ayudar a identificar las características del paisaje que más afectan la dispersión y el flujo de genes (Mapelli et al., 2012), resulta interesante examinar cómo la composición y configuración del paisaje a lo largo de este gradiente influyen en la diversidad genética y el aislamiento poblacional. En este sentido, los estudios futuros deberían orientarse a continuar intentando dilucidar los procesos históricos y contemporáneos que afectan la diversidad genética en estas poblaciones.

En muchas situaciones, las relaciones de causa y efecto pueden verse confundidas por interacciones sinérgicas entre variables y por una incapacidad para distinguir factores próximos de factores finales (Munger et al., 1983). Por lo tanto, para futuros estudios recomendamos ampliar el tamaño muestral tanto de individuos como de poblaciones por sitio, enmarcar adecuadamente las hipótesis y los marcadores moleculares a utilizar, para la escala geográfica estudiada. Este trabajo constituye la primera aproximación al conocimiento de la diversidad genética a pequeña escala en poblaciones de *P. xantophyus*. El conocimiento de la diversidad genética actual de las poblaciones, permite hacer inferencias acerca de los procesos y eventos que operaron sobre ellas en el pasado para desde allí poder predecir los futuros niveles de diversidad genética en estas poblaciones.

## AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional de Cuyo por brindarme la oportunidad de realizar de forma gratuita mis estudios, a toda la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a mis profesores quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como estudiante.

A la Dra. Agustina Ojeda, Dra. Paola Sassi y Dra. Paula Cornejo que con su dedicación, paciencia y enseñanza permitieron el desarrollo de este trabajo.

A los Dr. Carlos Marfil y Dr. Diego Vázquez, quienes destinaron su valioso tiempo en la evaluación de este trabajo y enriquecieron este manuscrito con sus comentarios, correcciones y sugerencias.

A mi familia en especial a mi mamá, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A mis amigos de toda la vida, gracias por su paciencia, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, siempre los llevo en mi corazón.

A mis compañeros de facultad y actuales colegas que han hecho de estos años una aventura. Gracias por todas las horas de charlas, mates y anécdotas académicas.

En especial a Facundo por estar siempre y dar su aliento, apoyo y ayuda incondicional!

Con mucho cariño lo comparto con ustedes.

## BIBLIOGRAFIA:

- Albright, J.C. (2005). Phylogeography of the sigmodontine rodent, *Phyllotis xanthopygus*, and a test of the sensitivity of nested clade analysis to elevation-based alternative distances. PhD Thesis. Florida State University.
- Aris-Brosou, S., y Excoffier, L. (1996). The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* 13, 494–504.
- Aars, J., Ims, R. A., Liu, H. P., Mulvey, M. y Smith, M. H. (1998). Bank voles in linear habitats show restricted gene flow as revealed by mitochondrial DNA (mtDNA). *Molecular Ecology*, 7, 1383-1389.
- Ascunce, M.S. (2002). Variabilidad nucleotídica en el ADN mitocondrial de *Alouatta Caraya* del NE de Argentina. PhD Thesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Astuti, D. (2004). A phylogeny of cockatoos (Aves: Psittaciformes) inferred from DNA sequences of the seventh intron of nuclear  $\beta$ -fibrinogen gene. Dr. Work Grad. Sch. Environ. Earth Sci. Hokkaido Univ. Jpn.
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species* (Harvard university press).
- Brouat, C., Loiseau, A., Kane, M., Bâ, K. y Duplantier, J. M. (2007). Population genetic structure of two ecologically distinct multimammate rats: the commensal *Mastomys natalensis* and the wild *Mastomys erythroleucus* in southeastern Senegal. *Molecular ecology*, 16, 2985-2997.
- Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (2013). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica*, 33.
- Canino, M.F., Spies, I.B., Lowe, S.A., y Grant, W.S. (2010). Highly Discordant Nuclear and Mitochondrial DNA Diversities in Atka Mackerel. *Mar. Coast. Fish.* 2, 375–387.
- Castillo-Olguín, E., Uribe-Alcocer, M., y Díaz-Jaimes, P. (2012). Evaluación de la estructura genética poblacional de *Sphyrna lewini* para la identificación de unidades de conservación en el Pacífico mexicano. *Cienc. Mar.* 38, 635–652.
- Chesser, R.K. (1983). Genetic Variability within and among Populations of the Black-tailed Prairie Dog. *Evolution* 37, 320–331.
- Chiappero, M. B., Sabattini, M. S., Blanco, A., Calderón, G. E. y Gardenal, C. N. (2002). Gene flow among *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae) populations in Argentina. *Genética*, 114, 63-72
- Chung, D.W., y Davie, E.W. (1984). Gamma and gamma 'chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry* 23, 4232–4236.

