

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)
TESIS PARA ACCEDER AL DOCTORADO

**Estructura y variabilidad genética de la loica
pampeana *Sturnella defilippii*:
Pautas para su conservación.**



Mag. Leticia Repetto

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y GENÉTICA:
GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN - IIBCE

Tutora de Tesis: Dra. Susana González

2017

Agradecimientos:

A mi Tutora Susana González, mi gran referente en el ambiente científico, gracias por brindarme siempre todo el apoyo, conocimientos, experiencia y motivación necesarias para seguir adelante en cada proyecto que he realizado.

A la Rufford Foundation, a través de Adrián Azpiroz, y al programa de PEDECIBA agradezco por el apoyo financiero brindado para poder realizar esta tesis.

A Adrián Azpiroz por el gran trabajo que ha venido realizando sobre la loica pampeana, mi agradecimiento por las muestras brindadas para este estudio y también por su experiencia y conocimientos dedicado en todo momento.

A Bettina Mahler y Alicia de la Colina del Laboratorio de Ecología y Comportamiento Animal (Universidad de Buenos Aires) por cederme un set de microsatélites testeados en *Molothrus bonariensis* para ser probados en *Sturnella Defilippii*.

A mi amiga Natalia Manisse que fue una gran guía e introductora en numerosas herramientas bioinformáticas para análisis de microsatélites, gracias por tu tiempo y buena voluntad.

A mi querida familia, en especial Nacho y Sofi, por tantas horas que me regalaron de su tiempo para dedicar a esta tesis, por todo el cariño, apoyo constante y motivación.

RESUMEN

La Loica pampeana *Sturnella defilippii* es un ave Neotropical globalmente amenazada y restringida a praderas abiertas del sudeste de América del Sur, catalogada como "Vulnerable" (UICN 2016). Desde 1900, ha sufrido una retracción de su distribución del 90% y reducción poblacional por el avance de actividades agrícola-ganaderas. En Uruguay se ha identificado una población relictual en Arerunguá (Dpto. de Salto). En Argentina existe otra población en Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires). El objetivo principal de la tesis fue caracterizar la estructura genética que presentan estas dos poblaciones de Loica pampeana y analizar la variabilidad genética que presenta la especie mediante dos tipos de marcadores moleculares: ADN mitocondrial y loci microsatélites. De esta forma generar información aplicable a su conservación.

Para ello se analizaron 44 individuos. A partir de secuencias mitocondriales *ND2* se determinaron 17 haplotipos ($Hd=0,87$) y una alta diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00391$) para las muestras de Arerunguá y Bahía Blanca. Los análisis filogenéticos evidencian una carencia de estructuración poblacional, y una red de haplotipos en forma radiada indican una expansión poblacional. Los resultados de AMOVA reafirman la baja estructura poblacional. Se estudió la posibilidad de una expansión poblacional reciente mediante estadísticos D de Tajima's y estadísticos de F_i y F_u 's, los cuales junto con un patrón de curva unimodal de distribución desigual apoyan la existencia de una expansión poblacional hace aproximadamente 59.187 años antes del presente (Pleistoceno).

Caracterización de 7 loci microsatélites para la Loica pampeana que presentan un valor de PIC informativo. Se determinó que las poblaciones se apartan del equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo no se detectó endogamia y la heterocigosidad tanto intra como inter-individual es elevada. El número efectivo estimado fue de 73 individuos, una cifra considerada como baja para asegurar la viabilidad poblacional en los próximos 100 años. El número de migrantes por generación entre ambas poblaciones fue de 2,57. No se observó evidencia de procesos de cuello de botella reciente debido a la abrupta reducción poblacional que ha estado sufriendo la especie. La especie aún retiene altos niveles de diversidad genética pero puede ser cuestión de unas pocas generaciones más para detectar procesos de endogamia y efectos de deriva génica en la especie. Para asegurar el acervo genético de la Loica pampeana deben considerarse prioritarios los programas de conservación tales como protección de áreas de nidificación de la especie.

INDICE

1	<u>CAPITULO I: ANTECEDENTES DE LA ESPECIE <i>STURNELLA DEFILIPPII</i></u>	7
1.1	ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS AVES EN URUGUAY	7
1.2	LOICA PAMPEANA <i>STURNELLA DEFILIPPII</i>	8
1.3	MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	9
1.4	ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE	12
1.5	POBLACIÓN DE LOICA PAMPEANA EN ARERUNGUÁ	15
1.6	GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	17
2	<u>CAPITULO II: OBTENCIÓN DE DATOS GENÉTICOS DE LA ESPECIE: ADN MITOCONDRIAL</u>	19
2.1	MARCADORES MITOCONDRIALES: GEN <i>ND2</i>	19
2.2	HIPÓTESIS	21
2.3	OBJETIVOS	21
2.3.1	OBJETIVO GENERAL	21
2.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.4	MATERIAL & MÉTODOS	22
2.4.1	MUESTRAS UTILIZADAS	22
2.4.2	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA AMPLIFICACIÓN DE REGIÓN <i>ND2</i>	23
2.4.3	ANÁLISIS GENÉTICOS PARA DISTINTAS POBLACIONES DE <i>STURNELLA DEFILIPPII</i>	24
2.4.4	HISTORIA DEMOGRÁFICA DE LA ESPECIE.	25
2.4.5	RED DE HAPLOTIPOS, ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y ESTRUCTURA FILOGEOGRÁFICA	27
2.4.6	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS ENTRE ESPECIES DENTRO DEL GÉNERO <i>STURNELLA</i>	28
2.4.7	CÁLCULO DEL TIEMPO DE DIVERGENCIA ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO <i>STURNELLA</i> .	30
2.4.8	FLUJO GÉNICO	31
2.5	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MITOCONDRIALES	31
2.5.1	EXTRACCIONES DE ADN CUANTIFICACIONES Y AMPLIFICACIONES	31
2.5.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GEN <i>ND2</i>	32
2.5.3	ÍNDICES DE DIVERSIDAD GÉNICA Y HAPLOTÍPICA	32
2.5.4	ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR	37
2.5.5	ANÁLISIS FILOGENÉTICO ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO <i>STURNELLA</i>	37
2.5.6	TIEMPO DE DIVERGENCIA ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO <i>STURNELLA</i> .	39
2.5.7	ANÁLISIS DE PROCESOS DEMOGRÁFICOS POBLACIONALES	40
2.5.8	ANÁLISIS DEMOGRÁFICO	42
2.6	DISCUSIÓN : ANÁLISIS A PARTIR DE DATOS MITOCONDRIALES	44
2.6.1	DIVERSIDAD GENÉTICA	44
2.6.2	RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPECIES INTEGRANTES DEL GÉNERO <i>STURNELLA</i> .	46
2.6.3	ESTRUCTURA POBLACIONAL Y FLUJO GÉNICO ENTRE LAS POBLACIONES	48
2.6.4	ANÁLISIS FILOGENÉTICO E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE LA ESPECIE	50
3	<u>CAPITULO III: OBTENCION DE DATOS GENETICOS DE LA ESPECIE: LOCI MICROSATÉLITES</u>	54

3.1	MARCADORES LOCI MICROSATÉLITES	54
3.2	HIPÓTESIS	56
3.3	OBJETIVOS	56
3.3.1	OBJETIVO GENERAL	56
3.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
3.4	SELECCIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES PARA LOICA PAMPEANA	57
3.5	MATERIAL & MÉTODOS	59
3.5.1	MUESTRAS UTILIZADAS	59
3.5.2	SELECCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SET DE LOCI MICROSATÉLITES	59
3.5.3	JUEGO DE CEBADORES DE LOCI MICROSATÉLITES TESTEADO	61
3.5.4	SEGUNDO SET DE MICROSATÉLITES TESTEADOS	62
3.5.5	OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE MICROSATÉLITES Y GENOTIPIFICACIÓN	64
3.6	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS POBLACIONALES	66
3.6.1	ERRORES DE GENOTIPADO	66
3.6.2	TEST DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	68
3.6.3	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	69
3.6.4	CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA Y PROBABILIDAD DE NO EXCLUSIÓN	70
3.6.5	ANÁLISIS DE PARENTESCO	71
3.6.6	ESTUDIO DE FILOPATRÍA Y DISPERSIÓN	74
3.6.7	NÚMERO EFECTIVO DE LA POBLACIÓN	76
3.6.8	ANÁLISIS DE PROCESOS DE CUELLO DE BOTELLA	76
3.6.9	NÚMERO DE MIGRANTES	77
3.7	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE MARCADORES LOCI MICROSATÉLITES	78
3.7.1	PANEL DE MICROSATÉLITES SELECCIONADO PARA LOICA PAMPEANA	78
3.7.2	CARACTERIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES EN LOICA PAMPEANA: ERRORES DE GENOTIPADOS	79
3.7.3	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	83
3.7.4	DIVERSIDAD ALÉLICA Y PIC PARA TODAS LAS MUESTRAS	85
3.7.5	EQUILIBRIO DE H-W Y ESTADÍSTICOS F	88
3.7.6	ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA LOICA PAMPEANA	89
3.7.7	ANÁLISIS DE CUELLO DE BOTELLA.	96
3.7.8	COMPOSICIÓN GENÉTICA DE GRUPOS	97
3.8	DISCUSIÓN DE ANÁLISIS SEGÚN LOS MARCADORES MICROSATÉLITES	101
3.8.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>LOCI MICROSATÉLITES</i> Y VARIABILIDAD GENÉTICA DETECTADA	101
3.8.2	ANÁLISIS DE SUB-ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL	103
3.9	ANÁLISIS GENÉTICO MEDIANTE MARCADORES CON DISTINTA TASA DE EVOLUCIÓN	108
3.10	IMPLICANCIAS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA LOICA PAMPEANA	109
3.11	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES	113

