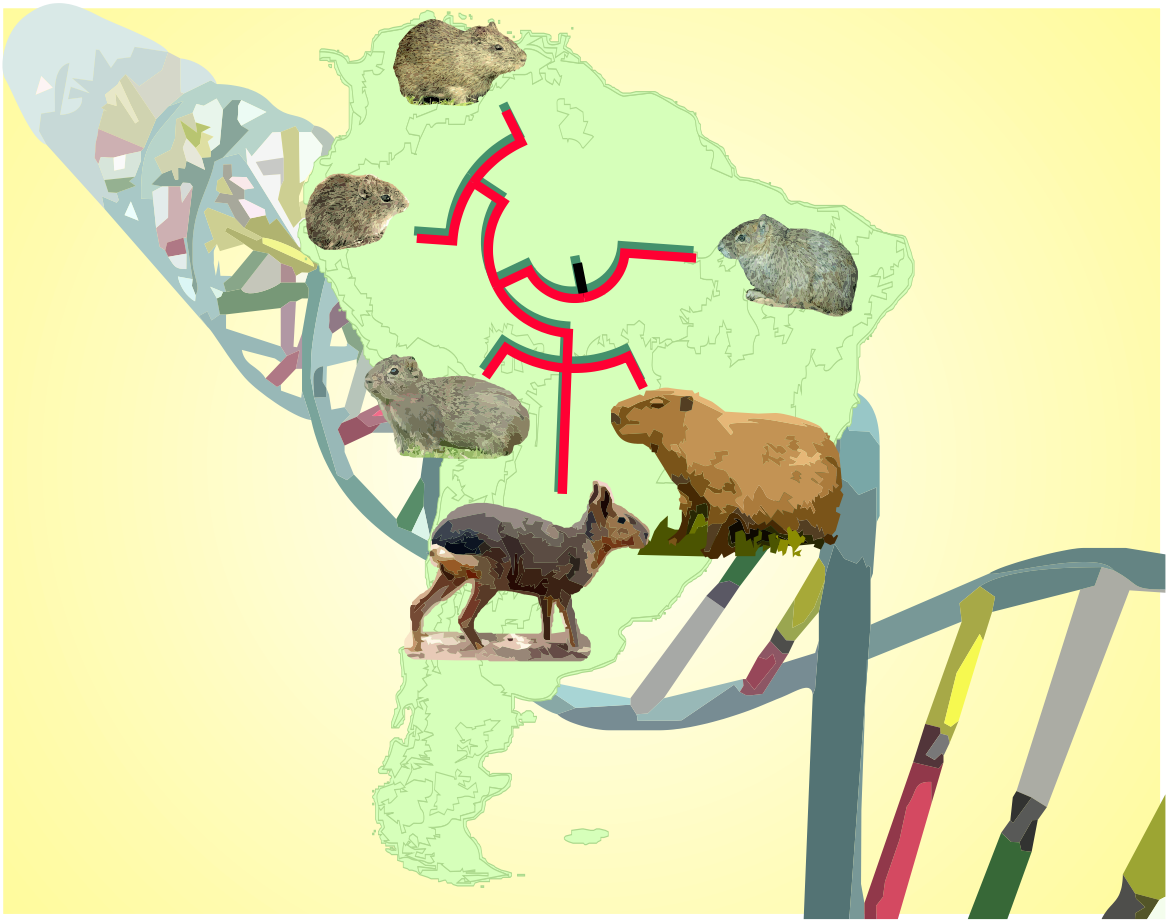
Año 2012

Universidad Nacional de la Patagonia, Facultad de Ciencias Naturales. CENPAT-CONICET. MEF.

Relaciones filogenéticas de los linajes vivientes de Cavioidea *sensu stricto* (Rodentia, Hystricognathi) sobre la base de nuevas secuencias de ADN

ALFREDO HOLLEY

Seminario final para optar por el título de Licenciado en Ciencias Biológicas



DIRECTORA: Dra. María E. PÉREZ

CO-DIRECTORA: Dra. Liza MARTINAZZO

PROFESOR ASESOR: Oc. José SARAVIA

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: ***la voluntad.***

Albert Einstein.

Dedicado a mis padres, Ana María y Gonzalo, y a la memoria de mi hermana, María Paula, que vivirá por siempre en nuestros corazones.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 3
INTRODUCCIÓN 5
ORDEN RODENTIA 5
Características generales 5
Características cráneo-mandibulares y dentarias 6
CAVIOMORPHA 7
Características, distribución y diversidad taxonómica 7
Erethizontoidea 9
Chinchilloidea 9
Octodontoidea 10
Cavioidea 10
RELACIONES FILOGENÉTICAS DE CAVIOIDEA 13
Antecedentes 13
OBJETIVOS 15
HIPÓTESIS 15
MATERIALES Y MÉTODOS 16
Extracción de ADN 16
Amplificación por PCR, purificación y secuenciación de ADN 16
Edición y alineamiento de secuencias 17
Análisis filogenéticos 19
Análisis adicionales 22
Ajuste al árbol de evidencia total 22
Saturación 22
Evaluación de caracteres y análisis sectorizado del gen ARNr 16s 24
RESULTADOS 25
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS 25
Análisis combinado 25
Nuevas secuencias de ADN 29
ANÁLISIS ADICIONALES 37
Ajuste al árbol de evidencia total 37

Saturación 37
Evaluación de caracteres y análisis sectorizado del gen ARNr 16s 41
DISCUSIÓN 44
ANÁLISIS COMBINADO 44
NUEVAS SECUENCIAS DE ADN 46
RAG-1: 46
ARNr 16s: 47
ANÁLISIS ADICIONALES: 47
CONCLUSIONES 49
AGRADECIMIENTOS 51
BIBLIOGRFÍA 53
APENDICE 1. Extracción y precipitación de ADN 59

RESUMEN

El Orden Rodentia constituye el grupo de mamíferos más diverso del planeta, con una gran variedad de modelos morfológicos y una amplia distribución. Dentro de éste se reconocen dos grupos biogeográficos bien definidos: Phiomorpha (roedores africanos o del "Viejo Mundo") y Caviomorpha (roedores sudamericanos o del "Nuevo Mundo"). Los roedores caviomorfos, que se extienden a lo largo de todo el Neotrópico, representan un grupo monofilético constituido por cuatro superfamilias: Erethizontoidea, Chinchilloidea, Octodontoidea y Cavioidea. Esta última superfamilia es probablemente el grupo más derivado dentro del Orden y está compuesto por cuatro familias vivientes: Dasyproctidae (agutíes), Cuniculidae (pacas), Hydrochoeridae (carpinchos) y Caviidae (maras y cuises). Así mismo dentro de éste se reconoce un grupo más exclusivo, que contiene a las familias vivientes Caviidae e Hydrochoeridae y a la familia extinta Eocardiidae, el mismo se designa como Cavioidea *sensu stricto* (Patterson & Wood, 1982).

En este trabajo se obtuvieron diez nuevas secuencias de ADN (cinco del gen mitocondrial ARNr 16s y cinco del gen nuclear RAG-1) a partir de cinco individuos de las especies *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Dolichotis patagonum*, *Galea musteloides*, *Cavia aperea* y *Microcavia australis*. Utilizando estas secuencias se analizaron las relaciones filogenéticas de los linajes vivientes de Cavioidea *s.s.* (Caviidae + Hydrochoeridae) y además se integraron las mismas en un análisis más amplio utilizando secuencias de los genes ARNr 12s, Citocromo B, TTH (gen de la transtiretina) y GHR (gen de la hormona de crecimiento) adquiridas de trabajos previos. Los resultados obtenidos en base a las nuevas secuencias de ADN indican: **Gen RAG-1**: 1) la familia Caviidae y la subfamilia Caviinae son grupos parafiléticos debido a la afinidad entre *Hydrochoerus hydrochaeris* (carpincho, familia Hydrochoeridae) y *Galea musteloides* (cuis, familia Caviidae, subfamilia Caviinae) y 2) las especies de cavinos *Microcavia australis* y *Cavia aperea* se encuentran fuertemente ligadas, ya que se agruparon con gran soporte en todos los análisis realizados. **Gen ARNr 16s:** 1) Caviidae y Caviinae son grupos parafiléticos, debido a la afinidad entre *Galea musteloides* y *Myoprocta pratti* (familia Dasyprotidae) y 2) la familia Hydrichoeridae está

más relacionada a la subfamilia Dolichotinae (maras, familia Caviidae) que a otros cávidos. Además el análisis de la **matriz combinada** (que reúne las secuencias de todos los genes mencionados) también indicó la parafilia de Caviidae, debido al robusto agrupamiento de Hydrochoeridae (*Hydrochoerus* + *Kerodon*) con Dolichotinae. Los resultados obtenidos a partir de esta matriz también sugieren la monofilia de Caviinae (*Cavia*, *Microcavia* y *Galea*). Estos resultados concuerdan con los presentados en estudios recientes, basados en aspectos morfológicos (de integrantes actuales y fósiles) y moleculares.

INTRODUCCIÓN

ORDEN RODENTIA

Características generales

Los roedores conforman el Orden de mamíferos euterios más numeroso, diverso y ampliamente distribuido del planeta. Sus integrantes componen un total de 29 familias, 443 géneros, y aproximadamente 2021 especies reconocidas (Wilson & Reeder, 1993, Adkins *et al.* 2001; Honeycutt *et al.* 2007), representando el 43,5% del total de la diversidad específica de los mamíferos vivientes (figura I). Su capacidad de dispersión y adaptabilidad ha posibilitado la invasión y asentamiento del grupo en múltiples ambientes de todos los continentes e islas continentales, a excepción de la Antártida. Presentan un rango de tamaños que abarca desde unos pocos centímetros y menos de 10 gramos, en el ratón pigmeo africano (*Mus minutoides*) hasta más de un metro de largo y más de 50 Kg de peso, en el capybara o carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Además, estos animales son capaces de aprovechar los recursos disponibles en múltiples tipos de nichos ecológicos:

- **Terrestres:** Estos ambientes son aprovechados por una gran variedad de especies de roedores cuadrúpedos, como las ardillas de tierra (ratas topo, familia Bathyergidae), cuises y maras (familia Caviidae); o bípedos saltadores como los jerbos (ratas canguro, familia Dipodidae) entre otros. Estos roedores se alimentan principalmente de raíces, tubérculos, frutos y pastos (Wood, 1966; Emmons, 1990).
- **Arbóreos:** Son ambientes aprovechados principalmente por ardillas y ardillas voladoras (familia Sciuridae) que han desarrollado piel en forma de membrana, uniendo las extremidades anteriores y posteriores, lo cual les permite planear de un árbol a otro (generalmente coníferas) en donde recogen los frutos secos u hojas o cazan insectos que posteriormente ingieren (Wood, 1966; Emmons, 1990).

- **Acuáticos:** Son ambientes aprovechados por castores (familia Castoridae), ratas almizcleras (familia Cricetidae), coipos (familia Myocastoridae) y carpinchos (familia Hydrochoeridae) que se alimentan principalmente de corteza de árboles, hojas, hierbas costeras, plantas acuáticas, frutos y peces (Wood, 1966; Emmons, 1990).

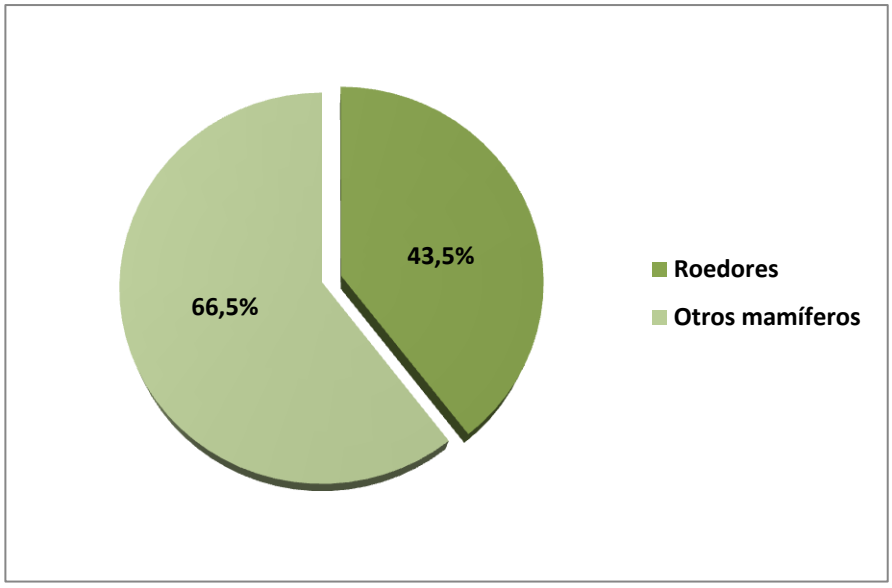


Figura I: Proporción de especies de Rodentia y otros grupos de mamíferos, según se indica en Wilson & Reeder (1993) y Honeycutt *et al.* (2007).

Características cráneo-mandibulares y dentarias

La dentición de los roedores se caracteriza por un único par de incisivos superiores e inferiores, que crecen continuamente durante toda la vida del animal. Debido a que el esmalte se deposita solo en la cara anterior del diente, el desgaste producido por la fricción entre los incisivos superiores e inferiores, remueve la dentina más blanda con mayor facilidad. De esta manera no solo se evita el crecimiento desmedido de los incisivos, sino que también se genera en los mismos un perfil filoso que los convierte en útiles herramientas. Detrás de los incisivos hay un gran espacio vacío (diastema) seguido de uno o dos premolares y generalmente tres molares superiores e inferiores. Los

patrones de dentición varían considerablemente dentro del grupo en cuanto a su complejidad, altura de sus coronas y grado de enraizamiento. Así se encuentran desde configuraciones muy sencillas como la de las ardillas, hasta muy complejas como la del carpincho (Wood, 1966; Emmons, 1990).

La mandíbula inferior de los roedores está adaptada para realizar un amplio repertorio de movimientos a través de un importante sistema muscular y estructuras óseas de soporte, que en los roedores vivientes han alcanzado un alto grado de evolución y complejidad. El más importante de estos músculos es el masetero, que se encuentra anclado al arco cigomático del cráneo y provee a estos animales las capacidades de roer y masticar. Durante la evolución de los roedores, este músculo llegó a conformar distintas configuraciones que se utilizan actualmente en la clasificación del grupo (Adkins *et al.* 2001). En este sentido el Orden Rodentia ha sido dividido en dos Subórdenes, nombrados por Tullberg (1899) como Hystricognathi y Sciurognathi (Wood, 1966). La condición histricognata consiste en el traslado lateral de la región angular de la mandíbula en relación con el alvéolo incisivo (Hoffstetter, 1975). Dentro del Suborden Hystricognathi existen dos grupos biogeográficos bien definidos: Phiomorpha (o roedores del Viejo Mundo, *sensu* Lavocat, 1973) y Caviomorpha (o roedores del Nuevo Mundo, *sensu* Wood, 1955) (figura II).

CAVIOMORPHA

Características, distribución y diversidad taxonómica

Caviomorpha es un grupo de roedores Hystricognathi muy diverso que se extiende a lo largo de toda la Región Neotropical, dominando diversos ambientes y mostrando un enorme abanico de estrategias adaptativas, tipos morfológicos, hábitos alimenticios y comportamientos sociales y reproductivos. Sus integrantes se caracterizan por presentar un cráneo relativamente grande, orejas pequeñas, y algunos miembros tienen pelaje erizado. Además, el cráneo presenta un foramen infraorbital expandido a través del cual se extiende una rama del músculo masetero, que se origina en la fosa masetérica rostral (Wood, 1966; Emmons, 1990).

El registro más antiguo de roedores caviomorfos proviene de la Formación Yahuarango (Perú) que data de fines del Eoceno medio, con una edad aproximada de 43 millones de años. Esto indicaría que la radiación de los caviomorfos en América del Sur debió iniciarse al menos a comienzos de este periodo, hace aproximadamente 46 millones de años (Antoine *et al.* 2011).

A pesar de que las relaciones dentro de Caviomorpha son conflictivas, presumiblemente debido a un proceso de radiación acelerado (Flynn & Wyss, 1998; Huchon & Douzery, 2001) estudios filogenéticos realizados sobre la base de caracteres morfológicos, serológicos y moleculares, indican con buen soporte que el grupo es monofilético. Dentro de Caviomorpha se reconocen cuatro clados bien definidos, las superfamilias: Erethizontoidea (puerco espines del nuevo mundo), Octodontoidea (ratas espinosas, coruros, coipos, ratas chinchillas y hutías), Chinchilloidea (chinchillas, vizcachas y pacaranas) y Cavioidea (agutíes, cuises, maras, mocós y capybaras) (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982; Honeycutt *et al.* 2007) (figura II).