- Crespin, L., y Lima, M. (2006). Supervivencia adulta y dinámica poblacional del lauchón orejudo *Phyllotis darwini* en Chile central. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 79, 295–308.
- Crow, J.F., y Kimura, M. (1970). An introduction to population genetics theory. *Introd. Popul. Genet. Theory.*
- Dever, J.A., Strauss, R.E., Rainwater, T.R., McMurry, S.T., y Densmore III, L.D. (2002). Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in *Morelet's crocodile* (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia* 2002, 1078–1091.
- Dobson, F. S. (1994). Measures of gene flow in the Columbian ground squirrel. *Oecologia*, 100, 190-195.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., y Loughheed, S.C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17, 1170–1188.
- Excoffier, L., y Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., y Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Fahmy, T. (2013). XLSTAT, Version 2013. Addinsoft Paris.
- Fasanella, M. (2012). Variabilidad genética espacial y ecología molecular en dos especies de roedores del Archipiélago de Tierra del Fuego: *Ctenomys magellanicus*, especie nativa y *Castor canadensis*, especie invasora.
  - Fedorov, V. B., Goropashnaya, A. V., Boeskorov, G. G. y Cook, J. A. (2008). Comparative phylogeography and demographic history of the wood lemming (*Myopus schisticolor*): implications for late Quaternary history of the taiga species in Eurasia. *Molecular Ecology*, 17, 598-610.
  - Fijarczyk, A., y Babik, W. (2015). Detecting balancing selection in genomes: limits and prospects. *Mol. Ecol.* 24, 3529–3545.
  - Filatov, D.A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics* 25, 3189–3190.
  - Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
  - Gauffre, B., Estoup, A., Bretagnolle, V., y Cosson, J.F. (2008). Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Mol. Ecol.* 17, 4619–4629.
  - Godinho, R., Mendonça, B., Crespo, E.G., y Ferrand, N. (2006). Genealogy of the nuclear  $\beta$ -fibrinogen locus in a highly structured lizard species: comparison with mtDNA and evidence for intragenic recombination in the hybrid zone. *Heredity* 96, 454.
  - Guillot, G., y Orlando, L. (2013). Population Structure.

- Hale, M. L., Burg, T. M., & Steeves, T. E. (2012). Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS one*, 7, e45170.
- Hansson, L., y Henttonen, H. (1985). Gradients in density variations of small rodents: the importance of latitude and snow cover. *Oecologia* 67, 394–402.
- Harpending, H.C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 591–600.
- Hernández-Betancourt, S.F., Cimé Pool, J.A., Medina Peralta, S., y González-Villanueva, M.L. (2008). Fluctuación poblacional de *Ototylomys phyllotis* Merriam, 1901 (Rodentia: Muridae) en una selva mediana subcaducifolia del sur de Yucatán, México. *Acta Zool. Mex.* 24, 161–177.
- Hollander, J., Ahlgren, J., y Brönmark, C. (2017). Rates of gene flow in a freshwater snail and the evolution of phenotypic plasticity. *Biol. J. Linn. Soc.* 121, 764–770.
- Jobling, M.A., Hurles, M., y Tyler-Smith, C. (2004). Human evolutionary genetics: origins, peoples & disease.
- Jones, K.E., Bielby, J., Cardillo, M., Fritz, S.A., O'Dell, J., Orme, C.D.L., Safi, K., Sechrest, W., Boakes, E.H., y Carbone, C. (2009). PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology* 90, 2648–2648.
- Kim, I., Phillips, C.J., Monjeau, J.A., Birney, E.C., Noack, K., Pumo, D.E., Sikes, R.S., y Dole, J.A. (1998). Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Mol. Ecol.* 7, 667–678.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Kimura, M. (1991). The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* 66, 367–386.
- Kramer, K.M., y Birney, E.C. (2001). Effect of light intensity on activity patterns of Patagonian leaf-eared mice, *Phyllotis xanthopygus*. *J. Mammal.* 82, 535–544.
- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Labaroni, C. A., Malleret, M. M., Novillo, A., Ojeda, A., Rodriguez, D., Cuello, P. y Lanzone, C. (2014). Karyotypic variation in the Andean rodent *Phyllotis xanthopygus* (Waterhouse, 1837) (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). *Comparative cytogenetics*, 8, 369.
- Lessa, E. P. (1990). Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology*, 39, 242-252.
- Lima, M., Julliard, R., Stenseth, N.C., y Jaksic, F.M. (2001). Demographic dynamics of a neotropical small rodent (*Phyllotis darwini*): feedback structure, predation and climatic factors. *J. Anim. Ecol.* 70, 761–775.