4 BIBLIOGRAFÍA **116**

ANEXO I – EJEMPLARES MUESTREADOS **143**

ANEXO II – FRECUENCIAS Y TAMAÑOS **145**

1 CAPITULO I: ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *Sturnella defilippii*

1.1 Estado de Conservación de las aves en Uruguay

El Uruguay alberga una importante biodiversidad, tanto a nivel eco-regional como eco-sistémico, específico y genético. Aproximadamente el 90% del territorio posee aptitud para la agricultura o ganadería. Los avances de estas actividades han provocado la modificación y fragmentación de los ecosistemas y los pastizales presentan síntomas claros de pérdida de especies y/o ecotipos, invasión de especies foráneas, así como degradación edáfica, debido al pastoreo excesivo del ganado y la conversión de hábitats naturales para la actividad agrícola (Uruguay-MVOTMA 2005).

La avifauna del Uruguay está compuesta por unas 435 especies (Arballo & Cravino 1999, Claramunt & Cuello 2004, Azpiroz *et al.* 2012b). A nivel global, 40 de estas especies se encuentran amenazadas y/o casi amenazadas (Azpiroz *et al.* 2012b), siendo la mayoría, aves de pastizal, muchas de las cuales son exclusivas del bioma de “Pampas”. La explotación agrícola y ganadera intensiva y el desarrollo de este ecosistema han contribuido a la disminución de varias de estas especies (Bucher & Nores 1988; Vickery *et al.* 1994, 1999; Azpiroz *et al.* 2012b). Esto conlleva a un desequilibrio ecológico importante. Por ejemplo, uno de los tantos aspectos negativos que provoca es que ha contribuido a la expansión del rango y aumento en los números de Tordos (*Molothrus bonariensis*). Este parásito de cría puede afectar negativamente a las poblaciones decrecientes de especialistas en pastizales como la loica pampeana, viudita blanca grande (*Xolmis dominicanus*) y el tordo amarillo o dragón (*Xanthopsar flavus*) (Azpiroz 2000; Gabelli *et al.*, 2004; Zalba & Cozzani 2004; Azpiroz 2012).

Para mantener los niveles de biodiversidad es muy importante mantener el hábitat a las poblaciones de varias especies de interés global para su conservación, dentro de las cuales se encuentra la loica pampeana (*Sturnella defilippii*), asegurándoles una protección ante la amenaza que representa el avance de la frontera agrícola-ganadera.

1.2 Loica pampeana *Sturnella defilippii*

La loica pampeana es un ave que habita en la región biogeográfica Neotropical restringida a praderas abiertas del sudeste de América del Sur (Azpiroz 1997; Jaramillo & Burke 1999; Azpiroz *et al.* 2012a). La retracción de su hábitat sumada a la baja abundancia y las tendencias de transformación de los pastizales naturales de los que depende, justificaron su inclusión en la categoría de especie "Vulnerable" (Cozzani *et al.* 2004; BirdLife International, 2017). Su área de distribución original ha sufrido una reducción del 90% desde 1900 a consecuencia principalmente de la expansión agrícola (Tubaro & Gabelli 1999). Hasta hace poco la única población reproductiva conocida de la especie se encontraba en el Sur de Provincia de Buenos Aires, Bahía Blanca, Argentina (Tubaro & Gabelli 1999). Azpiroz (2005) comprobó la nidificación en Salto, Uruguay, y estimó entre 78 a 90 parejas a la población existente en esa zona, observando cinco grupos integrados por entre 3 y 25 parejas. Mediante observaciones de campo anuales y anillamiento de pichones, que ha tenido la especie, hoy en día se estima que la población estaría comprendida por aproximadamente 200-260 parejas (Azpiroz *et al.* 2012b).

1.3 Morfología y características biológicas

La loica pampeana presenta un marcado dimorfismo sexual y comportamiento gregario, tanto durante la época reproductiva como no reproductiva. Mide aproximadamente 19 cm y es muy similar a la loica común (*Sturnella loyca*), aunque de menor tamaño. Las tapadas alares son de color negro; garganta, pecho, vientre y hombros son colorados y presenta una ceja bien marcada blanca (Fig. 1). El pico y la cola son más cortos que la loica común. La hembra y los juveniles son más pardos y con menos colorado en el vientre y la garganta que el macho (Jaramillo & Burke 1999; Azpiroz 2012a).

Durante la época de nidificación forma grupos reproductivos donde las parejas ocupan áreas relativamente localizadas, mientras que en la época no reproductiva realizan movimientos locales o regionales en bandadas (Azpiroz & Cozzani 2017). La loica pampeana es de carácter arisco, poco confiada, y las bandadas suelen incluir individuos centinelas que posan en los puntos elevados, mientras el resto se alimenta en el suelo. Su alimento se basa principalmente de insectos y larvas que encuentra en el suelo de los pastizales, así como también de semillas (Azpiroz & Cozzani 2017). El nido es construido en la base de las matas de pasto, muy oculto. Arma una semiesfera con hierbas y coloca 3 o 4 huevos grises con manchas oscuras (Fig. 1). Los pichones permanecen en el nido alimentados por los padres hasta que completan el plumaje definitivo y se unen a las bandadas junto con los adultos (Azpiroz 2005). La principal causa de pérdida de nidadas es la depredación (Cozzani *et al.* 2004), y entre los depredadores potenciales se encuentran diversos mamíferos, culebras y aves rapaces, entre otros. Se han confirmado solo algunos casos de parasitismo de cría por Tordo Común (Azpiroz 2015).

Esta especie considerada actualmente rara se encuentra en disminución notable ya que su hábitat se encuentra en constante regresión y su distribución es actualmente muy restringida (Azpiroz & Cozzani 2017).



Figura 1. Primer figura a la izquierda corresponde a un macho de loica pampeana, la segunda corresponde a un nido con puesta típica de tres huevos y la tercera corresponde a un volantón anillado. Fotos de Adrián Azpiroz.

La loica pampeana habita en remanentes de pastizales naturales en buen estado de conservación dominados por *Stipa* spp. (Cozzani *et al.* 2004). En Uruguay los sitios utilizados se caracterizan por una altura del pastizal que no suele superar los 50 cm de alto, al menos en los sectores de los potreros efectivamente ocupados por la especie (Azpiroz & Blake 2016). En la región de Bahía Blanca, en sitios utilizados por grupos reproductivos, se han registrado alturas promedio de vegetación nativa de 34.52 cm (Tubaro & Gabelli 1999) y 27.33 cm (Fernández *et al.* 2003).

Estudios realizados sobre asociaciones de aves de pastizal con la estructura de la vegetación en campos del norte de Uruguay, mostraron que la loica pampeana presenta una fuerte afinidad con la cobertura de los pastizales, en particular pastizales naturales (Azpiroz & Blake 2016).

El período de nidificación se extiende de octubre a diciembre, siendo algo más temprano en Uruguay (Azpiroz 2005) y más tarde en Argentina (Gochfeld 1979; Cozzani *et al.* 2004). El nido consiste en una copa abierta construido en el suelo y oculto bajo el pasto. En enero, al final de la temporada de cría, los individuos se congregan en grandes bandadas, de aquí en más referidos como grupos no reproductivos, hasta llegada la primavera (Tubaro & Gabelli 1999).

Los machos emiten un canto característico en vuelo acompañado de un despliegue aéreo que se eleva a unos 5-10 metros, lo cual puede repetir hasta 250 veces en una mañana; esto funcionaría para defender el territorio y para atraer a la pareja (Gochfeld 1978; Cozzani *et al.* 2004). Estos cantos en vuelo de los machos presentan variaciones significativas que permite diferenciarlos individualmente (Tubaro 1999).