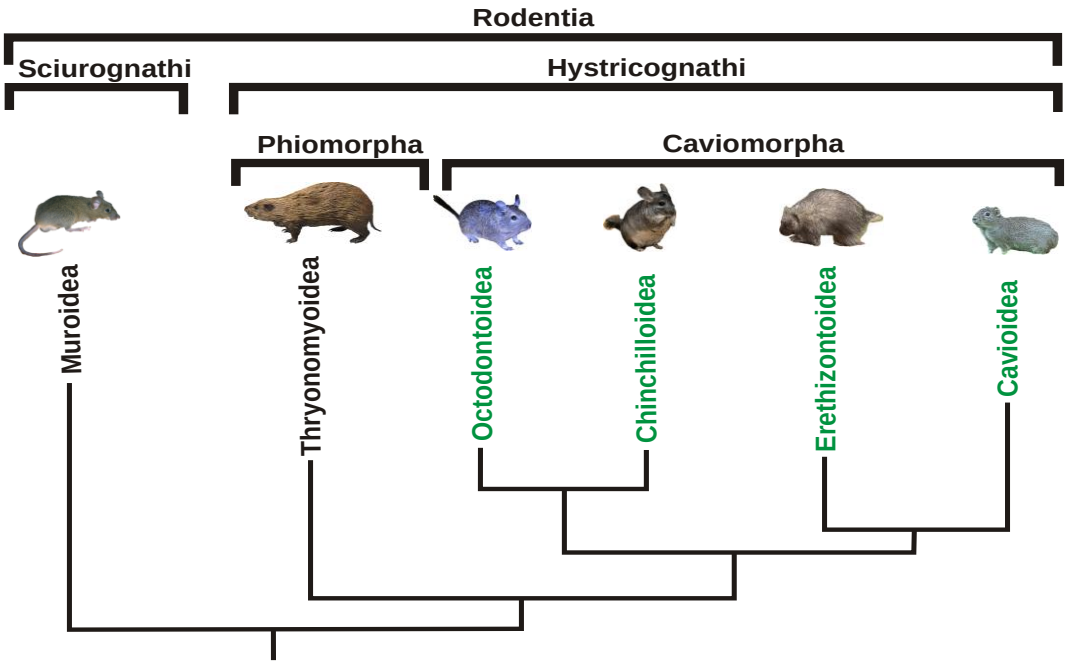


Figura II: Relaciones filogenéticas de los grandes grupos de roedores. En verde, las cuatro superfamilias que componen Caviomorpha (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982; Honeycutt *et al.* 2007).

Erethizontoidea

Esta superfamilia incluye una única familia viviente, Erethizontidae, donde sus integrantes presentan modificaciones esqueletales, producto de una adaptación a la vida arbórea; el pulgar es reemplazado por una almohadilla móvil y las plantas de las patas traseras están ensanchadas. El pelaje dorsal se convirtió en espinas, que presentan barbas y son utilizadas para la defensa contra predadores. Algunas especies han desarrollado cola prensil. Actualmente existen tres géneros de esta familia que se extienden desde el Sur de México hasta el Norte de Argentina y desde el Oeste de Colombia hasta el Este de Brasil (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982; Eisenberg, 1989; Redford & Eisenberg, 1992).

Chinchilloidea

Esta superfamilia presenta dos familias vivientes, Chinchillidae y Dinomyidae. Los chinchíllidos incluyen tres géneros y el aspecto general de algunos de sus integrantes recuerda al de los conejos pero con orejas más reducidas; en tanto que otros se asemejan a las ardillas de tierra norteamericanas. Su cola está recubierta de piel y presentan reducciones en los dedos de las patas traseras. Son roedores de hábitos coloniales, algunos con mayor actividad por la noche y se los encuentra principalmente en regiones montañosas. Sin embargo algunas especies se han adaptado a la vida en tierras bajas. Su distribución en América del Sur va desde el Centro de la Patagonia argentina, hasta el Sur de Ecuador siguiendo la cadena montañosa de los Andes; y desde el Norte de la Patagonia argentina hasta el Noreste argentino, atravesando las llanuras de la región pampeana (Wood, 1966; Redford & Eisenberg, 1992). La familia Dinomyidae presenta una única especie viviente, *Dinomys branickii*, que habita en bosques tropicales de laderas de baja altitud en los Andes de Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y regiones elevadas de la selva amazónica de Brasil. Es un roedor de tamaño medio cuyo aspecto general recuerda al de la marmota (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982).

Octodontoidea

Esta superfamilia es la más diversa de Caviomorpha. Cuenta con cuatro familias vivientes y su distribución abarca prácticamente toda América del Sur. Los integrantes de estas familias están adaptados a distintos ambientes y presentan diferencias morfológicas marcadas. La familia Octodontidae incluye formas similares a ratones y se distribuye en zonas de cordillera y precordillera de Argentina y Chile, en latitudes sur. La familia Echimiydae incluye formas parecidas a ratas con el pelaje erizados o espinoso y se distribuye en diversas regiones, especialmente en zonas tropicales al norte de Argentina y hasta Centro América. La familia Capromyidae incluye formas similares a los cuises, que habitan en zonas tropicales de Brasil, Argentina y Chile. La familia Abrocomidae incluye formas con similitudes compartidas entre ratas y chinchillas, y se distribuye principalmente a lo largo de la Cordillera de los Andes (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982).

Cavioidea

Es la superfamilia más divergente dentro de Caviomorpha y probablemente uno de los grupos más derivados entre los roedores en general, ya que presenta caracteres exclusivos dentro del Orden como por ejemplo, el hecho de ser digitígrados (Kraglievich, 1930). Sus integrantes han colonizado una gran variedad de ambientes en casi todas las latitudes del Neotrópico.

Desde el punto de vista taxonómico tradicional Cavioidea está compuesta por cuatro familias vivientes:

- Dasyproctidae: Esta familia incluye a los agutíes, que habitan desde el Sur de México hasta el Norte de Argentina y Uruguay. Su tamaño se aproxima al de los conejos grandes, tienen colas cortas, cuatro dedos en las patas delanteras y tres dedos en las patas traseras, son corredores activos y generalmente presentan hábitos diurnos (Eisenberg, 1989; Redford & Eisenberg, 1992).

- Cuniculidae: Esta familia incluye un género con dos especies de roedores de gran tamaño conocidos como pacas, que se distribuyen desde el Sur de México hasta el Norte de Argentina, siempre en regiones de llanura. Su pelaje dorsal es marrón, presentan cuatro dedos tanto en las patas traseras como delanteras y una característica morfológica distintiva de esta familia es la presencia de una gran placa estriada en el arco zigomático (Eisenberg, 1989; Redford & Eisenberg, 1992).
- Hydrochoeridae: En esta familia se encuentra el roedor viviente más grande del mundo, *Hydrochoerus hydrochaeris* comunmente conocido como carpincho o capybara. Este cavioideo tiene hábitos semiacuáticos, habita desde Panamá hasta el Norte de Argentina. Tiene cuatro dedos en sus patas delanteras y tres en las traseras. Además presenta una dentición compleja que lo distingue del resto de las familias dentro de Cavioidea (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982; Eisenberg, 1989; Redford & Eisenberg, 1992). Una segunda especie, *Hydrochoerus isthmius* es de menor tamaño que *H. hydrochaeris* y su distribución geográfica se encuentra restringida al Este de Panamá, Noroeste de Colombia y Este de Venezuela (Woods & Kilpatric, 2005).
- Caviidae: Esta familia, que incluye a los roedores conocidos como maras y cuises, representa uno de los grupos de Hystricognathi mas diversificados. Incluye géneros de pequeño tamaño, como por ejemplo *Galea*, hasta otros de tamaño medio a grande, como *Dolichotis*. La distribución de esta familia es discontinua en el Norte de América del Sur, sin embargo el grupo cubre casi todo el continente, excepto el extremo Este de Brasil y regiones extremadamente áridas del Sur de Perú y Chile. En la morfología general de sus integrantes, se destaca la ausencia (o reducción extrema) de cola y pérdida de dedos laterales en las patas traseras. Sus molares son prismáticos y crecen constantemente, en tanto que la mandíbula inferior muestra el menor grado de condición histricognata dentro de este

Suborden (Wood, 1966; Mares & Ojeda, 1982; Eisenberg, 1989; Redford & Eisenberg, 1992).

No obstante esta clasificación, Patterson y Wood (1982) definen a Cavioidea en sentido estricto (*sensu stricto*, *s.s.*) como un grupo más exclusivo integrado por la familia extinta Eocardiidae y las familias vivientes Caviidae e Hydrochoeridae, cuya distribución conjunta en Sudamérica abarca casi toda la región (figura III).

Figura III: Distribución geográfica de las familias Caviidae e Hydrochoeridae (linajes vivientes de Cavioidea *s.s.*) en América del Sur, según se indica en Mares & Ojeda (1982), Eisenberg (1989) y Redford & Eisenberg (1992).

RELACIONES FILOGENÉTICAS DE CAVIOIDEA

Antecedentes

Las cuatro familias vivientes que integran Cavioidea (*sensu lato*) forman un grupo monofilético (Nedbal *et al.* 1996) donde según la visión tradicional, basada en aspectos morfológicos de caviomorfos actuales y fósiles, la familia Caviidae contiene dos subfamilias bien definidas, Caviinae, que contiene a los géneros *Cavia*, *Galea*, *Microcavia* y *Kerodon*; y Dolichotinae, que contiene al género *Dolichotis* (Kraglievich, 1932; Cabrera, 1961; Quintana, 1998; da Silva Neto, 2000) (figura IV-A). Nuevos estudios de Cavioidea *s.s.*, realizados sobre la base de datos morfológicos y paleontológicos (Pérez, 2010) sugieren relaciones de afinidad entre *Kerodon* e *Hydrochoerus*, con lo cual bajo el punto de vista tradicional se indicaría la parafilia de Caviinae (figura IV-B). Estos resultados apoyan parcialmente los obtenidos en estudios previos, donde utilizando datos moleculares (Rowe & Honeycutt, 2002; Opazo, 2005; Honeycutt *et al.* 2007) se observó el agrupamiento (con gran soporte) de *Kerodon* e *Hydrochoerus* y este clado aparece como grupo hermano de Dolichotinae (figura IV-C).

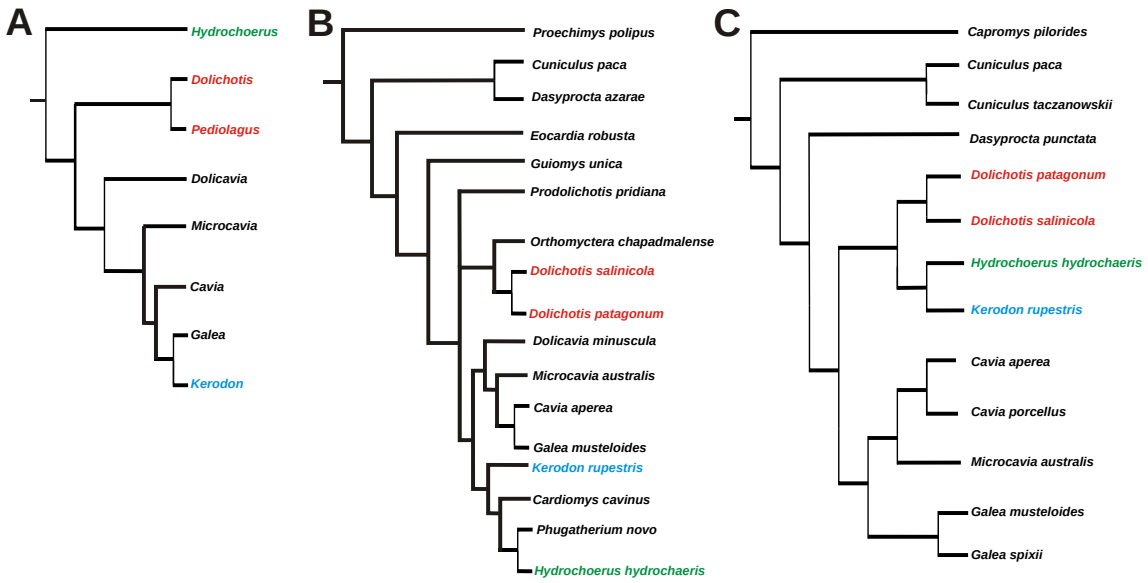


Figura IV: Filogenias de Cavioidea basadas en datos moleculares y morfológicos de roedores actuales y fósiles, con variaciones en la posición de *Kerodon* (celeste), *Hydrochoerus* (verde) y Dolichotinae (rojo). A: Morfología (Quintana, 1998). B: Morfología (Pérez, 2010). C: Gen ARNr 12s (Rowe & Honeycutt, 2002).

A la luz de la evidencia de estos estudios tanto a nivel morfológico como a nivel molecular se reconocen tres linajes principales para Caviidae e Hydrochoeridae: Caviinae (cuises), Dolichotinae (maras) e Hydrochoeridae (carpinchos y mocós) (Rowe & Honeycutt, 2002; Opazo, 2005; Honeycutt *et al.* 2007; Pérez, 2010). En dichos estudios, basados en datos moleculares, se han utilizado dos genes nucleares (GHR y TTH) y un gen mitocondrial (ARNr 12s); en tanto que en otros estudios con diferentes muestreos taxonómicos se han utilizado genes nucleares como el del factor de von Willebrand (vWF) y el gen de la insulina, o genes mitocondriales como el citocromo B (CytB) (Huchon & Douzery, 2001; Jenkins *et al.* 2005; Opazo *et al.* 2005). De esta manera, sobre la base de la estrecha afinidad de *Kerodon* con *Hydrochoerus* puesta de manifiesto, la taxonomía supragenérica sugerida es la siguiente:

Familia Caviidae:

Subfamilia Dolichotinae: género *Dolichotis*

Subfamilia Caviinae: géneros *Cavia*, *Galea* y *Microcavia*

Familia Hydrochoeridae: géneros *Hydrochoerus* y *Kerodon*.

Hasta el momento no se han publicado trabajos en los que se realice un análisis filogenético de la superfamilia Cavioidea *s.s.*, utilizando matrices moleculares obtenidas a partir de los genes ARNr 16s y RAG-1. Sin embargo estos genes han sido utilizados con anterioridad individualmente, asociados a otros genes, o aplicados al estudio de otros grupos de roedores (Trillmich *et al*. 2004, Patterson & Velazco 2008).

El gen ARNr 16s es un gen mitocondrial de aproximadamente 1400 pares de bases, que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal y es utilizado ampliamente en la actualidad en estudios filogenéticos en distintos grupos de organismos. En tanto que el gen RAG-1 (Recombination Activating Gene) es un gen nuclear que codifica una de las enzimas que producen el reordenamiento y recombinación del cluster de genes de las inmunoglobulinas y el receptor de membrana de linfocitos T.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes de estudios filogenéticos realizados, para Cavioidea *s.s.*, utilizando datos moleculares y el aporte de la información obtenida a partir de nuevas secuencias de ADN, de los genes ARNr 16s y RAG-1, en este trabajo de seminario se proponen como objetivos:

1. Poner a prueba la monofilia de Caviidae.
2. Poner a prueba la monofilia de la subfamilia Caviinae (*Cavia*, *Microcavia* y *Galea*).
3. Poner a prueba las relaciones dentro de Caviinae.
4. Determinar si Caviinae es grupo hermano de Hydrochoeridae o si por el contrario, Dolichotinae es grupo hermano de Hydrochoeridae.

HIPÓTESIS

En base a los resultados obtenidos en estudios previos realizados sobre caracteres morfológicos y moleculares de roedores caviomorfos se postulan las siguientes hipótesis para Cavioidea *s.s.*:

1. La familia Caviidae no es monofilética.
2. La subfamilia Caviinae (*Cavia*, *Microcavia* y *Galea*) es monofilética.
3. *Microcavia* y *Cavia* son grupos hermanos, mientras que *Galea* se encuentra en una posición más basal.
4. Dolichotinae e Hydrochoeridae son grupos hermanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido fresco de músculo o hígado, de cinco especímenes pertenecientes a las especies: *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Dolichotis patagonum*, *Galea musteloides*, *Cavia aperea* y *Microcavia australis*; se realizó la extracción de ADN siguiendo un protocolo (Apéndice 1) adaptado de Sambrook & Russell (2001). Para comprobar si la extracción de ADN fue efectiva, se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El producto de extracción fue visualizado con luz ultravioleta en un transiluminador Vilber Lourmat.

El material colectado y los tejidos utilizados en este trabajo se encuentran depositados en la Colección de Mamíferos del Centro Nacional Patagónico de Puerto Madryn (CNP).

Amplificación por PCR, purificación y secuenciación de ADN

Las reacciones de amplificación para los genes ARNr 16s y RAG-1 (25 µL) fueron preparadas con 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM MgCl2; 0,3 µM de cada primer (detallados en la tabla 1); 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y aproximadamente 50 ng de ADN genómico, cuantificado a partir de la comparación de la intensidad de la banda obtenida en un gel de agarosa al 1% con las mismas para un marcador de peso molecular, de concentraciones conocidas. El marcador de peso molecular utilizado en este estudio fue el Mass Ruler* DNA Ladder Low Range-100 bp (Fermentas*) y el volumen de ADN genómico utilizado fue de 5 µl. Las condiciones para llevar adelante las reacciones de PCR se determinaron usando un protocolo modificado del descrito en Patterson & Velazco (2008). El mismo comienza con una desnaturalización inicial a 94º C por 5 min, seguida de 40 ciclos de: 94º C por 45 s, 52º C por 45 s (unión de primers al ADN molde) y 72º C por 1 min (polimerización de ADN complementario); la extensión final se realizó a 72º C por 4 min. Los productos de PCR se

visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se purificaron utilizando el kit Geneclean III (MP Biomedicals). En los casos en que se detectó ADN inespecífico, las bandas de interés se cortaron con bisturí bajo luz ultravioleta y se purificaron siguiendo el protocolo establecido en el kit Wizard SV Gel (Promega). De este modo se eliminó el ADN inespecífico y se obtuvo ADN molde purificado, asegurando la eficiencia de las reacciones de secuenciación. Cada reacción de secuenciación fue realizada usando el protocolo estándar de Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.). Se secuenciaron las dos hebras de ADN para cada gen con el fin de corroborar la calidad de las secuencias.