- Macías, V.L., Montoya, L.R., Bautista, M.G., Gordillo, J.L., y M´rabet, S.M. (2017). Diversidad y estructura genética de *Artibeus jamaicensis* (chiroptera: phyllostomidae) en Chiapas, México. ACTA Zool. Mex. N S 33.
- Mapelli, F. J., Mora, M. S., Mirol, P. M. y Kittlein, M. J. (2012). Population structure and landscape genetics in the endangered subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. Conservation Genetics, 13, 165-181.
- Marjoram, P. y Donnelly, P. (1994). Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Subdivided Populations and Implications for Early Human Evolution. Genetics 136, 673–683.
- Méndez, E. (2011). La vegetación de los altos Andes: El flanco oriental del Cordón del Portillo (Tunuyán, Mendoza, Argentina). Bol. Soc. Argent. Botánica 46, 317–353.
- Meserve, P.L. y Le Boulengé, E. (1987). Population dynamics and ecology of small mammals in the northern Chilean semiarid region. Fieldiana Zool. ZOO 1987.
- Munger, J.C., Bowers, M.A. y Jones, W.T. (1983). Desert rodent populations: factors affecting abundance, distribution, and genetic structure. Gt. Basin Nat. Mem. 91–116.
- Nespolo, R.F., Opazo, J.C., Rosenmann, M. y Bozinovic, F. (1999). Thermal acclimation, maximum metabolic rate, and nonshivering thermogenesis of *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia) in the Andes mountains. J. Mammal. 80, 742–748.
- Nicolas, V., Herbreteau, V., Couloux, A., Keovichit, K., Douangboupha, B. y Hugot, J.-P. (2012). A remarkable case of micro-endemism in *Laonastes aenigmamus* (Diatomyidae, Rodentia) revealed by nuclear and mitochondrial DNA sequence data. PLoS One 7, e48145.
- Novillo, A., y Ojeda, R.A. (2014). Elevation patterns in rodent diversity in the dry Andes: disentangling the role of environmental factors. J. Mammal. 95, 99–107.
- Nyakaana, S., Tumusiime, C., Oguge, N., Siegismund, H.R., Arctander, P. y Muwanika, V. (2008). Mitochondrial DNA diversity and population structure of a forest-dependent rodent, *Praomys taitae* (Rodentia: Muridae) Heller 1911, in the fragmented forest patches of Taita Hills, Kenya. South Afr. J. Sci. 104.
- Page, R.D. y Holmes, E.C. (1998). Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach.
- Patton, J.L. y Feder, J.H. (1981). Microspatial genetic heterogeneity in pocket gophers: non-random breeding and drift. Evolution 912–920.
- Pearson, O.P. (1975). An outbreak of mice in the coastal desert of Peru. Mammalia 39, 375–386.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C.E. y Casas, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Cap. Nat. México 1, 437–494.
- Planter, E.A. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. Ecol. Mol. Semarnat-Ine-UNAM-Conabio 49–61.