1.4 Estado de conservación de la especie

El área de distribución de la especie se estima que se ha reducido en un 90% desde 1900 (Tubaro & Gabelli 1999). En general, las extinciones locales habrían ocurrido entre 1890 y 1950, asociadas a la expansión agrícola en la región (Tubaro & Gabelli 1999; Azpiroz *et al.* 2012b). En Argentina se la considera una especie "En Peligro" (López-Lanús *et al.* 2008). Se estima que la población es menor a 2.500 individuos maduros con una disminución del 20% en 5 años o 2 generaciones correspondiente a la categoría "En Peligro" de la UICN. Según la nueva lista roja de Argentina ("Categorización de las Aves de la Argentina", 2015) esta categoría se mantiene (EN - A4ac, B1ab(i,ii), C1) (MAyDS y AA, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable y Aves Argentina 2017). Categorización de las Aves de la Argentina (2015).

En Argentina existen registros en las provincias de San Luis, Córdoba, Santa Fe, Corrientes y Entre Ríos, principalmente históricas y en invierno, que sugerían movimientos post reproductivos (Chebez & Tubaro 2008). Actualmente sólo se ha confirmado su presencia en el sudoeste de Buenos Aires y este de La Pampa (Meriggi *et al.* 2013, 2014, Cozzani *datos no publicados*).

La mayor población de loica pampeana se encuentra en la región de Bahía Blanca, y desde 1990 se observa una fuerte reducción poblacional tanto en la extensión de la presencia como en el área de ocupación (Tubaro & Gabelli 1999; Meriggi *et al.* 2013; 2014). En 1996, se estimaron 7.500 individuos (Tubaro & Gabelli 1999), pero estudios posteriores observaron una retracción significativa del área de distribución de la especie (Gabelli *et al.* 2004; Fernández *et al.* 2004) y no fue registrada en un 40-60% de los sitios ocupados en el pasado.

La cantidad de ejemplares observados en campañas recientes (2012 y 2013 respectivamente) estiman un 10% menos que los registros de 1996 (Meriggi *et al.* 2013; 2014). Además, se ha estudiado que entre 2003 y 2013 las poblaciones del sur de Buenos Aires poseen un bajo éxito reproductivo (Cozzani *et al.* 2004, Cozzani *datos no publicados*) y recientemente se detectó mortandad de adultos por ahogamiento en tanques australianos (Cozzani *datos no publicados*) debido al aumento de la temperatura registrado en la región, causas del cambio climático.

Por otra parte la población de Uruguay también habría sufrido una reducción importante recientemente y en la actualidad es probable que represente un 5-10% o menos de la población global (Azpiroz & Cozzani 2017). A pesar de que se la consideraba una especie rara (Collar *et al.* 1992) o incluso virtualmente extinta en el país, los numerosos registros históricos y comentarios de naturalistas (Burmeister 1861, Aplin & Sclater 1894) sugieren que se trataba de una especie común y ampliamente distribuida.

En la región de Arerunguá, Uruguay, se estimó como primera aproximación un tamaño poblacional de 79-80 parejas (Azpiroz 2005) y estudios posteriores en la misma región elevaron esa cifra a 150-200 parejas (Azpiroz *et al.* 2012a). La densidad poblacional estimada fue de 0,14 individuos/ha (Azpiroz & Blake 2009). Otros registros reportan dos núcleos poblacionales en Tacuarembó y Flores (S. Carvalho & J. C. Rudolf *datos inéditos*), lo que sumaría unas 50-60 parejas más (Azpiroz & Cozzani 2017).

Los últimos registros en Arerunguá no son muy alentadores, en 2016 se registraron pocos individuos (n=10), y en un relevamiento del 2017 en temporada invernal también se registró una reducción poblacional muy

significativa. En la temporada reproductiva de 2017 se encontraron unas 15-20 parejas, un panorama más positivo que el del año anterior pero aún muy por debajo de los números poblacionales registrados entre 2008 y 2015 (Azpiroz & Cozzani 2017).

Las poblaciones uruguaya y argentina (Bahía Blanca y Arerunguá) estarían aisladas en la actualidad por unos 900 km. Con respecto a otras poblaciones, existe un registro reciente en el sureste de Corrientes y otro algo más antiguo (invierno 1986) al este de Entre Ríos (Collar *et al.* 1992); estas localidades distan unos 200 km de las poblaciones uruguayas más cercanas. Dado que estas áreas no están conectadas por hábitat preferencial (pastizal natural) las probabilidades de intercambio de individuos son escasas. En el pasado las poblaciones del norte de Uruguay seguramente estuvieron en contacto con las del sur de Brasil, pero en la actualidad se la considera extinta en Rio Grande do Sul (Bencke *et al.* 2003).

Se sugirió por mucho tiempo que la especie tenía hábitos migratorios, al menos parcialmente (Aplin & Sclater 1894), y que los registros en Uruguay y Brasil podrían corresponder a visitantes invernales (Collar *et al.*, 1992). Sin embargo, la evidencia concreta al respecto es limitada. Se ha observado que la especie era más frecuente en la parte norte de su área de distribución en invierno y también se han registrado bandadas en las áreas de reproducción en el mismo periodo, por lo cual, no toda la población se estaría desplazando (Tubaro & Gabelli 1999).

Por último, en el caso de Uruguay al menos, conteos regulares y datos generados a través del anillamiento de ejemplares en Arerunguá muestran que la población permanece en el área durante todo el año (Azpiroz & Cozzani 2017). Aunque diversas fuentes han interpretado los registros más

septentrionales de la especie (en Corrientes, Uruguay y Brasil) como relativos a migrantes invernales (Collar *et al.*, 1992; Azpiroz 2005; Chebez & Tubaro 2008) no existe información concluyente que confirme el comportamiento migratorio (Tubaro & Gabelli 1999).

1.5 Población de loica pampeana en Arerunguá

La región de Arerunguá, es una de las 10 Áreas Prioritarias designadas por el Proyecto de Producción Responsable del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. El APA (Área Prioritaria Arerunguá) abarca aproximadamente 181.106 hectáreas de suelos superficiales en el departamento de Salto, Uruguay (Gonzalez & Sans 2009).

El ecosistema dominante es el de praderas naturales que ocupan el 95% de la superficie, con un tapiz herbáceo de gran diversidad de especies, que da lugar a excelentes campos de invernada ganadera. Desde el punto de vista de la biodiversidad, se destaca la presencia en la zona de especies muy importantes desde el punto de vista de la conservación. Se han registrado especies indicadoras del estado de conservación de los pastizales como los chorlos y playeros migratorios (*Charadriidae* spp. y *Scolopacidae* spp), y de distribución restringida como la loica pampeana, o emblemática como el “venado de campo” (*Ozotoceros bezoarticus arerunguayensis*) (Gonzalez & Sans 2009).

A partir del 2008 comenzaron en áreas de Arerunguá una serie de Proyectos (Proyectos de Producción Responsables), financiado por Banco Mundial - MGAP. Estos proyectos involucraron productores rurales y pobladores locales incorporando prácticas de manejo de la producción agropecuaria

conjuntamente con la biodiversidad, así como indicadores económicos que permitan evaluar iniciativas como la certificación de productos y otras actividades como el ecoturismo. Su objetivo es promover prácticas que integren el manejo integrado de los recursos naturales y la biodiversidad de manera sostenible.

Para el diseño de estos proyectos demostrativos de conservación y manejo de los recursos naturales se trabajó con un equipo técnico capacitado, entrenado y con experiencia de campo, dirigido y planificado por la Dra. Susana González. Como parte del equipo técnico el Dr. Adrián Azpiroz (biólogo especializado en ecología y conservación), responsable del relevamiento de aves, estuvo a cargo del Proyecto Predial en la estancia "El Silencio", donde se encuentra buena parte de la población uruguaya de loica pampeana, y allí se efectuaron acciones de manejo para la conservación de esta especie. Se encontró que la misma ocupa campos pastoreados por ovejas y vacunos y en menor medida campos con venado de campo y vacunos. Utiliza lugares de pastos más altos para nidificar, mientras que se alimenta en áreas circundantes de vegetación rala. Específicamente en la estancia "El Silencio" se recomendó un determinado manejo del ganado, dejando potreros sólo con vacunos y otros con pastoreo conjunto de ovinos con bovinos. En el potrero donde sólo pastorearon bovinos, fue ocupado por unas 25 parejas de loica pampeana luego de implementado el cambio, destacándose este manejo como una de las formas importantes de contribuir a la preservación de la especie (González & Sans 2009).

Se lograron importantes avances en el conocimiento de la historia natural y ecología de la loica pampeana, haciendo falta aún analizar su aspecto genético, con el fin de comprender las posibilidades de supervivencia de una población pequeña y aislada, siendo esto fundamental para un manejo eficiente de la población.