Tabla 1: Detalle de los primers utilizados para las reacciones de PCR y secuenciación en este trabajo.

Primers	Secuencias	Fuente	Genes	Genoma
16L11**	5'-AGTACCGCAAGGGAAAGATGAAA-3'	Trillmich *et al*. (2004)	ARNr 16s	Mitocondrial
16H10**	5'-AACAAGTGATTATGCTACCTTTGCAC-3'	Trillmich *et al*. (2004)		
16L9**	5'-CGCCTGTTTACCAAAAACATCACCT-3'	Trillmich *et al*. (2004)		
16H12**	5'-GAAGTGTTAAGGAGAGGAGTTGAA-3'	Trillmich *et al*. (2004)		
RAG1F1705**	5'-GCTTTGATGGACATGGAAGAAGACAT-3′	Patterson & Velazco (2008)	RAG-1	Nuclear
FMNH1b*	5'-CTTGAAGGTCCTGGGRATGCCTCCC-3′	Patterson & Velazco (2008)		
FMNH2a*	5'-GAGAGGGAAGCCATGAAGAGCAGYGA-3′	Patterson & Velazco (2008)		
RAG1R2864**	5'-GAGCCATCCCTCTCAATAATTTCAGG-3′	Patterson & Velazco (2008)		

* Primers utilizados solo para reacciones de secuenciación. ** Primers utilizados para reacciones de PCR y secuenciación.

Edición y alineamiento de secuencias

El ensamble de las dos hebras de ADN secuenciadas se llevó a cabo mediante el análisis de los cromatogramas utilizando el programa DNA Baser v.3 (Heracle BioSoft, Pitesti, Romania).

La matriz del gen ARNr 16s fue completada con secuencias de dos taxones adicionales, *Myprocta pratti* (familia Dasyproctidae, superfamilia Cavioidea) y *Capromys pilorides* (familia Capromyidae, superfamilia Octodontoidea). En tanto que en la matriz del gen RAG-1 solo se incorporó una secuencia del taxón *C. pilorides.* Estas secuencias, al igual

que las utilizadas para la construcción de la matriz del gen CytB, se obtuvieron de GenBank. Por su parte las matrices alineadas de los genes ARNr 12s, TTH y GHR fueron descargadas desde la base de datos EMBL-Align, según se indica en Rowe & Honeycutt (2002).

Los alineamientos de las secuencias se realizaron a partir de los programas BioEdit versión 7.1.3.0 (Hall, 1999) y ClustalX2 (Larkin *et al.* 2007) con sus parámetros por default y luego estos alineamientos se recortaron en sus extremos para evitar el exceso de gaps insertados en estas regiones durante el proceso (*leading* y *training gaps*). En la tabla 2, se muestra el detalle del total de taxones y genes utilizados en los análisis filogenéticos, así como el número de columnas en los alineamientos finales (longitud).

Para cada una de las matrices se utilizó al taxón *C. pilorides* como grupo de enraizamiento y el resto de los taxones que no pertenecen a Cavioidea *s.s.* se consideran grupos externos (ver tabla 2).

Tabla 2: Detalle de los taxones y genes utilizados en este estudio.

Taxones	ARNr 16s/nº de GB	RAG-1/nº de GB	CytB/nº de GB	GHR	TTH	ARNr 12s
Capromys pilorides	GB/ AF422882.1	GB/ JN414954.1	GB/ AF422915.1	EM	EM	EM
Dasyprocta punctata	SD	SD	SD	EM	EM	EM
Cuniculus paca	SD	SD	SD	EM	EM	EM
Cuniculus taczanowskii	SD	SD	SD	EM	EM	EM
Myoprocta pratti	GB/ AF422880.1	SD	SD	SD	SD	SD
Cavia aperea	EE	EE	GB/ GU136759.1	EM	EM	EM
Cavia porcellus	SD	SD	GB/ GU136733.1	EM	EM	EM
Dolichotis patagonum	EE	EE	GB/ GU136724.1	EM	EM	EM
Dolichotis salinicola	SD	SD	GB/ GU136723.1	EM	EM	EM
Galea musteloides	EE	EE	GB/ GU082485.1	EM	EM	EM
Galea spixii	SD	SD	GB/ GU067492.1	EM	EM	EM
Hydrochoerus hydrochaeris	EE	EE	GB/ GU136721.1	EM	EM	EM
Kerodon rupestris	SD	SD	GB/ GU136722.1	EM	EM	EM
Microcavia australis	EE	EE	GB/ AF491750.1	EM	EM	EM
Longitud (pb)	520	594	1128	763	915	763

SD: sin datos para ese taxón y ese gen. **EE**: secuencia obtenida en este estudio. **GB**: secuencia obtenida de GenBank. **EM**: secuencia perteneciente a la matriz alineada, obtenida de la base de datos EMBL-Align, como se indica en Rowe & Honeycutt (2002). **pb**: pares de bases. En rojo se indican los taxones pertenecientes a Cavioidea *s.s.*

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se efectuaron considerando tres métodos diferentes, que se aplicaron sobre las matrices de secuencias de cada uno de los genes secuenciados en este estudio (RAG-1 y ARNr 16s) y una matriz combinada, que contiene secuencias de los genes nucleares GHR, TTH y RAG-1; y los genes mitocondriales CytB, ARNr 12s y ARNr 16s (tabla 2).

Los gaps se tomaron como quinto estado en la matriz del gen nuclear RAG-1 y como datos faltantes (*missing data*) en la matriz del gen mitocondrial ARNr 16s. Esta decisión se fundamenta en que la probabilidad de ocurrencia de un evento de inserción o deleción (INDEL) es mucho mayor en genes nucleares que en genes mitocondriales, debido a procesos biológicos que se dan durante la división celular e involucran a los cromosomas nucleares (i. e. entrecruzamientos desiguales en la meiosis y translocación de ADN entre cromosomas). Por su parte los cromosomas mitocondriales son circulares, de tamaño mucho menor y no sufren entrecruzamientos. Además los genes mitocondriales son mucho más variables que los genes nucleares, con lo cual la probabilidad de lectura incorrecta de un nucleótido en una posición determinada (i. e. observación de múltiples picos en un cromatograma para esa posición) es mayor en éstos y por tanto son más proclives a generar gaps (en forma de datos faltantes) durante el proceso de alineamiento (Carroll *et al.* 2006).

La concatenación de las secuencias para confeccionar la matriz combinada se llevó a cabo usando el programa SequenceMatrix 1.7.8 (Vaidya *et al.* 2011).

Análisis de máxima parsimonia: Se realizó siguiendo los principios metodológicos del cladismo (Hennig, 1968; Farris, 1983). Esta metodología propone que los taxones se reconocen a través de caracteres derivados compartidos (sinapomorfías) y que los organismos se agrupan naturalmente en grupos monofiléticos. El cladismo utiliza el criterio de máxima parsimonia para hallar las homologías entre los distintos caracteres de los taxones, con el fin de establecer ancestralidad común. El principio de máxima parsimonia sostiene que cuando existen dos o más hipótesis se debe escoger aquella más

simple y que posea menor cantidad de inferencias *ad hoc* de convergencias, paralelismos o reversiones (Farris, 1983; Kitching *et al.* 1998).

Se realizó una búsqueda heurística de las hipótesis filogenéticas más parsimoniosas utilizando la función New Technology search del programa TNT versión 1.1 (Goloboff et al. 2008 a, b) donde se ajustó el parámetro *find min. length* (hallar el árbol más corto) en 50 veces como medida para prevenir que el algoritmo halle óptimos locales y se seleccionó a *C. pilorides* como grupo raíz (comandos: `outgroup Capromys pilorides; xmult = hits 50`). El resto de los parámetros se mantuvieron por default. Adicionalmente se calcularon valores de soportes para las filogenias halladas. Estos consisten en determinar la robustez de una hipótesis filogenética, considerando la evidencia en contra de la misma (i. e. caracteres que no soportan las ubicaciones de determinados taxones en los árboles óptimos). Así, se determinaron los valores de soportes de bootstrap (Felsteitein, 1985) para frecuencias absolutas sobre la matriz de caracteres, utilizando 1.000 réplicas y colapsando nodos con soportes menores a 50 (default) (comandos: `resample = boot freq re 1000`). También se calcularon los valores de soporte de Bremer (Bremer, 1994) basados en la determinación de la cantidad de pasos adicionales que tiene el árbol sub-óptimo en el cual se rompe la monofilia de un determinado nodo. Por último se determinaron los índices de consistencia y retención (Kluge & Farris, 1969; Farris, 1989) que indican el nivel de homoplasia presente en una filogenia. Tanto los valores de soporte de Bremer como los índices de consistencia y retención fueron calculados corriendo en TNT scripts a los efectos mediante la instrucción `run "nombre de script".run`. Dichos scripts se encuentran disponibles en el sitio web http://tnt.insectmuseum.org/index.php/Scripts.

Análisis de máxima verosimilitud: Se realizó una búsqueda de la topología que maximice el ajuste a la matriz de datos, bajo un modelo evolutivo determinado. A tal efecto se utilizó el programa PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 1999) ajustando el criterio de búsqueda en likelihood y realizando una búsqueda heurística mediante 100 réplicas, con corte y reconexión de ramas como algoritmo de optimización (default). Además se seleccionó a *C. pilorides* como grupo raíz y monofilia como criterio de enraizamiento

(comandos: `set cri = like; hsearch /addseq = rand nreps = 100; outgroup Capromys pilorides; roottrees/outroot = monophyl`). Luego se calcularon los valores de soporte de bootstrap para frecuencias absolutas, realizando 100 réplicas y colapsando nodos con valores menores a 50 (default) (comandos: `boot nreps = 100`).

Análisis Bayesiano: Usando el programa MrBayes versión 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) se realizaron dos corridas independientes con cuatro Cadenas de Markov (una cadena fría y tres cadenas calientes) (default) y 1.000.000 (un millón) de generaciones, con una frecuencia de muestreo de la topología generada igual a 10 (comandos: `mcmc Ngen = 1.000.000 Samplefreq = 10 Nruns = 2 Nchains = 4`). El número de muestras descartadas al comienzo del análisis (burnin) se mantuvo por default, el mismo representa el 25% de las muestras (`burninfrac = 0.25`). Además se seleccionó a *C. pilorides* como grupo raíz (comando: `outgroup Capromys pilorides`). Este análisis finalizó cuando el valor del desvío estándar de la media del cociente entre el likelihood de las topologías halladas en las corridas 1 y 2 (LnL_1/LnL_2) fue menor a 0,01 (manual de usuario de MrBayes versión 3.2). Este valor indica que ambas corridas convergen en una distribución estacionaria y no hay diferencias significativas entre las filogenias muestreadas. Sin embargo se evaluó convergencia y autocorrelación para ambas corridas graficando los valores del likelihood de las topologías obtenidas a lo largo de las primeras 1000 generaciones muestreadas. Posteriormente, usando las topologías calculadas por una de las corridas se determinó el árbol de máxima probabilidad posterior usando el programa TreeAnnotator v1.7.1 del paquete BEAST (Drummond & Rambaut, 2007).

Modelos evolutivos: Los modelos evolutivos que mejor se ajustaron a cada matriz de secuencias se determinaron con el programa MrModeltest versión 2.3 (Nylander, 2004) utilizando el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike, 1983) para la selección del modelo.

Análisis adicionales

Ajuste al árbol de evidencia total

Se aplicó el método de evaluación de ajuste de particiones a un árbol de evidencia total (Jones, 2007; Salgado-Salazar *et al*. 2010). A partir de la matriz combinada se determinó un árbol de evidencia total (AET) que posteriormente se utilizó para evaluar la incidencia (peso) de cada gen (partición) en dicha matriz. El AET utilizado se obtuvo de los análisis filogenéticos realizados mediante los tres métodos de búsqueda antes descriptos. Así, usando el programa TNT, se leyó cada partición por separado y el AET, y se calcularon los índices de consistencia y retención para cada caso. Además se determinó la cantidad de sitios informativos de cada matriz mediante un script de TNT a cargo del Dr. Leandro Jones.

Saturación

Las matrices de datos moleculares son sensibles al problema de la saturación. En este sentido se reconoce que cuando la velocidad con la que ocurren las sustituciones nucleotídicas (tasa de sustitución) es alta, se produce una pérdida de información filogenética y por consiguiente se puede llegar a conclusiones equivocadas sobre las relaciones de afinidad de un grupo de organismos basadas en una topología incorrecta (Lopez *et al.* 1999). Los genes mitocondriales son más susceptibles a este problema dado que, en general, presentan tasas de sustitución mayores que las observadas para genes nucleares. Sin embargo en este trabajo se testeó la presencia de saturación tanto para matrices nucleares como mitocondriales. Este objetivo se llevó a cabo por análisis gráfico y estadístico. El análisis gráfico consistió en plotear las tasas de transiciones y transversiones vs. la distancia genética. Estos valores se obtuvieron a partir del programa DAMBE versión 5.2.76 (Xia & Lemey, 2009), y fueron leídos por una rutina escrita en lenguaje estadístico R (R Development Core Team, 2010) que se desarrolló durante este seminario. Adicionalmente se evaluó la linealidad de cada set de datos mediante una regresión lineal.

El test estadístico utilizado para medir niveles de saturación se basa en el cálculo de las proporciones nucleotídicas para secuencias con tasas de sustituciones normales y las mismas para secuencias totalmente saturadas de sustituciones. Estas proporciones determinan un grado de entropía (H), entonces se define un índice a partir del cociente entre el nivel medio de entropía para secuencias normales y el mismo esperado para secuencias con saturación severa:

$$Iss = (H_{medio}/H_{FSS}) \qquad (1)$$

La ecuación 1 muestra los términos para el cálculo del índice de saturación, donde Iss: índice saturación, H_{medio}: nivel medio de entropía para secuencias con tasas de sustituciones nucleotídicas normales, H_{FSS}: nivel de entropía esperado para secuencias totalmente saturadas. Así, Iss adopta valores que van de 0 a 1 y cuanto más se acerca el mismo al valor 1 para una matriz de secuencias, mayor es el nivel de saturación de la misma. Sin embargo es posible que una matriz de secuencias pierda información filogenética (i. e. resulte en topologías incorrectas) antes de que Iss se aproxime al valor 1. Es por esto que se considera un segundo índice (Iss.c) como punto de corte para establecer la utilidad de una matriz de secuencias en un análisis filogenético. Según Xia *et al.* (2003), el valor que adopta este índice podría depender de la topología del árbol verdadero, del número de OTUs, de la longitud de las secuencias, de las frecuencias nucleotídicas y de la tasa de transición/transversión. La regla de decisión del test estadístico basado en estos índices es: si Iss.c es mayor que Iss la matriz es útil para realizar un análisis filogenético aún si ésta presenta saturación (i. e. Iss próximo a 1). Este procedimiento se realizó con el programa DAMBE versión 5.2.76 (Xia & Lemey, 2009).

Para el cálculo del índice estadístico, en este seminario, se indicó en cada caso la proporción de sitios invariables (calculada con MrModeltest) y se consideraron los gaps como estado desconocido. Además se consideró un rango para el grado de saturación, basado en los valores de Iss, como sigue: i) Bajo: 0 - 0,33; ii) Medio: 0,34 - 0,66; iii) Alto: 0,67 - 1.

Evaluación de caracteres y análisis sectorizado del gen ARNr 16s

Se utilizó un script de TNT, desarrollado por el Dr. Diego Pol, el cual dadas dos topologías, registra cuales caracteres de una matriz apoyan a una u otra topología. Se utilizaron como archivos de entrada (inputs) de esta rutina: i) la matriz del gen ARNr 16s; ii) el árbol de máxima parsimonia obtenido a partir de la matriz ARNr 16s ("árbol actual") y iii) el "árbol esperado" generado a partir de los taxones presentes en la matriz del gen ARNr 16s y de los antecedentes filogenéticos de Cavioidea *s.s*. Los resultados obtenidos a partir de este análisis se representaron en un gráfico construido a partir de funciones de densidad de probabilidad aplicadas a las distribuciones de caracteres de ambas topologías.