- Prychitko, T.M. y Moore, W.S. (2003). Alignment and phylogenetic analysis of  $\beta$ -fibrinogen intron 7 sequences among avian orders reveal conserved regions within the intron. *Mol. Biol. Evol.* *20*, 762–771.
- Pulliam, H.R. (1988). Sources, sinks, and population regulation. *Am. Nat.* *132*, 652–661.
- Ramos-Onsins, S.E. y Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* *19*, 2092–2100.
- Rašić, G., Schama, R., Powell, R., Maciel-de Freitas, R., Endersby-Harshman, N.M., Filipović, I., Sylvestre, G., Máspero, R.C. y Hoffmann, A.A. (2015). Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. *Evol. Appl.* *8*, 901–915.
- Riverón Mato, A.S. (2011). Estructura poblacional e historia demográfica del "pericote patagónico", *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia: Sigmodontinae) en Patagonia Argentina.
- Roderick, G.K. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* *41*, 325–352.
- Rogers, A.R. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* *49*, 608–615.
- Rogers, A.R. y Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* *9*, 552–569.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* *34*, 3299–3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold spring harbor laboratory press).
- Sassi, P.L. y Novillo, A. (2015). Acclimating to thermal changes: intraspecific variation in a small mammal from the Andes Mountains. *Mamm. Biol.-Z. Für Säugetierkd.* *80*, 81–86.
- Sassi, P.L., Taraborelli, P., Albanese, S. y Gutierrez, A. (2015). Effect of temperature on activity patterns in a small Andean rodent: behavioral plasticity and intraspecific variation. *Ethology* *121*, 840–849.
- Sassi, P.L., Cuevas, M.F., Menéndez, J. y Dacar, M.A. (2017). Feeding strategies of a small mammal (*Phyllotis xanthopygus*, Rodentia Cricetidae) at diverse altitudes in the Central Andes, Argentina. *Ethol. Ecol. Evol.* *29*, 351–366.
- Sassi, P.L., Menéndez, J. y Cuevas, M.F. (2018). Geographic variation in life-history traits: factors shaping energy investment in reproduction in a highland dwelling rodent. *J. Zool.* *304*, 210–216.

- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. y Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205, 125–140.
- Schneider, S. y Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1079-1089.
- Sexton, J.P., Hangartner, S.B. y Hoffmann, A.A. (2014). Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common? *Evolution* 68, 1–15.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787–792.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264–279.
- Slatkin, M. y Barton, N.H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43, 1349–1368.
- Slatkin, M. y Hudson, R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555–562.
- Stefanovic, M., Velickovic, N., Cosic, N., Ćirović, D. y Djan, M. (2016). Genetic variability of northern white-breasted hedgehogs (*Erinaceus roumanicus*) from Serbia. *Balkan Journal of Wildlife Research*, 3, 1-6
- Stepan, S.J., Ramirez, O., Banbury, J., Huchon, D., Pacheco, V., Walker, L.I., y Spotorno, A.E. (2007). A molecular reappraisal of the systematics of the leaf-eared mice *Phyllotis* and their relatives. *Quintessential Nat. Honor. Life Leg. Oliver P Pearson Univ. Calif. Publ. Zool.* 134, 1–981.
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Templeton, A.R. (2006). *Population genetics and microevolutionary theory* (John Wiley & Sons).
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2–3.
- Torres-Contreras, H. U. G. O., A-Aranguiz, E. S. y Jaksic, F. M. (1994). Dieta y selectividad de presas de *Speotyto cunicularia* en una localidad semi-árida del norte de Chile a lo largo de siete años (1987-1993). *Revista Chilena de Historia Natural*, 67, 329-340.
- Vázquez-Domínguez, E., Mejía-Madrid, A., Vega, R., Cervantes, F.A., Vargas-Cuenca, J. y Hortelano-Moneada, Y. (2009). *Oryzomys couesi* en el sureste de México: estimaciones genéticas y filogeográficas. Cervantes FA J Vargas-Cuenca Hortelano-Moncada Eds 60.

- Vucetich, J.A., and Waite, T.A. (2003). Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conserv. Genet.* 4, 639–645.
- Wang, I.J. (2010). Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Mol. Ecol.* 19, 2605–2608.
- Waterhouse GR (1837) Characters of new species of the genus *Mus*, from the collection of Mr. Darwin. *Proc. Zool. Soc. London* 1837, 15-32.
- Whitlock, M. C. (1992). Temporal fluctuations in demographic parameters and the genetic variance among populations. *Evolution*, 46, 608-615.
- Wickliffe, J.K. (2003). Intron 7 (FGB-I7) of the fibrinogen, B beta polypeptide (FGB): a nuclear DNA phylogenetic marker for mammals (Museum of Texas Tech University).
- Wlasiuk, G., Carlos Garza, J. y Lessa, E.P. (2003). Genetic and geographic differentiation in the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57, 913–926.
- Whorley, J. R., Alvarez-Castañeda, S. T., & Kenagy, G. J. (2004). Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology*, 13, 2709-2720.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28, 114.