1.6 Genética de la Conservación

Para el manejo de especies amenazadas es fundamental apuntar a conservar el *pool* génico (Lettink *et al.* 2002). Para ello se deben conocer una serie de características biológicas como son la demografía y la historia de vida. A su vez es necesaria la comprensión de las relaciones genéticas entre los individuos de una población así como los niveles de diversidad actuales. La conservación de las especies con poblaciones fragmentadas y en peligro de extinción requiere un conocimiento previo y profundo de su dinámica y estructura metapoblacional, lo cual supone la determinación de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Los marcadores moleculares nos permiten, por ejemplo, identificar poblaciones con una diversidad genética reducida y generalmente más vulnerables a un posible cambio ambiental, así como distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto para dirigir los esfuerzos de conservación hacia ellas. Del mismo modo, permiten descubrir genealogías génicas y conocer el grado de parentesco entre individuos a fin de programar cruzamientos que prevengan niveles de consanguinidad altos que puedan llevar a la depresión endogámica y su posible extinción, etc. (González & Duarte 2003).

Los marcadores moleculares juegan un importante rol en la estimación de las relaciones entre los individuos, comparando los genotipos por el número de loci polimórficos. Existe muchos marcadores moleculares pero ninguno de ellos es óptimo para todas las aplicaciones (González & Duarte 2003). Muchos de los estudios en sistemática y filogenética han utilizado secuencias de ADN

mitocondrial. Sin embargo, la filogenia mediante ADNmt representa solo la genealogía de un gen en particular que solo es heredado por vía materna. Por lo tanto marcadores adicionales cuyo objetivo es el ADN nuclear, como los RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) o los loci de microsatélites necesitan ser empleados para una interpretación más precisa de la genética de poblaciones, biodiversidad, filogenia, entre otros estudios (Ibrahim *et al.*, 2011).

2 CAPITULO II: OBTENCIÓN DE DATOS GENÉTICOS DE LA ESPECIE: ADN MITOCONDRIAL

2.1 Marcadores mitocondriales: gen ND2

El genoma mitocondrial es la molécula más conocida de ADN eucariota (Shields & Helm-Bychowski 1988). Este pequeño genoma extranuclear de aproximadamente 16.000 pares de bases (Awise 1995) tiene una mayor tasa de mutación, unas diez veces más rápida, que los genes nucleares; en particular en su región de control o *Dloop*, no codificante (Ryder & Fleischer 1996). Los marcadores asociados al ADN mitocondrial han mostrado tener suficiente variación entre especies, permitiendo realizar determinaciones taxonómicas utilizando un conjunto de variantes suficientemente homogéneas dentro de una especie (Awise 1995). El ADN mitocondrial sigue siendo uno de los marcadores moleculares más utilizados para reconstruir la filogenia y la filogeografía de aves estrechamente relacionadas (Nabholz *et al*, 2016).

Los principales usos de secuencias de ADN mitocondrial en genética de la conservación incluyen estudios de estructura poblacional, resolución de taxonomías, establecimiento de la hibridación interespecífica y la detección de la caza ilegal y la caza furtiva de animales en peligro. Asu vez, la selección de la herramienta bioinformática apropiada desempeña un papel muy importante para una inferencia filogenética fiable mediante el uso de marcadores mitocondriales (Khan *et al*. 2008).

Para el estudio de ambas poblaciones de loica pampeana se escogió el gen mitocondrial ND2 (*codificante de la enzima NADH deshidrogenasa*). Esta región es utilizada en un gran número de estudios genéticos y filogenéticos en

diversas especies de aves, para estudiar tanto relaciones entre poblaciones como entre especies cercanamente relacionadas (Sorenson *et al.* 1999; Johnson & Lanyon 1999; Powel *et al.* 2013; Zink *et al.* 2006; Lacerda *et al.* 2007).

Todos los genes de las proteínas mitocondriales presentan iguales tasas de sustitución en la 3er posición del codón, pero lo que varía en gran medida es la tasa de sustitución aminoacídica (Sorenson 2003). Por lo tanto, todos los genes de las proteínas mitocondriales proporcionan información similar (por par de bases secuenciadas) para los taxones estrechamente relacionados (por ejemplo, los individuos dentro de una especie) que difieren principalmente en las 3ras posiciones de codones degenerados (Sorenson 2003). Para taxones más alejadas (incluidas las especies dentro de un género, e incluyendo comparaciones entre órdenes aviares), los genes mitocondriales más variables acumulan más variación informativa en 1er y 2do codón, mientras que las 3ras posiciones van acumulando múltiples sustituciones (es decir, homoplasia) en todos los genes (Sorenson 2003).

En términos de secuencia aminoacídica, *ND2* es el 3er gen más variable después del gen *ATPasa8*, el cual es muy pequeño (~165-168 bp) por lo que provee poca información. *ND6* también es relativamente pequeño (~519-522 bp) y generalmente más difícil de amplificar debido a la composición y localización cercana a la región control mitocondrial (Sorenson 2003). En contraste, el gen completo *ND2* puede ser amplificado completamente o en dos fragmentos con primers que funcionan bastante bien para todas las aves (L5216-H6313 para todo el gen; L5216-H5766 y L5758-H6313 para amplificarlo en dos fragmentos) (Sorenson 2003).

2.2 Hipótesis

- A- Existe estructuración poblacional de loica pampeana en las localidades de Arerunguá y Bahía Blanca.
- B- Estas poblaciones presentan reducción de la variabilidad genética debido a una abrupta declinación poblacional.
- C- La población global de la especie sufrió un cuello de botella reciente.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Caracterizar la estructura genética de las poblaciones de loica pampeana de Arerunguá y Bahía Blanca con el fin de determinar si la declinación del tamaño poblacional ha dejado señales genéticas y analizar su impacto en la conservación de la especie.

2.3.2 Objetivos específicos

- a- Estimar el grado de variabilidad genética de la loica pampeana.
- b- Analizar si existe estructuración genética poblacional de la loica pampeana.
- c- Analizar si los procesos demográficos recientes han afectado a las poblaciones de la especie.
- d- Estimar el número efectivo poblacional y el número de migrantes por generación entre las poblaciones.

- e- Determinar las relaciones filogenéticas entre la especie y otras especies de aves de pastizal emparentadas dentro de la familia *Icteridae* mediante secuencias del gen *ND2* disponible en el *GenBank*.

2.4 Material & Métodos

2.4.1 Muestras utilizadas

En total se colectaron 75 muestras de loica pampeana (Anexo 1). De este total, 50 muestras pertenecen a ejemplares de loica pampeana muestreadas por Adrián Azpiroz (Arerunguá, departamento de Salto, Uruguay) desde el año 2008 al 2013. 16 muestras fueron colectadas de Bahía Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina) por Natalia Cozzani del año 2013, en el marco de estudios de nidificación sobre esta población (Cozzani *et al.* 2004).

Todas las muestras utilizadas pertenecen a pichones anillados, individuos adultos y huevos de un nido abandonado; las muestras pertenecientes a pichones y adultos corresponden a plumas o sangre. Se tomó además una muestra de músculo de un ejemplar de loica común (*Sturnella loyca*) (Anexo 1).

Se tomaron también 9 muestras de loica pampeana de ejemplares del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN-MEC) pertenecientes a distintas localidades de Uruguay que comprenden el rango histórico de distribución de las especies. Se tomaron muestras de pluma y muestras de "plantilla del pie" (*toe pad*) para cada ejemplar (n=7).

Este material junto a su ficha técnica (la cual incluye fecha de toma de muestra, anillo, sexo del individuo, entre otras), se encuentra depositado en el

laboratorio de Genética de la Conservación del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE (Anexo 1).

2.4.2 Diseño experimental para la amplificación de región *ND2*

La extracción de ADN de tejidos (sangre y plumas) se realizó utilizando el protocolo del kit comercial Quick-DNA™ Universal Kit de Zymoresearch (Nº de catálogo D4068). Para la extracción de ADN genómico de las muestras de museo se utilizó el protocolo de DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen (Nº de catálogo 69504) adicionándole DTT y un paso más con Proteinasa K. Se verificó la calidad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE 1X (0.8 microgramos de agarosa 1X y 80ml de buffer TBE 1X) y SYBR® Safe de Thermofisher (Nº de catálogo S33102). La concentración de ADN fue evaluada en nanogramos por microlitros mediante espectrofotómetro Invitrogen™ Qubit™ 2.0.

Para la amplificación del fragmento del gen *ND2* de aproximadamente 1041 pares de bases se emplearon los siguientes cebadores: L5216 5`CCCATACCCCGAAAATGATG 3` y H6313 5` CTCTATTTAAGGCTTTGAAGGC 3` (Sorenson 2003). La elección de amplificar una región más grande de ADN mitocondrial se realizó para evitar la amplificación de *Numts* (copias de ADN mitocondrial encontrado en el ADN nuclear) (Sorenson 2003). Se realizó la secuenciación Forward y Reverse para cada muestra de manera de confirmar los cambios detectados. En casos dudosos (sobre todo en zona de repetidos), se re-secuenció la muestra para confirmación de los cambios nucleotídicos.

La reacción de PCR consistió de: 6,25µl de Master Mix ImmoMix (BIO-25020, Boline), 0.4µM final de cada cebador F y R, 5ng de ADN y el resto de Agua ultrapura hasta completar 12,5µl de reacción.