Adicionalmente, se realizó un análisis sectorizado sobre la matriz del gen ARNr 16s. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el método BootScan (Salminen *et al.* 1995) del programa SimPlot versión 3.5.1. En el mismo se selecciona una secuencia determinada (secuencia problema) y el algoritmo recorre el alineamiento mediante ventanas superponibles, realiza un análisis filogenético y registra el valor de bootstrap que soporta el nodo del clado que contiene a la secuencia problema en cada ventana. En cada caso indica cuál es el taxón que se encuentra como grupo hermano de la secuencia problema. Por último entrega una salida gráfica donde se muestran los valores de bootstrap para cada ventana analizada en la matriz. En este trabajo se ajustó un ancho de ventana de 20 pares de bases (pb) y un paso de 5 pb, y se seleccionó a *Myoprocta pratti* como secuencia problema. El resto de los parámetros se mantuvieron en default.

RESULTADOS

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Análisis combinado

Sobre la base de la matriz combinada, que contiene las secuencias de los tres genes mitocondriales (ARNr 12s, ARNr 16s y CytB) y los tres genes nucleares (GHR, TTH y RAG-1) se realizaron análisis filogenéticos siguiendo las tres diferentes metodologías explicadas en la sección anterior (Materiales y Métodos). A continuación se explican los resultados de cada análisis.

Máxima parsimonia: Mediante el análisis de máxima parsimonia se halló un total de cinco árboles más parsimoniosos, de 2.924 pasos cada uno (Índice de Consistencia, CI = 0,73; Índice de Retención, RI = 0,53). A partir de éstos se halló un árbol de consenso estricto (figura 1) que muestra una politomía de grado 5, donde una de las ramas conforma el clado Cavioidea *s.s.* (Caviidae + Hydrochoeridae) y en las otras cuatro se ubican los taxones tomados como grupos externos, pertenecientes a las familias Cuniculidae y Dasyproctidae.

En el consenso estricto (figura 1) se corrobora la monofilia de Cavioidea *s.s.* con valores de soporte moderados (bootstrap = 64, bremer = 3; nodo A) y dentro de este grupo se identifican dos clados principales. El más basal, corresponde a las dos especies de *Galea* (*G. musteloides* y *G. spixii*) que forman un grupo monofilético (bootstrap = 72, bremer = 3; nodo B). En el siguiente clado (nodo C, bootstrap = 82, bremer = 9) se reconoce con altos valores de soporte (bootstrap = 88, bremer = 14) el nodo conformado por *Cavia* (*C. porcellus* + *C. aperea*) y *Microcavia australis* (nodo D). En el nodo E (bootstrap = 82, bremer = 7) se reconoce a Dolichotinae (*D. patagonum y D. salinicola*; bootstrap = 98, bremer = 11; nodo G) como grupo hermano de *Hydrochoerus hydrochaeris* y *Kerodon rupestris*, que forman un grupo monofilético (Hydrochoeridae) altamente soportado (bootstrap = 83, bremer = 10; nodo H).

Estos resultados indican que Cavioidea *s.s.* es un grupo monofilético, y que Caviidae es un grupo parafilético debido al agrupamiento de Hydrochoeridae con Dolichotinae. Además Caviinae (*Cavia*, *Microcavia* y *Galea*) también sería un grupo parafilético altamente soportado (bootstrap = 82, bremer = 9, nodo C) debido a la posición basal de *Galea* dentro de Cavioidea *s.s*.

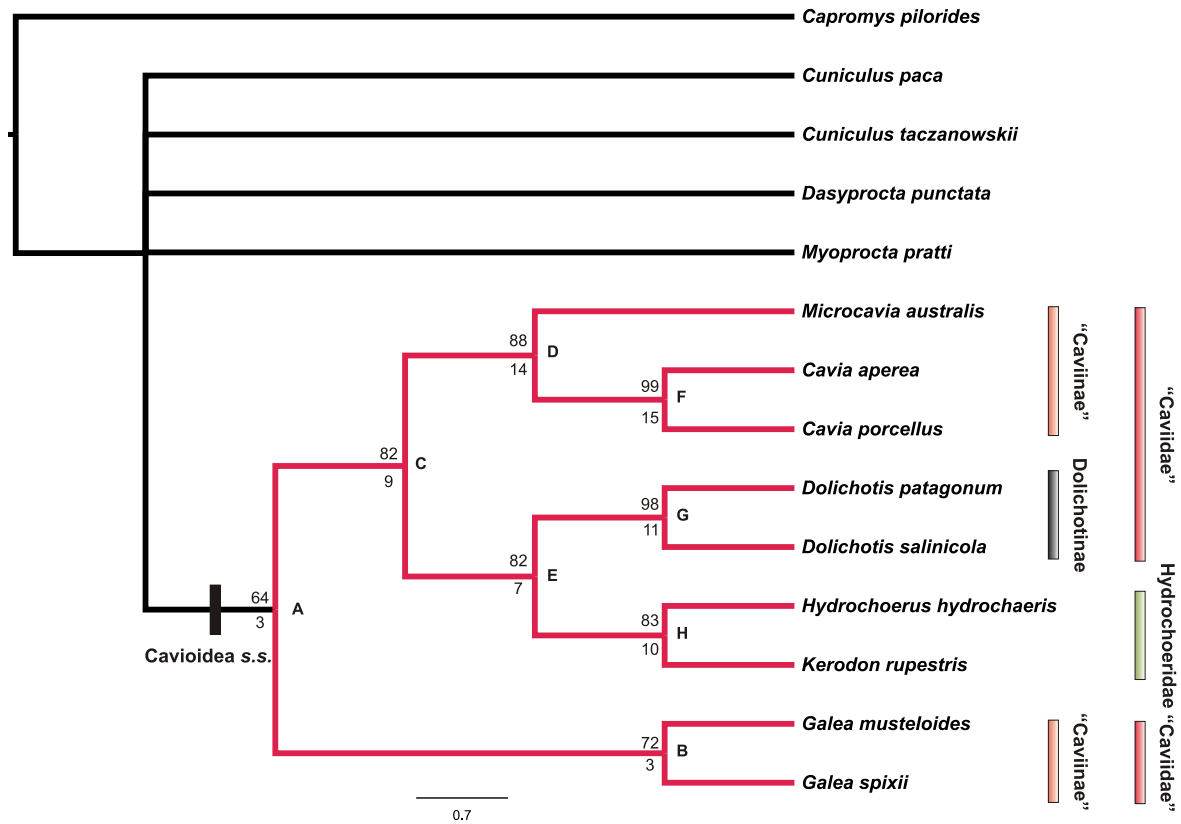


Figura 1: Árbol consenso estricto obtenido a partir de cinco árboles igualmente parsimoniosos (CI = 0,73; RI = 0,53) hallados para la matriz combinada. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50) y debajo se indica el valor de soporte de Bremer. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s.* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

Para evaluar la politomía basal en el consenso estricto y detectar los taxones inestables en la matríz de datos (i. e. taxones que se ubican en distintas posiciones en cada uno de los árboles de máxima parsimonia), los árboles de máxima parsimonia hallados fueron utilizados como inputs en el script IterPCR (Pol & Escapa, 2009). El resultado de este análisis muestra a *Myoprocta pratti* como el único taxón inestable de la matriz de análisis combinado. Sin embargo las distintas posiciones que este taxón adopta

en los árboles óptimos no influyen en las hipótesis filogenéticas propuestas en este trabajo, ya que todas estas posiciones alternativas son externas a Cavioidea *s.s*.

Máxima verosimilitud y análisis Bayesiano: El modelo evolutivo seleccionado para esta matriz usando MrModeltest, fue GTR+I+G (con proporción de sitios invariables, I = 0,3110; y distribución gamma de sitios variables, G = 0,5153) el cual fue utilizado en los análisis filogenéticos adicionales. Así, se realizó una búsqueda heurística y se halló un árbol de máxima verosimilitud (figura 2) y mediante análisis bayesiano se halló un árbol de máxima probabilidad posterior (figura 3).

Las topologías informadas por estos dos últimos métodos son congruentes en sus resultados y coinciden con el método de máxima parsimonia en que Cavioidea *s.s.* es un grupo monofilético (bootstrap = 70, probabilidad posterior = 0,91; figuras 2 y 3, nodo A), y *Kerodon* e *Hydrochoerus* se agrupan, con buen soporte (bootstrap = 86, probabilidad posterior = 1; figuras 2 y 3, nodo H), en un clado que se encuentra estrechamente relacionado a Dolichotinae (bootstrap = 84, probabilidad posterior = 0,99; figuras 2 y 3, nodo B). *Galea*, a diferencia del análisis de máxima parsimonia, es el grupo hermano del nodo formado por *Microcavia* y *Cavia* recuperando a Caviinae como grupo monofilético (bootstrap = 85, probabilidad posterior = 0,92; figura 2, nodo C; figura 3, nodo C).

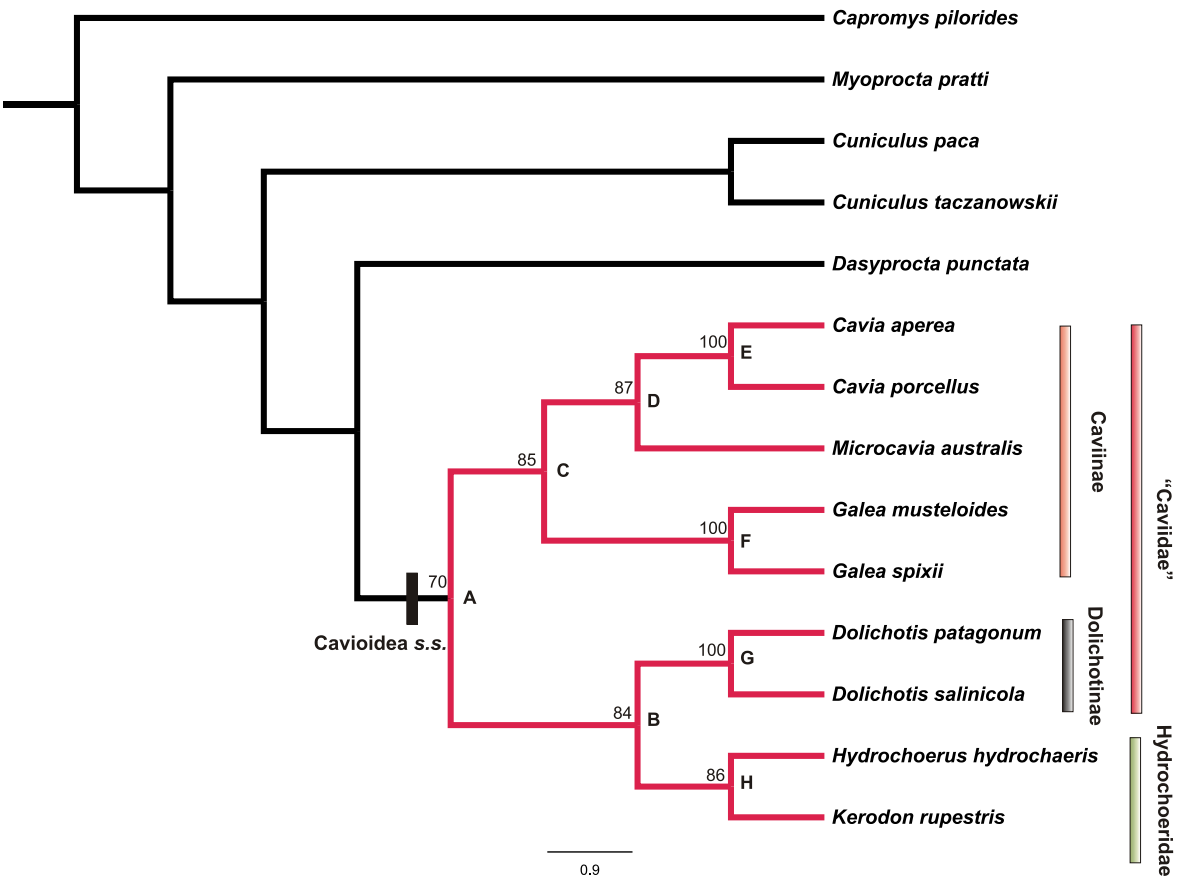


Figura 2: Árbol de máxima verosimilitud hallado para la matriz combinada. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s*. (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50). Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

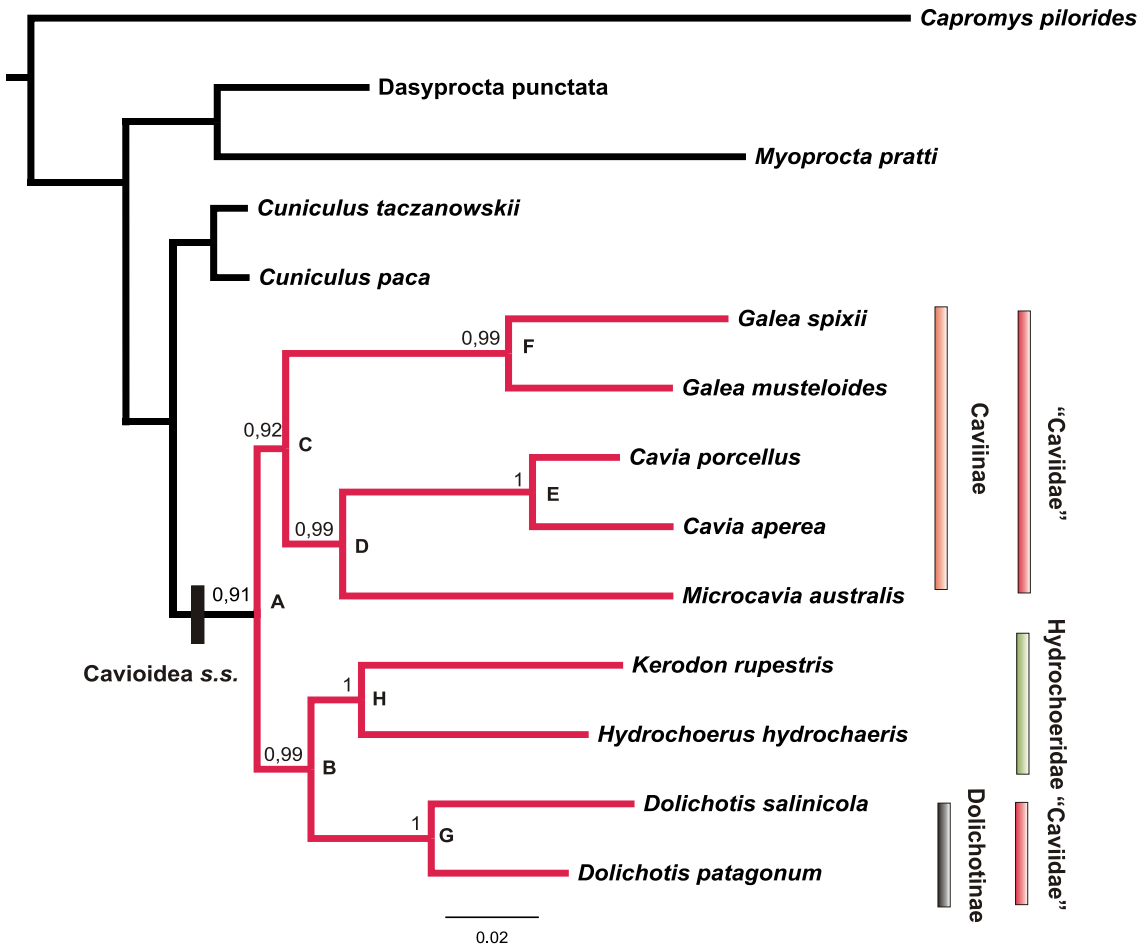


Figura 3: Árbol de máxima probabilidad posterior hallado para la matriz combinada. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de probabilidad posterior. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

Nuevas secuencias de ADN

Se utilizaron las matrices construidas a partir de nuevas secuencias del gen mitocondrial ARNr 16s y del gen nuclear RAG-1, obtenidas en este trabajo para realizar los análisis filogenéticos propuestos.

Análisis filogenéticos del gen RAG-1

Máxima parsimonia: El análisis filogenético realizado sobre la matriz de secuencias obtenidas para el gen nuclear RAG-1 por el método de máxima parsimonia resultó en un árbol óptimo de 117 pasos (CI = 0,87; RI = 0,46). En el cladograma (figura 4), *Hydrochoerus hydrochaeris* y *Galea musteloides* forman (con valores de soporte muy bajos) un grupo

monofilético (nodo D) que a su vez, es grupo hermano del clado formado por *Cavia aperea* y *Microcavia australis* (nodo C). En tanto que *Dolichotis patagonum* ocupa la posición más basal dentro de ésta hipótesis filogenética (nodo A).