La misma se lleva a cabo mediante el siguiente ciclado: 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos a 72°C, en termociclador *Veriti* (Thermofisher). Los fragmentos amplificados fueron verificados mediante corridas electroforética en un gel de agarosa al 1%.

La purificación del amplificado se realizó mediante el kit DNA Clean & Concentrator™-5 de Zymoresearch (N° de catálogo D4013). La reacción de secuenciación se realizó con el kit Big Dye v3.1 de *Thermofisher* (N° de catálogo 4337455) en 5µl finales: 2,5µl de Big Dye v3.1, 0,5µl de Primer F o R, 2µl de agua ultrapura y 1µl de producto de PCR purificado.

La secuenciación automática, del fragmento mitocondrial se realizó en el equipo de secuenciación capilar *ABI 3500xl (Genetic Analyzer)*, mediante el protocolo estándar de secuenciación.

2.4.3 Análisis genéticos para distintas poblaciones de *Sturnella defilippii*

Las secuencias obtenidas fueron corregidas mediante el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2007). Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para la especie, fueron calculados mediante el programa Arlequín versión 3.5, (Excoffier 2004). Se determinaron sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H) (Nei 1987; Schneider *et al.* 2000) y diversidad nucleotídica (Tajima 1983).

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre haplotipos se realizó empleando el software MEGA 6.0, según el método de "Máxima Verosimilitud". Este emplea modelos probabilísticos para seleccionar el mejor árbol, es decir, aquel árbol que tenga la más alta probabilidad (verosimilitud) de reflejar el proceso evolutivo real. El modelo de máxima verosimilitud es un método exhaustivo que busca todas las posibles topologías y considera cada posición en un alineamiento (no sólo sitios informativos) (Kishino & Hasegawa 1989).

2.4.4 Historia demográfica de la especie.

La asociación de un haplotipo común con otros de frecuencias más bajas o haplotipos privados, es un patrón frecuentemente atribuido a poblaciones que han experimentado recientemente una expansión demográfica (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992).

El programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009) se utilizó para calcular estadísticos de F_u y F^* y D^* que son las pruebas de neutralidad más sensibles a antecedentes de selección (Fu & Li 1993; Fu 1997). Estos se utilizan para evaluar la hipótesis nula de neutralidad en el proceso de evolución de un marcador molecular, siendo sensible al apartamiento del equilibrio demográfico (Aris-Brosou & Excoffier 1996; Fu 1997). Los test estadísticos F^* y D^* de Fu & Li (1993) compara el número de sitios segregantes en la muestra y el promedio de diferencias pareadas y supone que los dos parámetros deberían obtener el mismo valor en un modelo sin recombinación. Las diferencias encontradas se le atribuyen a los efectos de la selección, circunstancias demográficas como un cuello de botella o una expansión demográfica. Un valor negativo indica exceso de "singletons" (SNP presente solo una vez en la

muestra) y un valor positivo una carencia de *singletons*. El valor negativo indicaría una fuerte selección (y crecimiento poblacional). Las poblaciones que pasan por un golpe de selección tienden a generar exceso de *singletons*, y en estos casos el test estadístico de Fu & Li es más sensible que otros test, tal como el test de neutralidad D de Tajima (McVean 2002). De todas formas en el programa DnaSP v5 también se calcularon: test de neutralidad D de Tajima (Tajima 1989) (valores negativos y significativos sugieren expansión poblacional) y el índice S de Strobeck (Strobeck 1987) (valores positivos sugieren expansión poblacional).

El programa DnaSP 5 (Librado & Rozas 2009) evalúa la importancia de estos análisis comparando las estadísticas observadas con una distribución de valores generados con 5000 simulaciones coalescentes. La historia demográfica de las poblaciones se examinó utilizando la frecuencia de distribución de número de desajustes entre secuencias pareadas, y mediante el modelado de las distribuciones esperadas en los escenarios demográficos de tamaño de población constante.

Por otro lado, con el mismo software, se calculó también el "*mismatch distribution*", que es la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos; aquellas poblaciones en equilibrio demográfico muestran una distribución multimodal, mientras que una distribución unimodal se interpreta como una expansión demográfica reciente (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992) o un rango de expansión con altos niveles de migrantes entre *demes* vecinos (Excoffier 2004).

Los cambios demográficos también se examinaron mediante el cálculo del índice "*Raggedness*" de Harpending (Harpending *et al.* 1993) y la suma de desviaciones cuadráticas (SSD) entre el desajuste observado y esperado para

la Loica pampeana, ambas calculadas usando los métodos de Schneider & Excoffier (1999) mediante el software Arlequín versión 3.5. Un resultado no significativo indica una población en expansión (Harpending 1994).

El modelo de Rogers & Harpending (1992) se utilizó para calcular el tiempo transcurrido desde la expansión de la población mediante la estimación de Tau (τ), θ_0 y θ_1 basado en los resultados de la distribución desigual de Arlequin v3.5. El parámetro τ , calculado a partir del “*mismatch distribution*”, fue utilizado para estimar el tiempo transcurrido desde la expansión (t) utilizando la ecuación $t = \tau / 2\mu$, donde μ es la tasa de mutación por secuencia por generación (Rogers 1995; Schneider & Excoffier 1999).

2.4.5 Red de haplotipos, análisis filogenéticos y estructura filogeográfica

Una forma de inferir la genealogía intraespecífica es usando el algoritmo para construcción de “Red de haplotipos” (*Minimum spanning networks trees*, MSTs) (Kruskal 1956), para lo cual se empleó también el software PopART (Bandelt *et al.* 1999). Mediante el software Arlequín v3.5 también se realizaron análisis filogenéticos para el conjunto de secuencias clasificándolas por el algoritmo de “Máxima Verosimilitud” a partir de la matriz de distancias genéticas, empleado el método de sustitución nucleotídica de Kimura 2Parámetros (Kimura 1980). Los datos de secuencias pueden analizarse mediante algoritmos de parsimonia o de máxima verosimilitud (“*Maximum Likelihood*”), a partir de los cuales se obtienen árboles filogenéticos (Soltis *et. al.*, 1998).

La diferenciación geográfica de haplotipos fue cuantificada usando el análisis jerárquico de varianza (AMOVA), evaluado en permutaciones aleatorias múltiples (Excoffier *et al.* 1992; Schneider *et al.* 2000). Se ejecutaron 1000 procesos de “anidamiento” simulado para cada valor de K, registrándose los valores de varianza genética *Fst*. Este programa utiliza las frecuencias haplotípicas y el número de mutaciones entre haplotipos para testear la significancia de los componentes de la varianza molecular asociados con diferentes niveles jerárquicos. El mismo distribuye la variación total en diferentes componentes de covarianza debido a las diferencias inter-individuales y/o de las diferencias inter-poblacionales (Excoffier *et al.* 1992; Schneider *et al.* 2000).

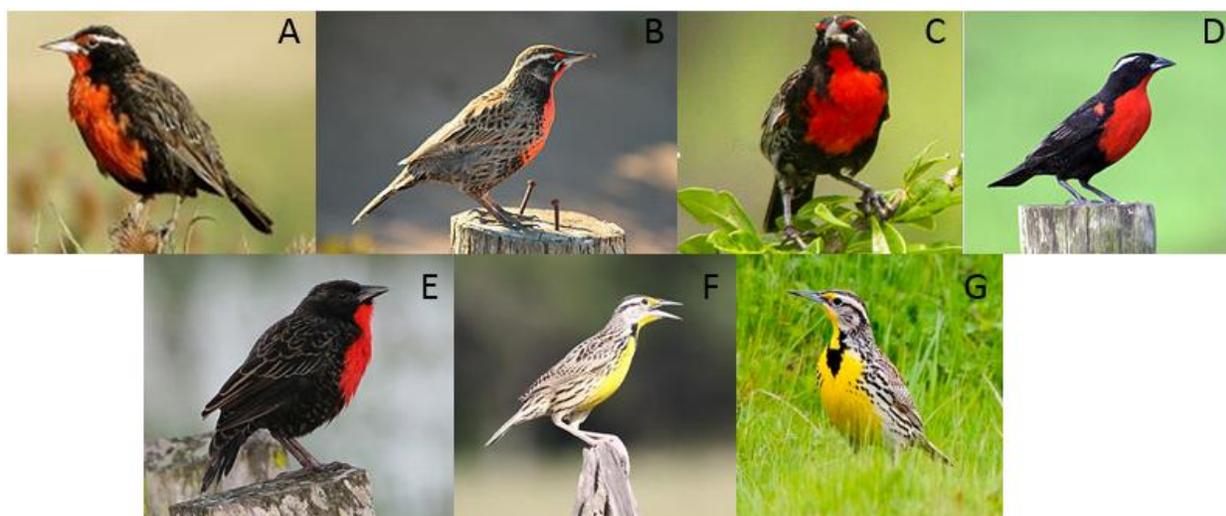
2.4.6 Análisis filogenéticos entre especies dentro del género *Sturnella*

Se realizó un análisis genético para estudiar las relaciones filogenéticas de la loica pampeana con las demás especies dentro del género *Sturnella*, con todas las secuencias reportadas para ND2 en GenBank. En la Tabla 1 se presenta información básica de las especies que componen el género *Sturnella* y en la figura 2, las 7 especies integrantes del género *Sturnella*.

Tabla 1. Información de las especies pertenecientes al género *Sturnella*, área de distribución y clasificación según la lista roja (IUCN, Red List, 2014).

Especie	Área de cría	Clasificación según Red List
<i>Sturnella defilippii</i>	Argentina; Brasil; Uruguay	Vulnerable (VU)
<i>Sturnella loyca</i>	Argentina; Chile; Islas Malvinas	Least concern (LC)
<i>Sturnella bellicosa</i>	Chile; Ecuador; Peru	Least concern (LC)
<i>Sturnella superciliaris</i>	Argentina; Bolivia, Brasil; Chile; Paraguay; Peru; Uruguay	Least concern (LC)
<i>Sturnella militaris</i>	Bolivia, Brasil; Colombia; Costa Rica; Ecuador; Guyana Francesa; Panama; Peru; Suriname; Trinidad y Tobago; Venezuela, Boliva	Least concern (LC)
<i>Sturnella magna</i>	Belice; Brasil; Canada; Colombia; Costa Rica; Cuba; El Salvador; Guyana Francesa; Guatemala; Honduras; Mexico; Nicaragua; Panama; Suriname; Estados Unidos	Least concern (LC)
<i>Sturnella neglecta</i>	Canada; Mexico; Estados Unidos	Least concern (LC)

Figura 2. Se presentan imágenes de las 7 especies integrantes del género *Sturnella*. A: *S. defilippii*, B: *S. loyca*, C: *S. bellicosa*, D: *S. superciliaris*, E: *S. militaris*, F: *S. magna*, G: *S. neglecta*



Con las secuencias reportadas en GenBank se construyó un árbol mediante Test de Máxima Verosimilitud, el apoyo de los nodos fue evaluado mediante bootstrap no paramétricos (Felsenstein 1985).

Cabe destacar que en las últimas décadas se incluyeron a los pecho colorados de Sudamérica con el género de los pecho amarillo de Norteamérica dentro del género *Sturnella*. Recientemente (Powell *et al.* 2014) mostraron que estos dos grupos no están tan cercanamente emparentados como se creía (o sea

no se pueden agrupar en *Sturnella*). Para ellos se propuso utilizar *Leistes* (un taxón ya existente pero en desuso) para agrupar los "viejos *Sturnella* de pecho colorado" y dejar el género *Sturnella* para los "viejos *Sturnella* de pecho amarillo".

2.4.7 Cálculo del tiempo de divergencia entre especies del género *Sturnella*.

Una de las predicciones básicas de la biología evolutiva es que el rango de diversificación a lo largo de una rama particular del árbol de la vida, es una función de la tasa de evolución del genoma para esa rama. Varios estudios han comparado las tasas de evolución del genoma con la longitud de las ramas filogenéticas (Marshall & Baker 1997; Andrews & Easteal 2000; Yi *et al.* 2002; Caccone *et al.* 2004).

Diversos estudios establecieron un promedio de las tasas de sustitución para cada gen mitocondrial codificante para proteínas, en términos de sustituciones por sitio por millón de años para los principales órdenes de aves. Éstos han determinado que el orden Paseriformes es el que presenta la mayor tasa de sustitución nucleotídica/sitio/millón de años comparada con otros órdenes de aves. Para los Passeriformes se determinó una tasa de evolución (por sitio, por MY) de entre 2% (Weir & Schluter 2008; Subramanian *et al.* 2009), a un 2,9%-3,8% sustituciones/sitio/millón (Nabholz *et al.* 2008; Lerner *et al.* 2011; Dolman & Josep, 2016).

Teniendo en cuenta estos estudios previos, se pudo analizar los tiempo de divergencia en millones de años de las especies integrantes del género *Sturnella*, mediante la construcción de un árbol filogenético, método de "Máxima Verosimilitud" y modelo Kimura 2Parametros mediante el MEGA 6.0. En

el caso del gen *ND2*, se analizaron todas las secuencias nucleotídicas encontradas para este gen en género *Sturnella* y una de *Dolichonyx oryzivorus* (AF447276), utilizada como grupo externo, considerando una tasa de evolución de 0,029 (por sitio, por MY) (Lerner *et al.* 2011; Dolman & Josep, 2016).

2.4.8 Flujo Génico

El flujo génico es el proceso mediante el cual determinados alelos (genes) o individuos (genotipos) son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente. Se estimó el número medio de inmigrantes por generación (utilizando estimaciones de *Fst* entre poblaciones), para medir el grado de aislamiento de las poblaciones. Para ello se utilizó la ecuación de Wright (1951) según:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{Fst} - 1\right)}{2}$$

Donde *m* es el número de migrantes y *Fst* la distancia genética. Este análisis se realizó utilizando el programa Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

2.5 Resultados de los análisis mitocondriales

2.5.1 Extracciones de ADN cuantificaciones y amplificaciones

Se extrajo ADN de 76 muestras, de todas ellas se obtuvo una buena calidad y cantidad de ADN para 69 ejemplares. No se logró extraer ADN de los

ejemplares de museo tomadas a partir de pluma y se obtuvo muy poca cantidad de ADN a partir de las muestras de plantilla del pie (toe pad).

2.5.2 Análisis de secuencias obtenidas del gen *ND2*

Analizando las secuencias se observaron 13 sitios informativos (posiciones: 190, 222, 225, 321, 414, 453, 513, 543, 552, 661, 690, 885, 922). No se encontraron ni deleciones ni inserciones. Los contenidos nucleotídicos hallados para esta región mitocondrial fueron: C = 34,3%, T = 25,6%, A = 29,9%, G = 10,2%.

Se realizaron numerosas reacciones de amplificación de las cuales se obtuvieron 44 muestras amplificadas para el gen *ND2* (Anexo 1) sombreadas en gris y 1 secuencia de *ND2* para loica común muestreada en Bahía Blanca. Mediante un Blast search se encontró que las mismas tenían un 95% de identidad con respecto a *Sturnella loyca* [gi|564813748|KF810936.1](#); 92% de identidad con *Sturnella billicosa* [gi|217316076|FJ154660.1](#); 91% *Sturnella militaris* [gi|564813750|KF810937.1](#) y 88% *Sturnella neglecta* [gi|217316150|FJ154697.1](#). No se encontraron secuencias reportadas para *ND2* para la loica pampeana, *Sturnella defilippii*.

2.5.3 Índices de diversidad génica y haplotípica

A partir de los resultados obtenidos en matriz de diferencias nucleotídicas entre pares de las secuencias para *ND2* y analizando el árbol filogenético, se determinaron 17 haplotipos (Tabla 2). La diversidad haplotípica total es de 0,8713 para la población de Arerunguá y para Bahía Blanca de 0,8846.

En la Tabla 2 se detallan los individuos encontrados para cada población y aquellos haplotipos únicos y compartidos entre individuos de ambas poblaciones (11 haplotipos para Arerunguá y 8 para Bahía Blanca). A los haplotipos encontrados dentro de cada población se los nombró como H y los haplotipos únicos para ambas poblaciones se los nombró con Hap, desde el 1 al 17. El H2 de Arerunguá es compartido por otro individuo de la población de Bahía Blanca (H15) y el H8 de Arerunguá es compartido con individuos de Bahía Blanca (H13).

Tabla 2. Se observan haplotipos (Hap) para ambas poblaciones donde se señala en color celeste oscuro la fila del haplotipo que es compartido por individuos de ambas poblaciones (Arerunguá y Bahía Blanca).

Haplotipo	Número de individuos	Arerunguá	Bahía Blanca
Hap_1	1	SD11	
Hap_2	10	SD13 SD17 SD18 SD19 SD2 SD28 SD37 SD38 SD40	SD60
Hap_3	5	SD14 SD15 SD16 SD41 SD70	...
Hap_4	4	SD21 SD22 SD23 SD24	...
Hap_5	3	SD26R SD27 SD31	...
Hap_6	1	SD29	...
Hap_7	1	SD3	...
Hap_8	4	SD33	SD50 SD51 SD52
Hap_9	3	SD34 SD35 SD36	...
Hap_10	1	SD39	...
Hap_11	1	SD7	...
Hap_12	1	...	SD49
Hap_13	4	...	SD54 SD55 SD56 SD57
Hap_14	1	...	SD62
Hap_15	1	...	SD63
Hap_16	1	SD65	...
Hap_17	1	...	SD68

En la tabla 3 se presentan los datos de diversidad haplotípica y nucleotídica de ambas poblaciones. Para la población de Arerunguá el índice de diversidad nucleotídica es de $\pi=0,00371$ y para la población de Bahía Blanca $\pi=0,00419$. El índice de diversidad nucleotídica global encontrada fue de $\pi = 0.00391703$.