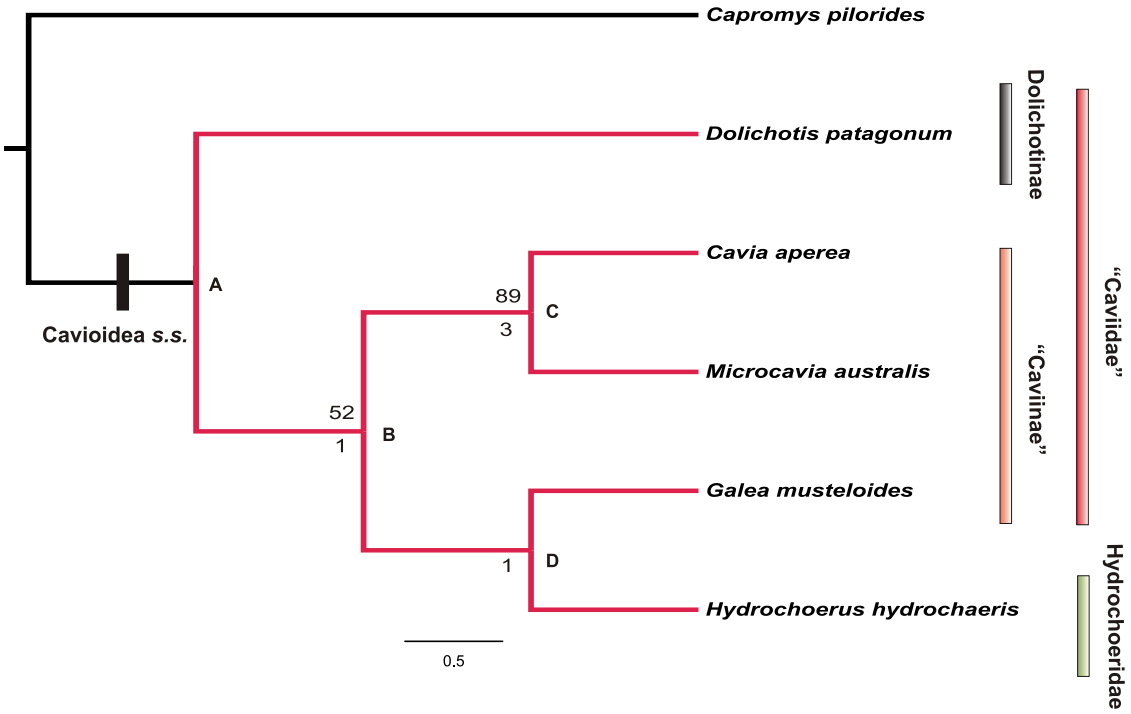


Figura 4: Árbol de máxima parsimonia (CI = 0,87; RI = 0,46) hallado para la matriz del gen RAG-1. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50) y debajo se indica el valor de soporte de Bremer. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s*. y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

Máxima verosimilitud y análisis Bayesiano: El modelo evolutivo seleccionado, mediante MrModeltest, para esta matriz fue GTR+G (G = 0,2844), y los resultados obtenidos a partir de ella mediante análisis bayesiano concuerdan con los del método de máxima parsimonia (figura 6).

El análisis de máxima verosimilitud dio como resultado una topología de máximo ajuste a la matriz de secuencias en la que se recuperan dos clados bien definidos (figura 5). Uno contiene a *Galea musteloides* e *Hydrochoerus hydrochaeris* como grupo monofilético (nodo D) y *Dolichotis patagonum* como grupo hermano de dicho clado (nodo B). El otro clado está formado por *Cavia aperea* y *Microcavia australis* (nodo C).

Estos resultados indican para los tres métodos de análisis que Caviidae (*Dolichotis*, *Cavia*, *Microcavia* y *Galea*) y Caviinae (*Cavia*, *Microcavia* y *Galea*) son grupos parafiléticos, e *Hydrochoerus* se encuentra relacionado con *Galea* (Caviinae).

Además, los tres métodos muestran un robusto agrupamiento entre *Microcavia australis* y *Cavia aperea* (bootstrap > 72, bremer = 3, probabilidad posterior = 0,9; figuras 4, 5 y 6, nodo C), lo que sugiere una fuerte relación de afinidad entre estas especies.

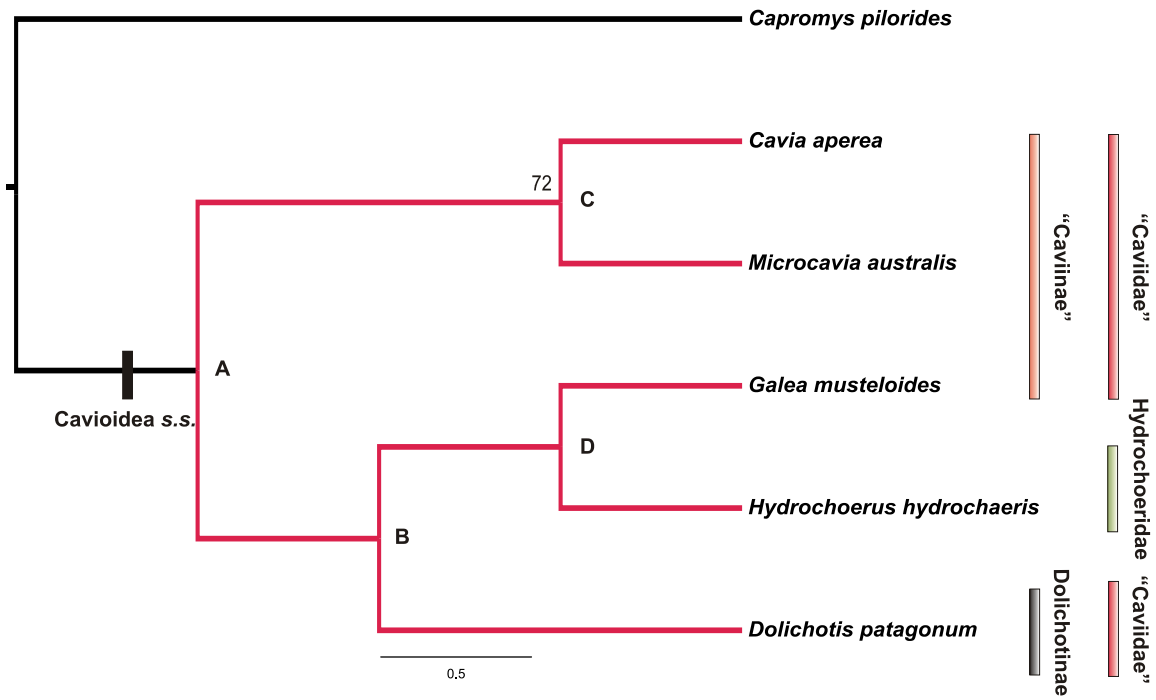


Figura 5: Árbol de máxima verosimilitud hallado para la matriz del gen RAG-1. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50). Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s.* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

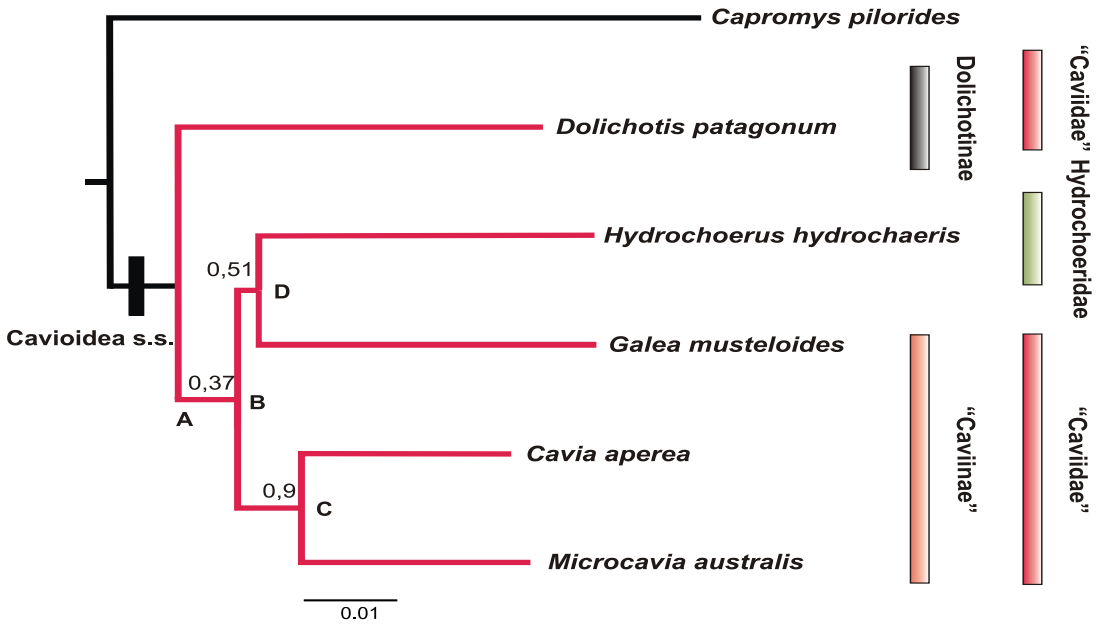


Figura 6: Árbol de máxima probabilidad posterior hallado para la matriz del gen RAG-1. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s*. (rojo) se indica el valor de probabilidad posterior. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s*. y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

Análisis filogenéticos del gen ARNr 16s

El análisis filogenético realizado sobre la matriz del gen mitocondrial ARNr 16s mediante el método de máxima parsimonia arrojó como resultado un árbol óptimo de 283 pasos (CI = 0,75; RI = 0,37), que se muestra en la figura 7.

El modelo evolutivo seleccionado mediante MrModeltest, para esta matriz fue GTR+I+G (I = 0,2290; G = 0,2368). Este modelo se utilizó para realizar los análisis filogenéticos adicionales mediante los métodos de máxima verosimilitud y análisis bayesiano (figuras 8 y 9).

Las topologías halladas mediante los tres métodos de análisis son congruentes en sus resultados. Cavioidea *s.s.* no es un grupo monofilético, debido a que el grupo externo *Myoprocta pratti* (familia Dasyproctidae; Cavioidea) se ubica en una posición derivada dentro de la filogenia como grupo hermano de *Galea musteloides* (figuras 7, 8 y 9; nodo E). El cladograma muestra a *Cavia aperea* como el taxon más basal y grupo hermano de *Microcavia australis* + especies más derivadas (figuras 7, 8 y 9; nodo A). *Hydrochoerus*

hydrochaeris es grupo hermano de *Dolichotis patagonum* + especies más derivadas (figuras 7, 8 y 9; nodo C). De acuerdo a estos resultados, Caviidae y Caviinae son grupos parafiléticos.

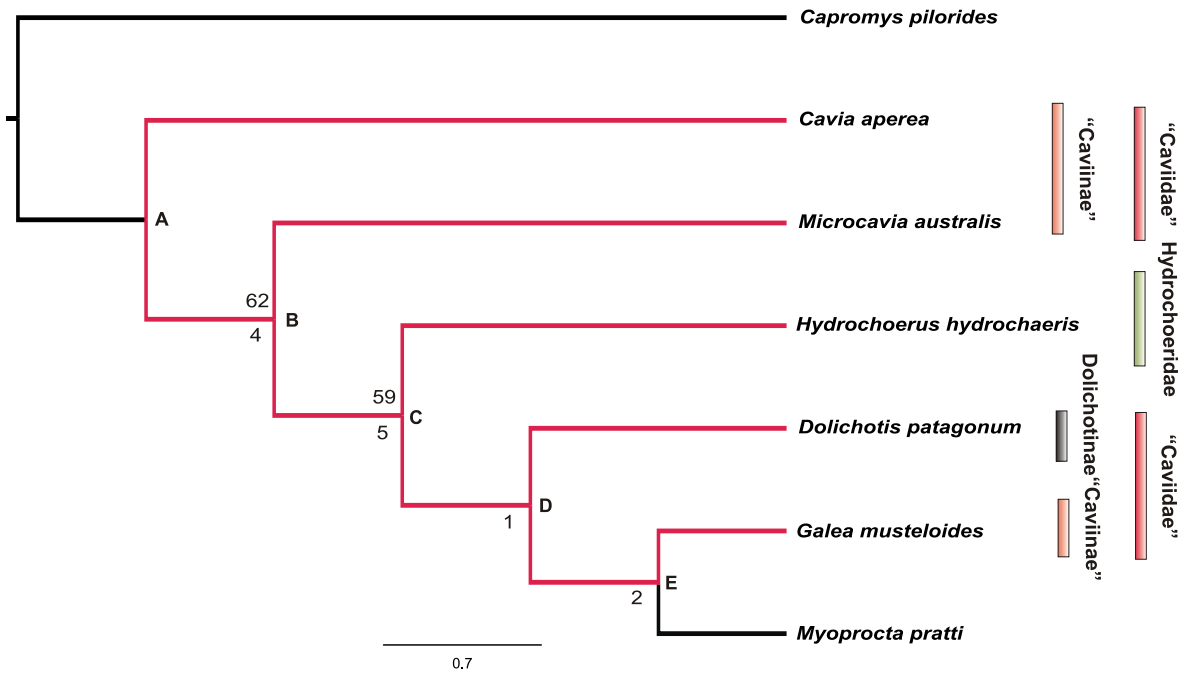


Figura 7: Árbol de máxima parsimonia (CI = 0,75; RI = 0,37) hallado para la matriz del gen ARNr 16s. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50) y debajo se indica el valor de soporte de Bremer. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s.* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

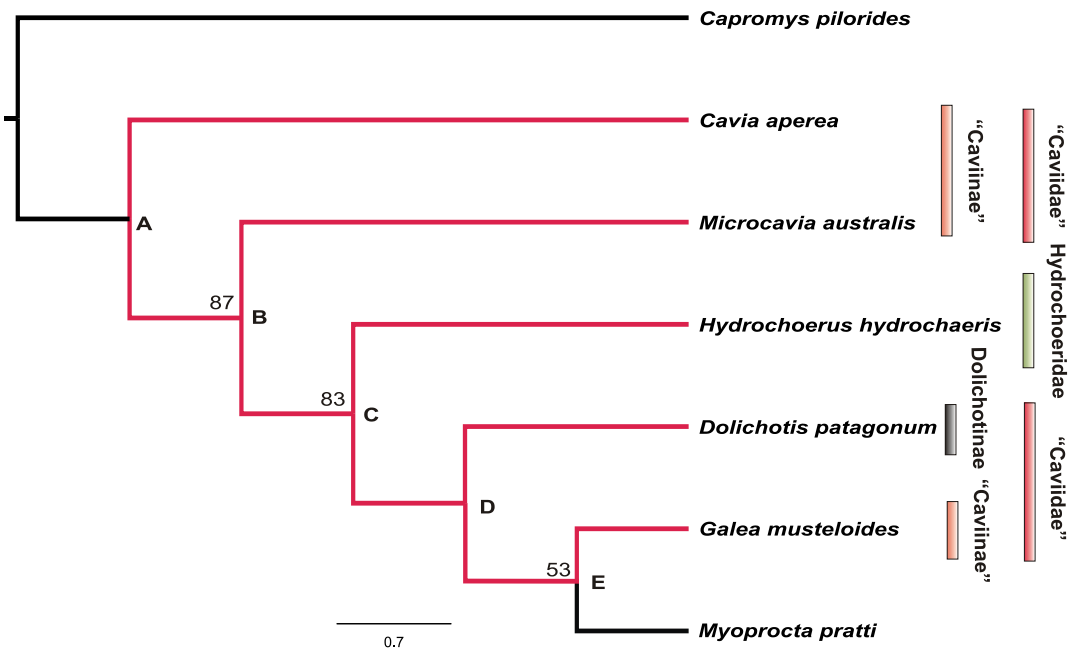


Figura 8: Árbol de máxima verosimilitud hallado para la matriz del gen ARNr 16s. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de soporte de bootstrap (frecuencias absolutas mayores a 50). Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s.* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

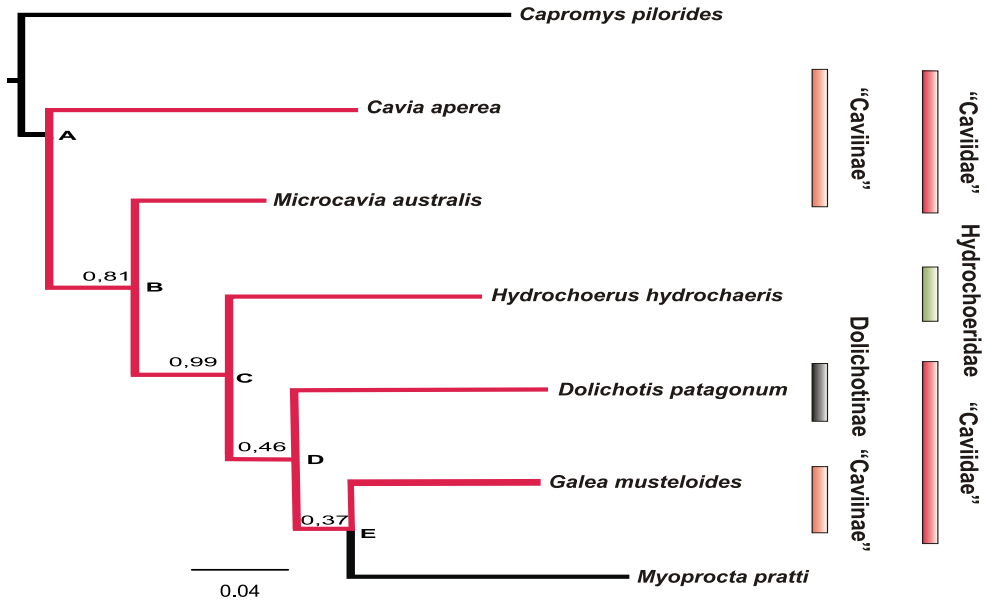


Figura 9: Árbol de máxima probabilidad posterior hallado para la matriz del gen ARNr 16s. Arriba de cada nodo del clado Cavioidea *s.s.* (rojo) se indica el valor de probabilidad posterior. Las barras verticales indican las familias y subfamilias dentro de Cavioidea *s.s.* y los nombres con comillas indican la parafilia del grupo.