Tabla 3. En la siguiente tabla se pueden observar los datos de diversidad haplotípica y nucleotídica para ambas poblaciones y la población total de loica pampeana.

	Nº de muestras	Numero de haplotipos	Diversidad haplotípica	Desviación estándar div. Hap.	Diversidad nucleotídica
Arerunguá	33	11	0.8713	0.041	0.00371
Bahía Blanca	13	8	0.8850	0.07	0.00419
Población total	46	17	0.915	0.025	0.00392

El árbol filogenético construido, utilizando la modelo de “Máxima Verosimilitud” y método de sustitución “Kimura 2Parámetros” se observa en la figura 2.

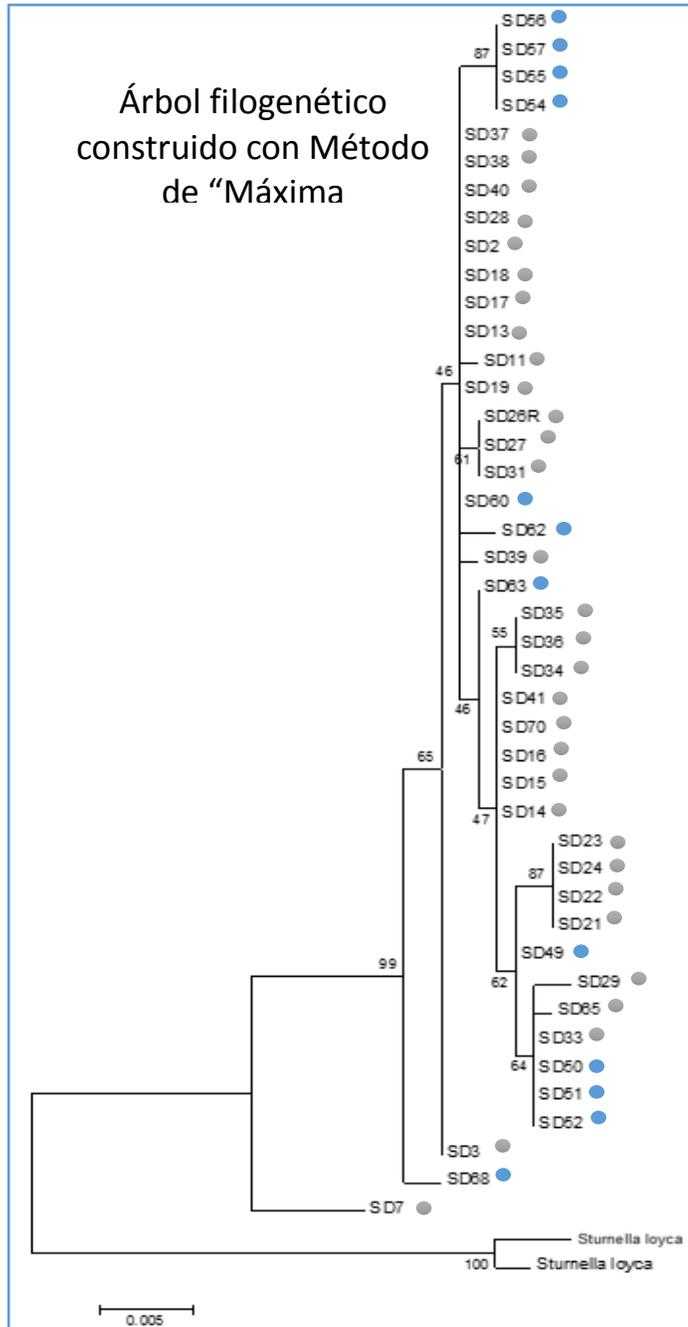


Figura 2. Árbol filogenético construido con Método de “Máxima Verosimilitud”, para los 17 haplotipos de loica pampeana (se detalla soporte de bootstrap para cada nodo mayor a 50%); en gris haplotipos de Arerunguá y en azul haplotipos de Bahía Blanca.

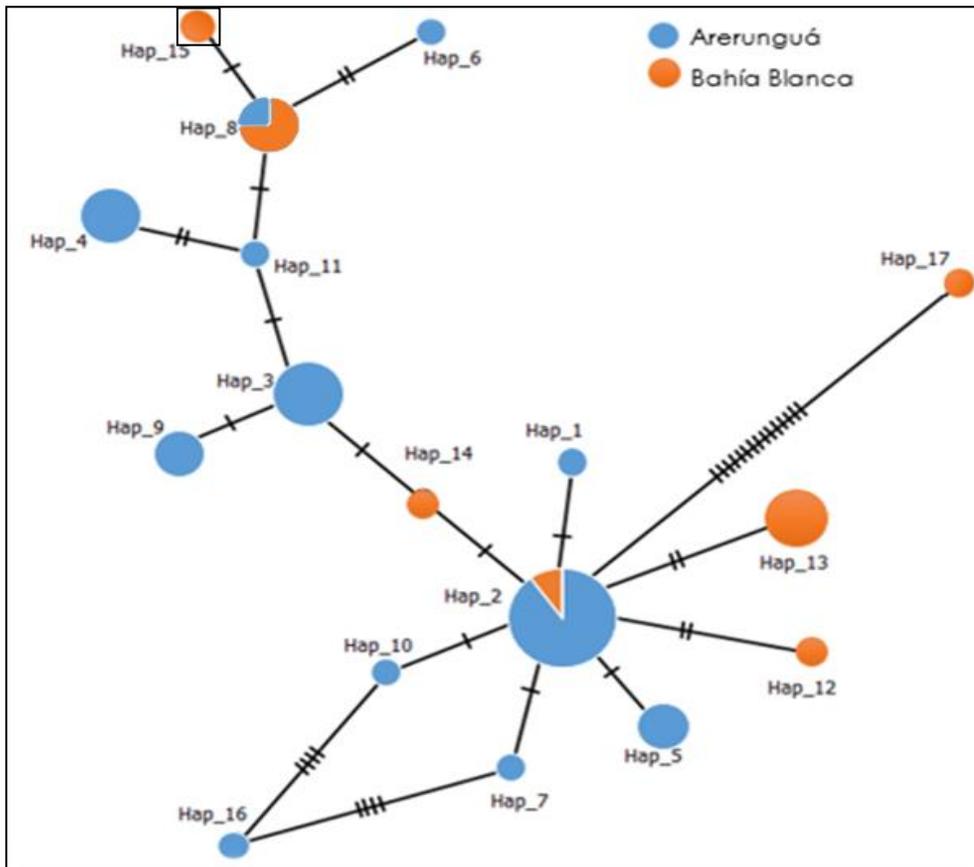


Figura 3. Red de haplotipos basada en el número de sustituciones entre los haplotipos para ND2. Los círculos son proporcionales en tamaño a la frecuencia de los haplotipos. Las marcas perpendiculares a las líneas que conectan haplotipos representan el número de cambios nucleotídicos que se produjo entre un haplotipo y otro. Los círculos en color azul representan individuos de la población de Arerunguá y los círculos en color naranja a los individuos de la población de Bahía Blanca.

En la red de haplotipos construida mediante MSN se observa el haplotipo H2 en posición ancestral, a partir del cual emergen los demás haplotipos (Figura 3). El haplotipo Hap2 se comprende en su mayoría de muestras de la población de Arerunguá y solo una muestra de la población de Bahía Blanca. En término de proporciones, la de Bahía Blanca presenta un número mayor de haplotipos únicos con respecto a la población de Arerunguá. Claramente los haplotipos

de una u otra población se encuentran indistintamente distribuidos en la red, lo que muestra que dichas poblaciones no presentan estructuración poblacional.

2.5.4 Análisis de la Varianza Molecular

Se realizaron los análisis de AMOVA y los resultados de los estadísticos F fueron usados para evaluar la varianza entre poblaciones y dentro de cada población. En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos de porcentajes de varianzas entre poblaciones, dentro de grupos y valor de *Fst*.

Tabla 4. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las dos poblaciones de loica pampeana en estudio ($p < 0,05$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	5,799	0,25658	12,12
Dentro de poblaciones	41	76,294	186,083	87,88
Índice de Fijación	Fst=0,12118 (<i>pvalue</i> = 0.00909)			

El análisis de AMOVA mostró que la mayor parte de la variación está dentro de las poblaciones. Entre las poblaciones de Argentina y Uruguay, se calcula un valor de 3.6 migrantes por generación.