Convergencia y autocorrelación: Los gráficos de convergencia y autocorrelación (figura 10), realizados a partir de los análisis bayesianos aplicados a las matrices combinada, RAG-1 y ARNr 16s, indican que: i) para la matriz combinada ambas corridas convergen aproximadamente en la generación nº 250. Además a partir de esta generación el algoritmo se estabiliza (fase estacionaria) y los valores de likelihood (LnL) para ambas corridas oscilan dentro de un rango que va desde -18.835 hasta -18.811. La media estimada para esta distribución de valores de LnL a lo largo de la fase estacionaria es -18.818. La alternancia periódica observada en torno al valor medio indica que no hay autocorrelación; ii) para la matriz del gen RAG-1 ambas corridas convergen aproximadamente en la generación nº 200. A partir de la misma los valores de LnL oscilan entre -1.426 y -1.408, en tanto que la media estimada para la fase estacionaria es igual a -1.415. No se observa evidencia de autocorrelación; iii) para la matriz del gen gen ARNr 16s ambas corridas convergen aproximadamente en la generación nº 200. Posterior a ésta los valores de LnL oscilan entre -1.883 y -1.861, y la media estimada de esta distribución de valores a lo largo de la fase estacionaria es - 1.868. No se observa evidencia de autocorrelación.

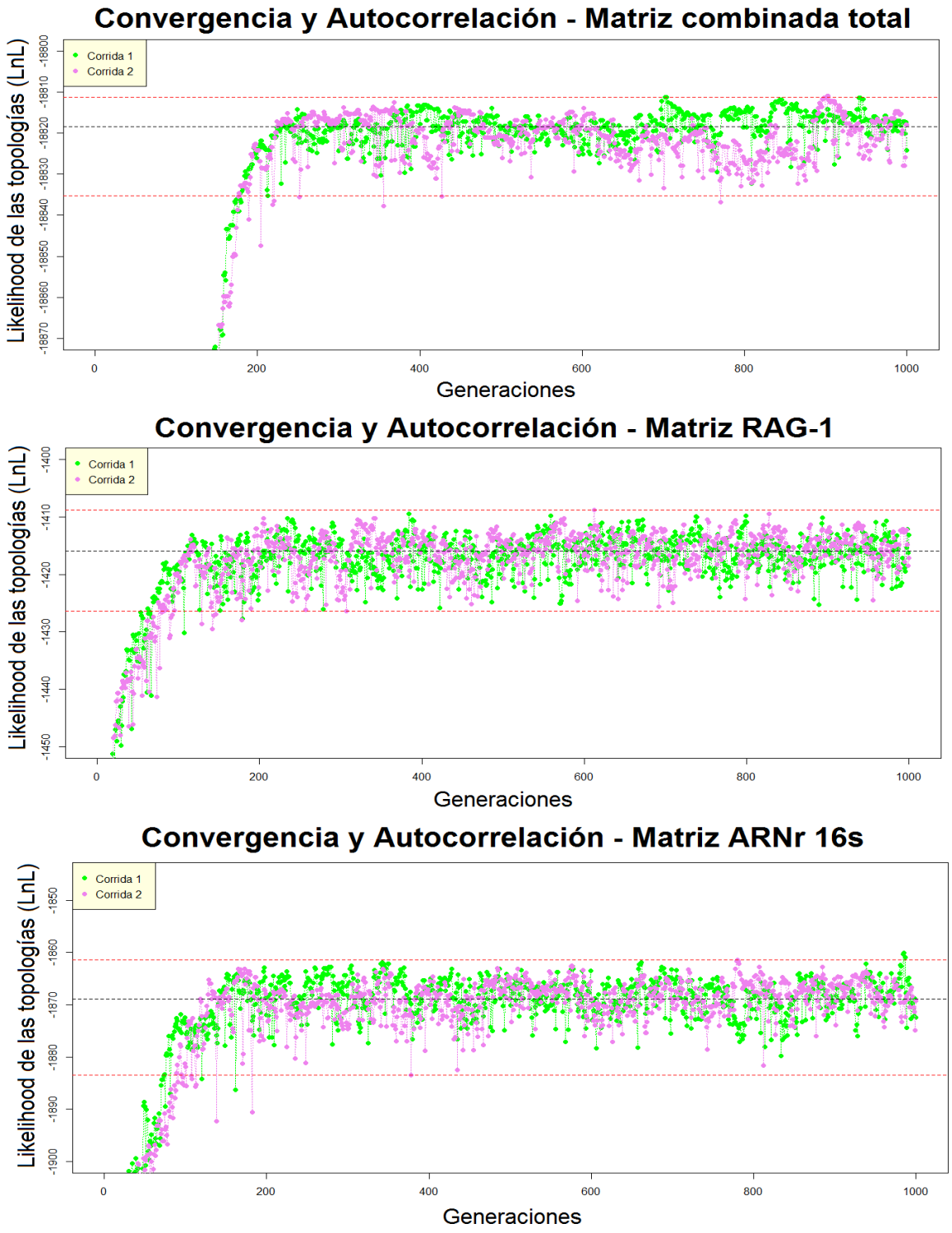


Figura 10: Distribución de los valores de likelihood (LnL) estimados a lo largo de las primeras 1.000 generaciones muestreadas de dos corridas independientes realizadas con MrBayes sobre los 3 data set analizados en este trabajo. Las líneas punteadas horizontales indican los valores máximos y mínimos de LnL (rojo) y el valor promedio de LnL (negro) en la fase estacionaria.

ANÁLISIS ADICIONALES

Ajuste al árbol de evidencia total

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos a partir del cálculo de los índices de consistencia y retención (CI, RI) individuales de cada gen (partición) sobre el AET (árbol de evidencia total). Para este análisis se utilizó como AET la topología hallada por dos de los métodos utilizados (máxima verosimilitud y análisis bayesiano) ya que la misma es coherente con lo esperado para las relaciones de afinidad dentro de Cavioidea *s.s*. (i.e. monofilia de Caviinae). Considerando los valores del CI el gen de mejor ajuste al AET es el GHR (CI = 0,85), en tanto que el RI indica que el ajuste óptimo se obtiene con el gen TTH (RI = 0,73). Luego, los genes de peor ajuste al AET fueron CytB (CI = 0,57) y ARNr 16s (RI = 0,26). Sin embargo estos valores no presentaron una relación directa con la cantidad de sitios informativos (IS) de cada matriz.

Tabla 3: Sitios informativos (IS), e índices de consistencia (CI) y retención (RI) para cada gen, calculados sobre el árbol de evidencia total.

	GHR	TTH	RAG-1	CytB	ARNr 12s	ARNr 16s
IS	69	169	24	339	69	81
CI	0,85	0,83	0,84	0,57	0,85	0,72
RI	0,67	0,73	0,29	0,36	0,67	0,26

Saturación

Los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz del gen mitocondrial ARNr 16s indican la parafilia de Caviidae y Caviinae debido a una estrecha relación entre *Galea musteloides* y el grupo externo *Myoprocta pratti*, formando el clado más derivado de la filogenia. Claramente este agrupamiento resulta discordante con el estado de conocimiento taxonómico de Cavioidea *sensu lato*. A fin de evaluar la existencia de saturación de sustituciones nucleotídicas en esta matriz, que permita explicar la topología obtenida, se realizaron dos tipos de análisis (análisis

estadístico y análisis gráfico). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos para cada una de las restantes matrices utilizadas en este estudio.

Análisis estadístico

Los resultados de los análisis realizados mediante el test estadístico de Xia *et al*. (2003) para todas las matrices utilizadas (tabla 4) revelaron en el gen CytB un grado de saturación medio (Iss = 0,47). El resto de los genes presentaron un grado de saturación bajo (Iss < 0,33). Sin embargo los valores de Iss para los genes ARNr 16s y TTH (0,27 y 0,26) se encontraron por encima de los mismos para los genes ARNr 12s, RAG-1 y GHR (0,10; 0,08 y 0,10). Dado que ninguno de los genes presentó valores de Iss superiores a sus respectivos Iss.c, se asume que todas las matrices presentan información filogenética útil (tabla 4).

Tabla 4: Índices de saturación (Iss y Iss.c) determinados para cada gen.

Gen	Iss	Iss.c	Prop. de sitios invariables	*Grado de saturación	Utilidad filogenética
ARNr 12s	0,10	0,57	0	Bajo	SI
ARNr 16s	0,27	0,66	0,2290	Bajo	SI
CytB	0,47	0,65	0,4911	Medio	SI
RAG-1	0,08	0,70	0	Bajo	SI
GHR	0,10	0,57	0	Bajo	SI
TTH	0,26	0,59	0	Bajo	SI

* Grado de saturación: Bajo: 0 < Iss < 0,33; Medio: 0,34 < Iss < 0,66; Alto: 0,67 < Iss < 1.

Análisis gráfico

Los gráficos construidos a partir del cálculo de las tasas de transiciones y transversiones (sustituciones nucleotídicas) y la distancia genética indicaron que el gen ARNr 16s (figura 11B) presentó el mayor grado de saturación (R^2_{medio} = 0,50; tabla 5), alcanzando una meseta aproximadamente en el valor de distancia genética 0,18. El gen CytB (figura 11A) mostró una pérdida de linealidad más clara para la tasa de transiciones (R^2_{Tr} = 0,58, tabla 5) a partir del valor 0,25 de la distancia genética. El gen RAG-1 (figura 11E) presentó baja linealidad evidente para la tasa de transversiones (R^2_{Tv} = 0,69, tabla 5) a partir del valor de distancia genética 0,05. Los gráficos correspondientes a los genes ARNr 12s, TTH y GHR (figuras 11C, D y F) mostraron una correlación positiva continua entre las tasas de transiciones y transversiones, y la distancia genética, lo que indica que estos genes no presentan saturación apreciable (R^2_{medio} > 0,92; tabla 5).

Tabla 5: Coeficiente de determinación (R^2) de la tasa de transiciones y transversiones vs. la distancia genética para cada gen.

	GHR	TTH	RAG-1	CytB	ARNr 12s	ARNr 16s
$\mathbf{R^2_{Tr}}$	0,98	0,97	0,96	0,58	0,97	0,58
$\mathbf{R^2_{Tv}}$	0,94	0,90	0,69	0,88	0,91	0,43
$\mathbf{R^2_{medio}}$	0,96	0,93	0,82	0,73	0,94	0,50

$\mathbf{R^2_{Tr}}$: Coeficiente de determinación para la tasa de transiciones vs. la distancia genética.
$\mathbf{R^2_{Tv}}$: Coeficiente de determinación para la tasa de transversiones vs. la distancia genética.
$\mathbf{R^2_{medio}}$: Promedio entre el R^2_{Tr} y el R^2_{Tv}.

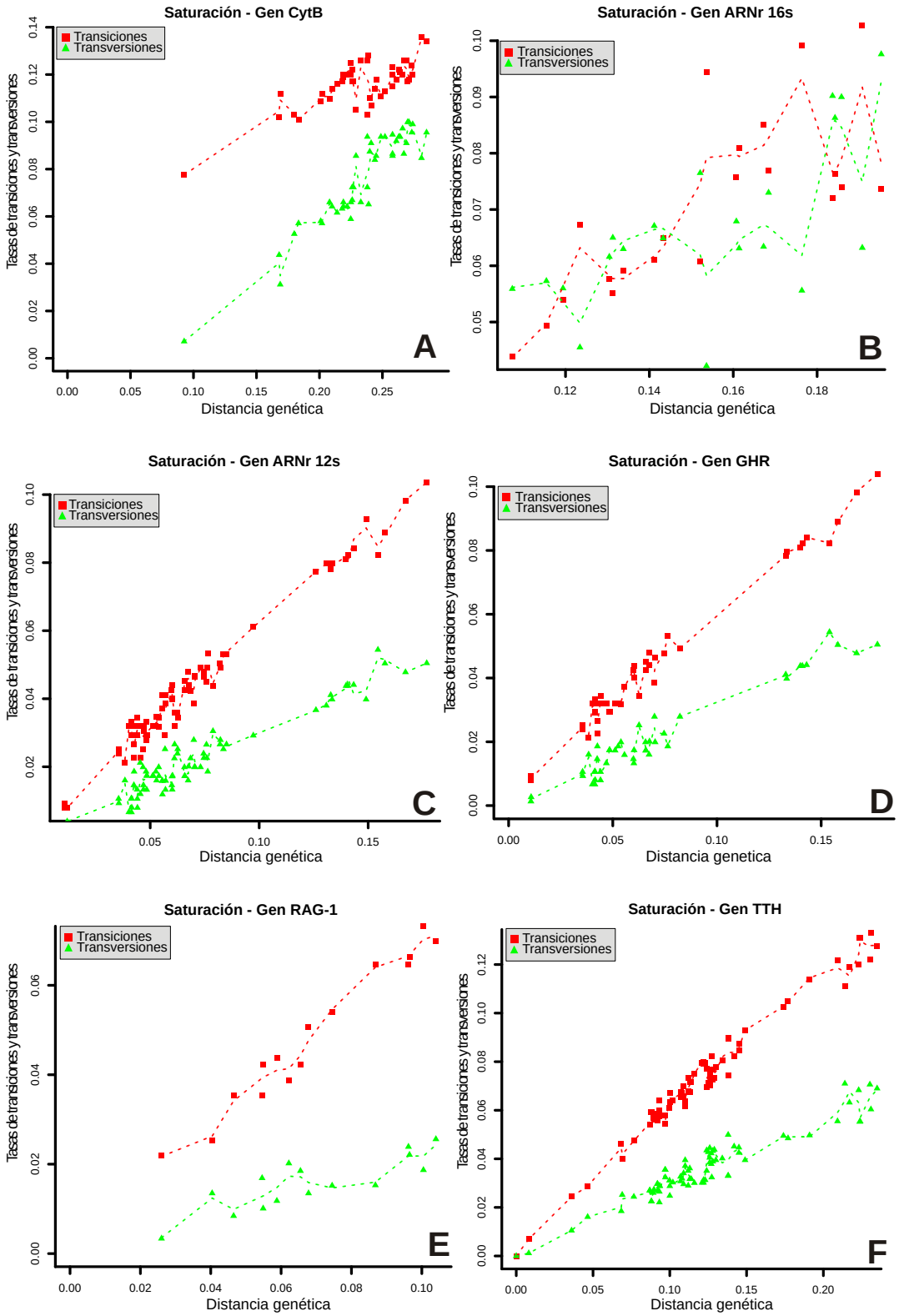


Figura 11: Gráfico de saturación (tasas de transiciones y transversiones vs. distancia genética) para las matrices de los genes: CytB (A), ARNr 16s (B), ARNr 12s (C), GHR (D), RAG-1 (E) y TTH (F).

Evaluación de caracteres y análisis sectorizado del gen ARNr 16s

Los análisis filogenéticos realizados sobre el gen ARNr 16s (figuras 7, 8 y 9) sugieren que Caviidae y Caviinae son parafiléticos, debido principalmente a la posición derivada del clado que conforman *Myoprocta pratti* y *Galea musteloides*. Para estudiar en mayor profundidad este problema se realizó una evaluación de los caracteres de esta matriz y un análisis sectorizado, mediante el método de bootscan.

El examen de evaluación de caracteres indicó que la matriz en cuestión presenta una mayor proporción de caracteres relevantes para las dos topologías testeadas (árbol actual y árbol esperado) en su región central (posiciones 200-400) (figura 12). El árbol actual y el árbol esperado se obtuvieron como se indica en la sección Materiales y Métodos. Así, se halló que el árbol actual es soportado por 21 caracteres (densidad de probabilidad máxima = 0,0072, figura 12) en la región central, en tanto que el árbol esperado es soportado por 7 caracteres en la misma región (densidad de probabilidad máxima = 0,0058, figura 12).

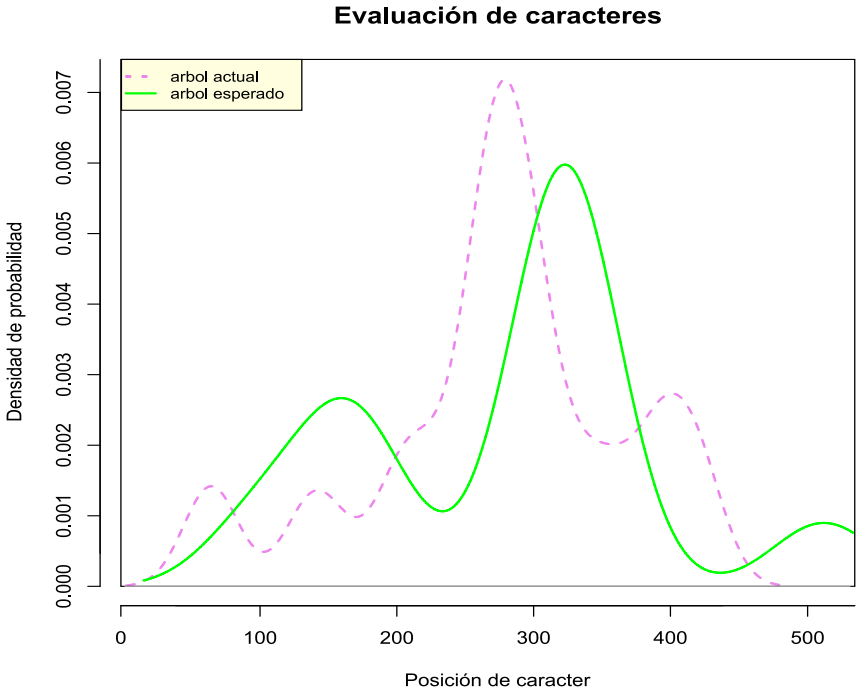


Figura 12: Gráfico de evaluación de caracteres para dos topologías (árbol actual y árbol esperado) aplicadas sobre la matriz del gen ARNr 16s.

En el análisis de Bottscan se observó que la secuencia de *Myoprocta pratti* (secuencia problema) presenta regiones (0-160 y 420-520 pb) en las que se soporta su agrupamiento con el grupo raíz *C. pilorides* (familia Capromidae, Superfamilia Octodontoidea). En las mismas los valores de soportes de bootstrap para el clado formado por estas dos especies fueron superiores a 70. A fin de corroborar estos resultados se llevó a cabo una nueva matriz de 260 caracteres considerando solo estas regiones y a partir de esta matriz se realizó un nuevo análisis filogenético por el método de máxima parsimonia. En este análisis se halló un total de cuatro árboles de máxima parsimonia de 69 pasos (CI = 0,72; RI = 0,12), con los cuales se determinó un árbol de consenso estricto. En esta topología (figura 13) se observó a *C. pilorides* en la base de la filogenia, luego a *M. pratti* como grupo hermano de Cavioidea *s.s.* que forma un grupo monofilético (bootstrap = 60, Bremer = 1). Dentro de Cavioidea *s.s.* se observó una politomía de grado cuatro, con tres ramas ocupadas por los integrantes de Caviinae (*Cavia aperea*, *Microcavia australis* y *Galea musteloides*) en tanto que en la cuarta rama se ubica el clado formado por *Hydrochoerus hydrochaeris* y *Dolichotis patagonum* (bootstrap = 59, Bremer = 1).

Estos resultados sugieren que Caviidae y Caviinae son grupos parafiléticos, y que Hydrochoeridae se encuentra más cercanamente relacionado a Dolichotinae que a Caviinae.

Luego se realizó la inspección de esta filogenia, mediante IterPCR, y se halló que los taxones *Microcavia*, *Cavia* y *Galea* presentan caracteres que soportan posiciones alternativas de los mismos en los árboles de máxima parsimonia.

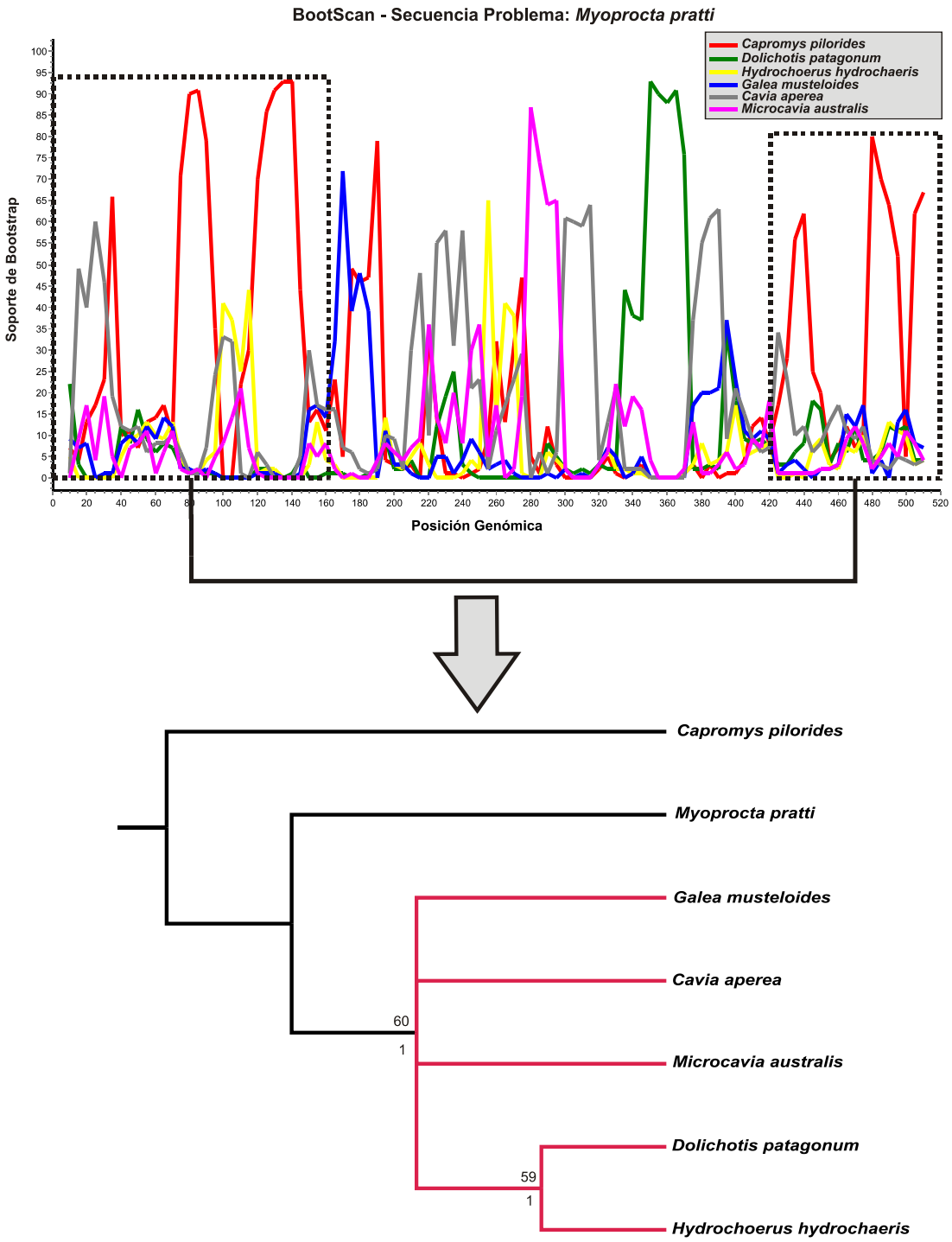


Figura 13: Arriba - Salida gráfica del método Bootscan para la matriz del gen ARNr 16s, seleccionando como secuencia problema la del grupo raíz *Myoprocta pratti*. En líneas puenteadas se indican las regiones que soportan el agrupamiento entre el grupo externo (*M. pratti*) y el grupo raíz (*C. pilorides*). Abajo – Árbol consenso estricto hallado por el método de máxima parsimonia, a partir de la matriz construida considerando las regiones 0-160 y 420-520 pb de la matriz original. Arriba de los nodos de Cavioidea *s.s.* (rojo) se indican valores de soportes de bootstrap y debajo valores de soporte de Bremer.

DISCUSIÓN

El presente trabajo representa el primer estudio filogenético realizado sobre los linajes vivientes de Cavioidea *sensu stricto* (Caviidae + Hydrochoeridae), basado en secuencias del gen nuclear RAG-1 y el gen mitocondrial ARNr 16s. En el mismo, además, se evaluó el aporte de estos genes en un análisis más amplio en el que se incorporó a los genes nucleares TTH y GHR, y los genes mitocondriales ARNr 12s y CytB, obtenidos a partir de estudios previos.

ANÁLISIS COMBINADO

Los resultados de los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz combinada indican con buen soporte (bootstrap > 60, bremer = 3 y probabilidad posterior = 0,91; figuras 1, 2 y 3; nodo A) que Cavioidea *s.s.* es un grupo monofilético. Además *Hydrochoerus* se agrupó robustamente con *Kerodon* (bootstrap > 80, bremer = 10 y probabilidad posterior = 1; figuras 1, 2 y 3; nodo H) y a su vez este clado aparece como grupo hermano de Dolichotinae (bootstrap > 80, bremer = 7 y probabilidad posterior = 0,99; figuras 1, 2 y 3; nodo E). Estos resultados se mantuvieron para los tres métodos de análisis y concuerdan con los obtenidos por Rowe y Honeycutt (2002), sugiriendo fuertemente la parafilia de Caviidae.

Por otro lado, los análisis de máxima verosimilitud y bayesiano recuperan a la subfamilia Caviinae como un grupo monofilético con valores de soporte altos (bootstrap = 85 y probabilidad posterior = 0,92; figuras 2 y 3; nodo C). En este clado *Galea* se presentó como grupo hermano del clado formado por *Cavia* y *Microcavia*. Sin embargo el análisis mediante máxima parsimonia resultó en la parafilia de Caviinae, donde *Galea* se ubicó con buen soporte (bootstrap = 82; bremer = 9), en una posición basal dentro de Caviidae.

En la figura 1 se observa que la rama que conduce al clado que contiene a las especies *Galea spixii* y *Galea musteloides* es apreciablemente larga. Entonces la discordancia observada entre los tres métodos aplicados sobre la matriz combinada, en

cuanto a la ubicación de *Galea*, puede deberse al efecto del largo de ramas. Según se ha demostrado en la literatura, este problema afecta la capacidad de resolución de los métodos de análisis, especialmente máxima parsimonia (Philippe *et al*. 2005).

NUEVAS SECUENCIAS DE ADN

RAG-1:

En los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz del gen RAG-1 la familia Caviidae y la subfamilia Caviinae aparecen como grupos parafiléticos, debido al agrupamiento con soportes muy bajos de *Hydrochoerus hidrochaeris* y *Galea musteloides* (bootstrap > 50, bremer = 1 y probabilidad posterior = 0,51; figuras 4, 5 y 6; nodo D).

En dos de los tres métodos de análisis (máxima parsimonia y análisis bayesiano) *Dolichotis patagonum* se presenta, con soportes muy bajos (bootstrap = 52, bremer = 1 y probabilidad posterior = 0,37), como el taxón más basal de Cavioidea *s.s.* Por otro lado el resultado obtenido mediante máxima verosimilitud ubica a *Dolichotis patagonum* como el grupo hermano del clado formado por *Hydrochoerus* y *Galea*, también con soporte muy bajo (bootstrap < 50).

En todos los resultados *Cavia aperea* y *Microcavia australis* se relacionaron en forma robusta (bootstrap > 72, bremer = 3 y probabilidad posterior = 0,9; figuras 4, 5 y 6; nodo C).

No obstante los bajos valores de soporte señalados para las ramas que contienen a *Hydrochoerus*, *Galea* y *Dolichotis* en las filogenias halladas mediante los tres métodos, estos resultados sugieren que Hydrochoeridae está más estrechamente relacionado a Caviinae que Dolichotinae.

El escaso muestreo taxonómico para este gen y en especial la ausencia de secuencias de *Kerodon* posiblemente tenga implicancias en estos resultados, como se ve al contrastar los mismos con los obtenidos a partir de la matriz combinada. Es decir la ausencia de secuencias de *Kerodon* en esta matriz podría ser responsable del agrupamiento de *Hydrochoerus* y *Galea*, que conduce a la parafilia de Caviidae y Caviinae.

ARNr 16s:

En las filogenias halladas por los tres métodos de análisis para la matriz del gen ARNr 16s, Cavioidea *s.s.* resultó ser un grupo parafilético, debido a la inclusión del taxón *Myoprocta pratti* (familia Dasyproctidae) dentro de este clado. El mismo se agrupó, con valores de soporte muy bajos (bootstrap > 50, bremer = 2 y probabilidad posterior = 0,37; figuras 7, 8 y 9; nodo E), con *Galea musteloides* (familia Caviidae), indicando la parafilia de Caviidae y Caviinae.

ANÁLISIS ADICIONALES:

Los resultados obtenidos muestran, en algunos casos (i.e. ARNr 16s), una marcada contraposición con el estado de conocimiento de las relaciones dentro de Cavioidea *s.s*. Es por eso que en este estudio se aplicaron diferentes análisis sobre las matrices utilizadas a fin de determinar la "cantidad y calidad" de información contenida en las mismas. Así, el análisis de ajuste al árbol de evidencia total (AET, tabla 3) muestra, basado en los valores de RI, que la matriz del gen ARNr 16s presenta el ajuste más bajo (RI = 0,26). Además, los análisis de saturación (tablas 4 y 5; figura 11) indican que esta matriz presenta un nivel de saturación mínimo (Iss = 0,27; R^2_{medio} = 0,50) pero superior al indicado para otras matrices (TTH, GHR, ARNr 12s y RAG-1). Esto puede interpretarse como una falta de información que conduce a una resolución ineficiente de la filogenia (Xia *et al*. 2003). Sin embargo esta matriz cuenta con 81 sitios informativos (IS = 81, tabla 3), y una de las matrices de máximo ajuste al AET (GHR; RI = 0,67; tabla 3) presenta 69 sitios informativos (IS = 69, tabla 3), lo cual sugiere una falta de correlación entre la "cantidad y la calidad" de la información contenida por los data set en estudio.

Adicionalmente a fin de testear la presencia de la señal filogenética *Myoprocta pratti* + *Galea musteloides* a lo largo de toda la matriz del gen ARNr 16s, se realizó una evaluación de caracteres y un análisis sectorizado en dicha matriz. Los resultados de la evaluación de caracteres indican que la región central de dicha matriz (posiciones 200-400 pb) presenta mayor cantidad de caracteres soportando esta señal filogenética (árbol actual, 21 caracteres, figura 12), que los que se cuentan para una filogenia tradicional

(árbol esperado, 7 caracteres, figura 12). Por su parte el análisis sectorizado coincide con la evaluación de caracteres en que la región central de la matriz soporta el agrupamiento de *M*. *pratti* con integrantes de Caviidae, con valores de bootstrap mayores a 70 (figura 13), aunque no es clara su relación con *G. musteloides*. Sin embargo por fuera de la región central (0-200; 400-500 pb) se pierde esta señal filogenética y *M. pratti* parece agruparse, con buen soporte (bootstrap > 80, figura 13), con *C. pilorides*. Esto se evidenció al realizar un nuevo análisis filogenético utilizando una nueva matriz construida a partir de estas regiones, donde *M. pratti* resultó ser el grupo hermano de Cavioidea *s.s*. (figura 13).

Por otro lado el muestreo taxonómico (taxón sampling) es un factor muy importante que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar un análisis filogenético, ya que se ha indicado ampliamente en la literatura (Hillis, 1998; Zwickl & Hillis, 2002; Hillis *et al.* 2003) que un muestreo taxonómico pobre puede conducir a conclusiones equivocadas sobre las relaciones de afinidad de un grupo de organismos. En este sentido las matrices de los genes ARNr 16s y RAG-1 presentaron un muestreo taxonómico escaso (taxon $\text{sampling}_{\text{ARNr 16s}} = 7$, taxon $\text{sampling}_{\text{RAG-1}} = 6$), por esto se sugiere que la principal fuente de discordancia en los resultados obtenidos para estos genes, en comparación con la matriz combinada, se debe a este factor.

No obstante el escaso muestreo taxonómico y el pobre soporte observado en algunos casos (RAG-1) para el clado que contiene a Hydrochoeridae, este grupo no se recuperó en ningún análisis como grupo hermano de Caviidae. Por el contrario Hydrochoeridae siempre apareció incluido en Caviidae determinando la parafilia de este grupo. Estos resultados, coinciden con los expuestos en estudios previos (Rowe y Honeycutt, 2002; Pérez, 2010) y sugieren fuertemente la reubicación taxonómica de este grupo en el nivel de subfamilia, en cuyo caso el nombre propuesto es **Hydrochoerinae**.

Como corolario de este estudio debe considerarse la inclusión de nuevos taxones en estudios futuros a fin de dar soporte o refutar los resultados presentados aquí.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de seminario de grado, se arribó a las siguientes conclusiones, referidas a las hipótesis planteadas.

1. **Parafilia de Caviidae.**

    a. Matriz combinada: Los tres métodos de análisis (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano) corroboran la hipótesis de la parafilia de Caviidae, debido al agrupamiento entre Hydrochoeridae y Dolichotinae.

    b. Matriz de RAG-1: Los tres métodos de análisis corroboran la hipótesis de la parafilia de Caviidae, debido al agrupamiento entre *Hydrochoerus hydrochaeris* y *Galea musteloides*.

    c. Matriz ARNr 16s: Los tres métodos de análisis corroboran la hipótesis de la parafilia de Caviidae, debido al agrupamiento entre *M. pratti* y *G. musteloides*. Además *H. hydrochaeris* se encuentra en la posición basal de un clado que incluye a *D. patagonum* y *G. musteloides* en una posición más derivada.

2. **Monofilia de Caviinae.**

    a. Matriz combinada: El análisis mediante máxima parsimonia rechaza esta hipótesis, debido a la posición basal de *Galea* dentro de Cavioidea *s.s*, indicando la parafilia de este grupo. Los análisis realizados mediante máxima verosimilitud y análisis bayesiano corroboran esta hipótesis.

    b. Matriz de RAG-1: Los tres métodos de análisis rechazan esta hipótesis, debido al agrupamiento entre *H. hydrochaeris* y *G. musteloides*.

c. Matriz ARNr 16s: Los tres métodos de análisis rechazan esta hipótesis, debido al agrupamiento entre *M. pratti* y *G. musteloides*.

3. *Microcavia* y *Cavia* son grupos hermanos, y *Galea* se encuentra basal a éstos.

a. Matriz combinada: El análisis mediante máxima parsimonia rechaza parcialmente esta hipótesis, debido a la posición basal de *Galea* dentro de Cavioidea *s.s*. Los análisis realizados mediante máxima verosimilitud y análisis bayesiano corroboran esta hipótesis.

b. Matriz de RAG-1: Los tres métodos de análisis rechazan parcialmente esta hipótesis. En los tres cladogramas *Cavia* y *Microcavia* forman un clado. y *Galea* se ubica, junto a *Hydrochoerus* en un clado que se encuentra como grupo hermano del primero.

c. Matriz ARNr 16s: Los tres métodos de análisis rechazan esta hipótesis, debido al agrupamiento entre *M. pratti* y *G. musteloides* en la posición más derivada del árbol.

4. Dolichotinae e Hydrochoeridae son grupos hermanos.

a. Matriz combinada: Los tres métodos de análisis corroboran esta hipótesis.

b. Matriz de RAG-1: Los tres métodos de análisis rechazan esta hipótesis, debido al agrupamiento de *H. hydrochaeris* y *G. musteloides* (Caviinae).

c. Matriz ARNr 16s: Los tres métodos de análisis corroboran parcialmente esta hipótesis, ya que *H. hydrochaeris* aparece como grupo hermano de un clado que contiene a *D. patagonum* y especies derivadas.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO PROFUNDAMENTE A:

Mis directoras, las Dras. María E. Pérez y Liza Martinazzo, por haber tenido la amabilidad de dirigirme en este seminario, por brindarme su afecto, por enseñarme y formarme de la mejor manera y por demostrarme que siempre podré contar con ellas.

A mi familia por brindarme siempre todo su amor, en especial a mi mamá Ana María, porque a pesar de pasar por los momentos más duros que la vida puede presentar jamás dejó de alentarme y apoyarme en mis sueños; y a mi hermana Zulma (y su hermosa familia) por estar a mi lado en cada momento y enseñarme todos los días, con su ejemplo, que se puede ser un mejor ser humano. Además quiero agradecer a la familia Freeman por su apoyo incondicional, por consentir mis mañas y por permitirme sentirlos como mi segunda familia; y muy especialmente a Vane quiero agradecerle por todo lo hermoso del tiempo compartido y porque sus palabras siempre me impulsaron hacia un mejor lugar.

A mi asesor, el Oc. José Saravia por aceptar ser mi asesor en la carrera, por lo que me enseñó (y me sigue enseñando) como docente, por ayudarme en todo momento y por brindarme su amistad.

Al Laboratorio de Biología Molecular del CENPAT, en especial al Dr. Nestor Basso por hacerme sentir parte del equipo desde el primer momento y por sus consejos. A la BQ Marcela Iglesias y el Lic. Luciano Real por ayudarme con entusiasmo en mi formación, aceptarme y demostrarme su afecto.

Al Museo E. Feruglio, en especial al Dr. Diego Pol porque de él aprendo día a día que se puede ser un gran científico y una gran persona al mismo tiempo. Al Dr. Ignacio Escapa, a la Dra. Juliana Sterli y a la Dra. Alejandra Pagani por sus valiosos consejos.

A la Universidad Nac. De la Patagonia y sus profes que tuvieron la palabra justa para alentarme en momentos complicados: Dra. Alicia Forcone, Prof. Mónica Albertali y

Dra. Ana Ruiz; compañeros de cursada, que a pesar del poco tiempo compartido me ayudaron a llevar adelante la carrera: Lore Austin, Andrea Calvo, Mario Roberts, Anabel Calderón, Sole Despo, Juli Gallego, Guille Pérez Astuti y en especial a Meli Olave por su ayuda constante a lo largo de este seminario. También quiero agradecer a Cesar y Cármen por sus cálidas atenciones de siempre y el importante lugar que ocupan.

Mis amigos de siempre: Seba, Pablo G., Pablo A. y Dany por regalarme su amistad y aguantarse lo peor de mí sin aflojar; y quiero agradecer también a mi amigo Agu Anastasía, que a pesar de la distancia nunca dejó de darme ánimos y ayudarme.

A mis compañeros y amigos de la Base Zar: en especial a Ruben B., Omar P., Juanchi R. y Adrián G. por su ayuda de siempre y sus consejos; y a Roberto D. (tito) por su asistencia técnica en la parte gráfica.

BIBLIOGRFÍA

1. Adkins R. M., Gelke E. L., Rowe D. & Honeycutt R. L. 2001. **Molecular phylogeny & divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes**. Molecular Biology & Evolution. 18: 777–791.
2. Akaike H. 1983. **Information measures & model selection.** Int. Stat. Inst. 22:277–291.
3. Antoine P. O., Marivaux L., Darin A. Croft D. A., Billet G., Ganerød M., Jaramillo C., Martin T., Orliac M. J., Tejada J., Altamirano A. J., Duranthon F., Fanjat G., Rousse S. & Salas Gismondi R. 2011. **Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern & timing of caviomorph origins & biogeography.** Proc R Soc B 2012 279: 1319-1326.
4. Bremer K. 1994. **Branch support & tree stability.** Cladistics. 10: 295-304.
5. Cabrera A. 1961. **Catálogo de los mamíferos de América del Sur.** II. Rev. Mus. Argentino Cien. Nat. 'Bernardino Rivadavia' 4: 1–732.
6. Carroll H., Ridge P., Clement M. & Snell Q. 2006. **Effects of Gap Open and Gap Extension Penalties.** http://www.biotconf.org/2006/4-Carroll-34.pdf.
7. Da Silva Neto E. J. 2000. **Morphology of the regiones ethmoidalis & orbitotemporalis in *Galea musteloides* (Meyen 1832) & *Kerodon rupestris* (Weid-Neuweid 1820) (Rodentia Caviidae) with comments on the phylogenetic systematics of the Caviidae.** J. Zool. Syst. Evol. Res. 38: 219–229.
8. Dos Reis S. F. 1994. **Allometry, convergence of ontogenetic trajectories & cranial evolution in caviine rodents (Rodentia: Caviinae).** J. Morphol. 220: 342.
9. Drummond A. J. & Rambaut A. 2007. **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** BMC Evol. Biol. 7: 214.
10. Dunnum J. L. & Salazar-Bravo J. **Phylogeny, evolution, and systematics of the Galea musteloides complex (Rodentia: Caviidae).** 2010. J. Mammal. 91 (1): 243-259.

11. Eisenberg J.F. **Mammals of the neotropics, the northern neotropics.** Chicago: University of Chicago Press; 1989. p. 449.
12. Emmons L. H. 1990. **Neotropical rainforest mammals: a field guide.** Chicago: Univ. Chicago Press.
13. Farris J. S. 1983. **Distance data in phylogenetic analysis.** pp. 3-23 in Advances in Cladistics: Proceedings of the first meeting of the Willi Hennig Society, ed. V. A. Funk & D. R. Brooks. New York Botanical Garden, Bronx, New York.
14. Farris J. S. 1989. **The Retention Index & Homoplasy Excess.** Syst Biol 38 (4): 406-407.
15. Felsenstein J. 1985. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** Evolution. 39: 783-791.
16. Flynn J. J. & Wyss A. R. 1998. **Recent advances in South American mammalian paleontology.** Trends Ecol. Evol. 13: 449-454.
17. Goloboff P., Farris J. & Nixon K. 2008a. **TNT: Tree Analysis Using New Technology, version 1.1 (Williensis Hennig Society Edition).** Program & documentation available at http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/tnt.
18. Goloboff P., Farris J. & Nixon K. 2008b. **A free program for phylogenetic analysis.** Cladistics 24: 774–786.
19. Hall T. A. 1999. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment edi-tor & analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic AcidsSymposium Series 41: 95-98.
20. Hennig W. 1968. **Elementos de una sistemática filogenética, Manuales.** Editorial Universitaria Buenos Aires, Buenos Aires, 353 pp.
21. Hillis D. M., Pollock D. D., McGuire J. A. & Zwickl D. J. 2003. **Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference?** Syst. Biol. 52: 124–126.
22. Hillis, D. M. 1998. **Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, & investigator bias.** Syst. Biol. 47: 3–8.

23. Hoffstetter R. 1975. **El origen de los Caviomorpha y el problema de los Hystricognathi (Rodentia).** Actas I Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía, Tucumán, 1974, 2:505-528.
24. Honeycutt R. L., Frabotta L. & Rowe D. 2007. **Rodent Evolution, Phylogenetics, & Biogeography. Pp. 08-26. In: Rodent societies: an ecological & evolutionary perspective.** J. Wolff, P. Sherman, eds. The University of Chicago Press, Chicago, London.
25. Huchon D. & Douzery E. J. P. 2001. **From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny & biogeography of hystricognath rodents.** Molecular Phylogenetics & Evolution 20: 238–251.
26. Jones L. R. 2007. **Métodos Cladísticos para el Estudio de la Recombinación en el Virus de la Inmunedeficiencia Humana (HIV).** Darwiniana 45(S): 24-33.
27. Kitching I. J., Forey P. L., Humphries C. J. & Williams D. M. 1998. **Cladistics: The theory & practice of parsimony analysis, 2nd edition.** Oxford Univ. Press, Oxford.
28. Kluge A. G. & Farris J. S. 1969. **Quantitative Phyletics & the Evolution of Anurans.** Syst Biol 18 (1): 1-32.
29. Kraglievich L. 1930. **Diagnosis osteológico-dentaria de los géneros vivientes de la subfamilia Caviinae.** Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires 36:59-95.
30. Kraglievich L. 1932. **Diagnosis de nuevos géneros y especies de roedores cávidos y eumegámidos fósiles de la Argentina.** An. Soc. Cien. Arg. CXIV: 155-181 y 211-237.
31. Lavocat R. 1973. **Les rongeurs du Miocène d'Afrique Orientale. I. Miocène inférieur.** Mém. Trav. Inst. Montpellier Ecole Pratique Hautes Etudes 1: 1–284.
32. Lopez P., Forterre P. & Philippe H. 1999. **The root of the tree of life in the light of the covarion model.** J. Mol. Evol. 49: 496–508.
33. M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. & Higgins D. G. 2007. **Clustal W & Clustal X version 2.0.** Bioinformatics, 23:2947-2948.

34. Mares M. A. & Ojeda R. A. 1982. **Patterns of diversity & adaptation in south american hystricognath rodents.** Pp. 393-432. En: Mammalian Biology in South America (Mares, M.A. & H.H. Genoways, eds.). Special Publishing 6, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh.
35. Nedbal M. A., Honeycutt R. L. & Schlitter D. A. 1996. **Higher-level systematics of rodents (Mammalia, Rodentia): evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene.** Journal of Mammalian Evolution. 3:201–237.
36. Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest 2.3. **Program distributed by the author.** Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
37. Opazo J. C. 2005. **A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi).** Mol. Phylog. and Evol. 37 (2005) 932–937
38. Opazo J. C., Palma E., Melo F. & Lessa E. **Adaptive Evolution of the Insulin Gene in Caviomorph Rodents.** Mol Biol Evol (May 2005) 22(5): 1290-1298.
39. Patterson B. & Wood A. E. 1982. **Rodents from the Deseadan Oligocene of Bolivia & the relationships of the Caviomorpha.** Bull. Mus. Comp. Zool. 149: 371–543.
40. Patterson B. D. & Velazco P. M. 2008. **Phylogeny of the Rodent Genus Isothrix (Hystricognathi, Echimyidae) & its Diversification in Amazonia & the Eastern Andes.** Journal of Mammalian Evolution. 15:181–201.
41. Pérez M. E. 2010. **A new rodent (Cavioidea, Hystricognathi) from the middle Miocene of Patagonia, mandibular homologies, & the origin of the crown group Cavioidea *sensu stricto*.** Journal of Vertebrate Paleontology, 30(6): 1848-1859.
42. Philippe H., Zhou Y., Brinkmann H., Rodrigue N. & Delsuc F. 2005. **Heterotachy & long-branch attraction in phylogenetics.** BMC Evol Biol. 5: 50.
43. Pol D. & Escapa I. H. 2009. **Unstable taxa in cladistic analysis: identification & the assessment of relevant characters.** Cladistics. 25, 515-527.
44. Quintana C. A. 1998. **Relaciones filogenéticas de roedores Caviinae (Caviomorpha, Caviidae), de América Sur.** Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.) 94:125–134.

45. R Development Core Team. 2010. **R: A language & environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.
46. Redford K. H., Eisenberg J. F. **Mammals of the neotropics, the southern cone.** 1992. Chicago: The University of Chicago Press, p. 430.
47. Ronquist F. & Huelsenbeck J. P. 2003. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** Bioinformatics 19:1572–1574.
48. Rowe D. L. & Honeycutt R. L. 2002. **Phylogenetic Relationships, Ecological Correlates, & Molecular Evolution Within the Cavioidea (Mammalia, Rodentia).** Molecular Biology & Evolutionary. 19: 263-277.
49. Salgado-Salazar C., McEwen J. G., Restrepo A. & Jones L. R. 2010. **The human fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers.** Cladistics 26: 613–624.
50. Salminen M. O., Carr J. K., Burke D. S. & McCutchan F. E. 1995. **Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning.** AIDS Res. Hum. Retroviruses. 11: 1423–1425.
51. Sambrook J. & Russell D. W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed.**, pp. 6.8–6.9, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
52. Swofford D. L. 1999. **PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods).** Sinauer, Sunderland, Mass.
53. Trillmich F., Kraus C., Künkele J., Asher M., Clara M., Dekomien G., Epplen J., Saralegui A. & Sachser N. 2004. **Species-level differentiation of two cryptic species pairs of wild cavies, genera *Cavia* & *Galea*, with a discussion of the relationship between social systems & phylogeny in the Caviinae.** Canadian Journal of Zoology, 82:516-524.
54. Vaidya G., Lohman D. J. & Meier R. 2011. **SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set & codon information.** Cladistics 27: 171–180.

55. Wilson D. E. & Reeder D. M. 1993. **"Mammal Species of the World: A Taxonomic & Geographic Reference".** Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
56. Wood A. E. 1955. **A revised classification of the rodents.** J. Mammal. 36: 165–187.
57. Wood A. E. 1966. **Rodent**. Encyclopaedia Britannica. Inc.
58. Woods C. A. & Kilpatrick C. W. 2005. **Infraorder Hystricognathi Brandt 1855.** pp. 1538-1600 in: D. E. Wilson, and D. M. Reeder (eds.). Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. Baltimore: 2nd Ed. Johns Hopkins University Press.
59. Xia X. & Lemey P. 2009. **Assessing substitution saturation with DAMBE.** Pp. 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi & Anne-Mieke Vandamme, eds. The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA & Protein Phylogeny. 2nd edition Cambridge University Press.
60. Xia X., Xie Z., Salemi M., Chen L. & Wang Y. 2003. **An index of substitution saturation & its application.** Molecular Phylogenetics & Evolution 26: 1-7.
61. Zwickl D. J. & Hillis D. M. 2002. **Increased Taxon Sampling Greatly Reduces Phylogenetic Error.** Syst Biol. 51(4): 588-598

APENDICE 1. Extracción y precipitación de ADN

Extracción de ADN:

1. Colocar los trozos (2-3 mm^2) de tejido (hígado o músculo) en un tubo de 1,5 ml.
2. Agregar 500 µl de buffer de lisis y 15 µl de proteasa K.
3. Agitar (vortexear) la mezcla por 10 segundos y dejar en baño térmico durante toda la noche, a 56º C.
4. Vortexear nuevamente por 10 segundos y centrifugar.
5. Extraer pellet del tubo, escurriendo en las paredes del mismo.
6. Agregar al tubo 500 µl de fenol, cloroformo, y alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1.
7. Vortexear por 20 segundos hasta lograr una emulsión.
8. Centrifugar 3 minutos a 15.000 g.
9. Extraer con pipeta la parte superior sin tocar el fenol ni la interface, y depositar en un nuevo tubo. En caso de que la mezcla se note sucia se repiten los pasos de 6 a 9.

Precipitación:

1. Agregar al tubo 1 ml de etanol absoluto (o 500 µl de isopropanol).
2. Mezclar suavemente por inversión aproximadamente unas 50 veces.
3. Dejar, como mínimo, 45 minutos en el freezer.
4. Centrifugar 15 minutos a 15.000 g y volcar el sobrenadante.
5. Agregar 500 µl de etanol 70% y dejar reposar por 5 minutos en hielo.
6. Centrifugar 15 minutos a 15.000 g y volcar el sobrenadante.
7. Secar el tubo sobre una servilleta de papel y luego colocar en estufa a 37º C por 20 minutos, para que el tubo quede totalmente seco.
8. Resuspender en 20 µl de agua estéril.