2.5.5 Análisis filogenético entre especies del género *Sturnella*

Se realizó el correspondiente BLAST search a las secuencias obtenidas para *Sturnella defilippi* y se encontraron publicadas las secuencias para las demás especies del género *Sturnella*. La loica pampeana es la única especie cuya secuencia del gen *ND2* no se encontraba publicada. Las secuencias

fueron descargadas de la base de datos de NCBI para poder construir un árbol mediante el Test de Máxima Verosimilitud (Figura 4). Para el mismo se emplearon las secuencias disponibles la base de datos de Gene Bank (Powell *et al.* 2013): 3 muestras de *S. neglecta*, 3 muestras de *S. magna*, 1 muestra de *S. superciliaris*, 1 muestra de *S. militaris*, 1 muestra de *S. bellicosa*, 2 muestras de *S. loyca* (una obtenida del campo de Bahía Blanca y otra de la base de datos de Gene bank) y dos muestras de *S. defilippii* del presente trabajo.

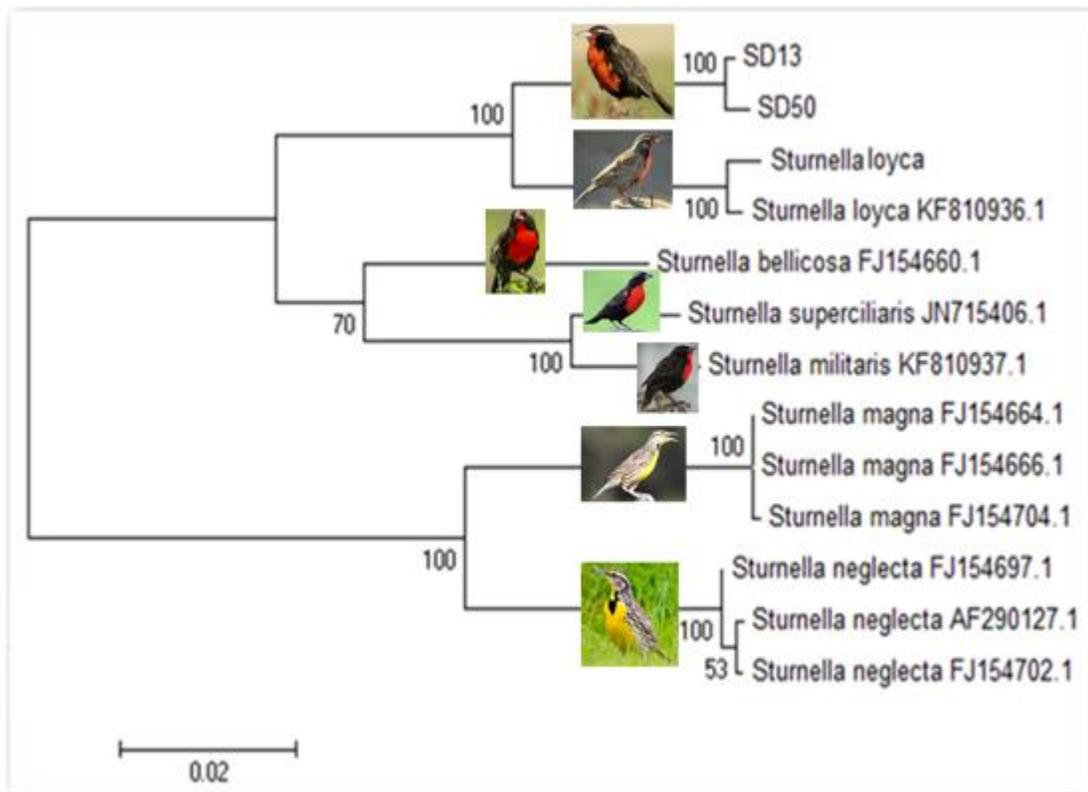


Figura 4. Árbol construido mediante test de Máxima Verosimilitud con soporte de 1000 bootstrap.

En el árbol de Máxima Verosimilitud se puede observar que la loica común es la especie más cercana a la loica pampeana (con un soporte de 100%) y las especies más alejadas son la *S. magna* y *S. neglecta*.

2.5.6 Tiempo de divergencia entre especies del género *Sturnella*.

El cálculo de tiempos de divergencia estimados para el género *Sturnella* del género *Dolichonyx* predicen que éste ocurrió hace aproximadamente 3 millones de años, finales del Plioceno (Figura 5). Luego establece una divergencia entre las especies de loica común y loica pampeana de 910.000 años, lo que correspondería a la escala temporal Pleistocénica.

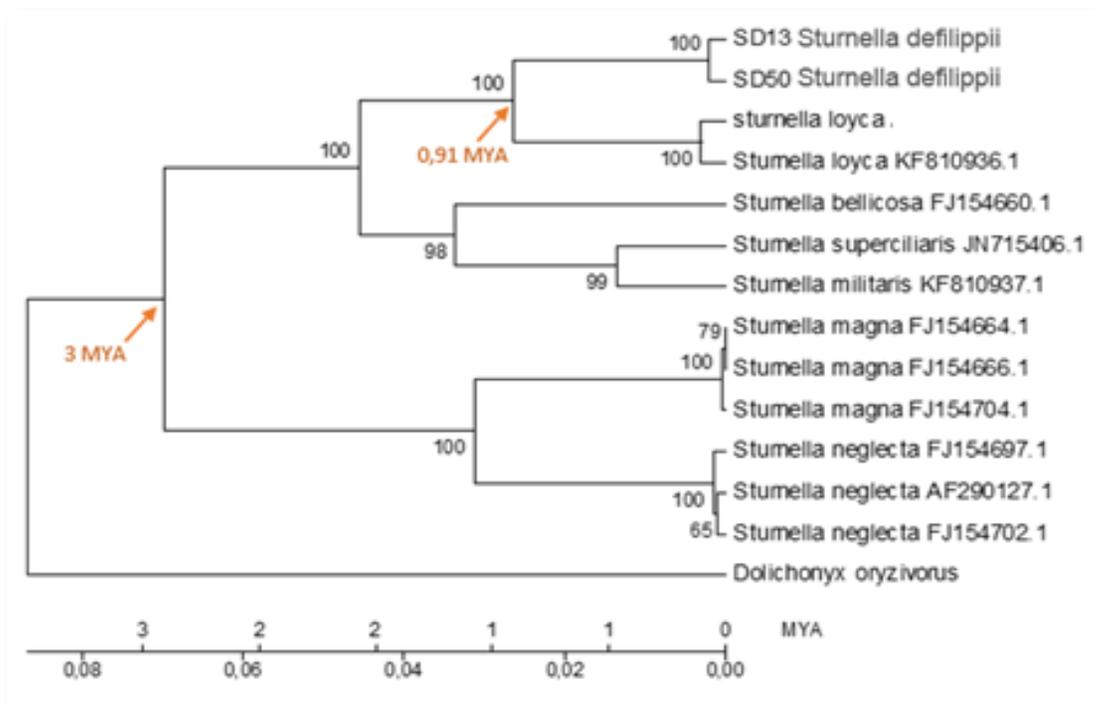


Figura 5. Filogenia construida mediante método de "Máxima Verosimilitud". Análisis de bootstrap basado en 1000 pseudoréplicas. Se detalla soporte de bootstrap para cada nodo. La especie *Dolichonyx oryzivorus* fue utilizada como grupo externo. El largo de las ramas indica la distancia evolutiva computada utilizando el método Kimura2-Parámetros, debajo la distancia genética entre ellas.

2.5.7 Análisis de procesos demográficos poblacionales

El test de Neutralidad F_u y test D^* y F^* de Li mostraron un significativo abandono de la neutralidad para la población de Arerunguá, que se produce cuando un exceso de haplotipos raros están presentes en las muestras. Estos indican la posible ocurrencia de un proceso de expansión poblacional, siendo tanto los valores de F_u , como los de Li D^* y F^* , negativos y significativos. El índice S de Strobeck presentó un valor positivo $S=0,959$ reforzando también la posible expansión de la población.

Para las muestras de Bahía Blanca la desviación de la neutralidad no se explica por un antecedente de selección, como se evidencia por los valores no significativos de F_u , como los de Li D^* y F^* (Tabla 5). El índice S de Strobeck sí presentó un valor positivo $S=0,838$ a favor de una expansión de la población.

Tabla 5. Análisis de neutralidad para cada población. Valores del test de neutralidad F_u y D^* y F^* de Li con los correspondientes valores de significancia basados en 1000 réplicas de *bootstrap*. En negritas los valores significativos.

Fu & Li Test	Arerunguá	Bahía Blanca
D^*	-2,945*	-0,728**
F^*	-2,958*	-0,688**
F_u	-2,087*	-0,565**
	* $p < 0,05$	** $P > 0,01$

El análisis del test D de Tajima presentó un valor igual a -1.63446 y no significativo, aunque este test es mucho menos sensible que test de F_u y Li para D^* y F^* en este tipo de procesos (McVean 2002).

El análisis de neutralidad D^* y F^* de Li del total de las muestras, tanto para Arerunguá como para Bahía Blanca (Tabla 6), presenta un valor negativo y

significativo, indicando un proceso de expansión demográfica de la especie de manera global.

Tabla 6. Valores del test de neutralidad de neutralidad F_u y D^* y F^* de L_i con los correspondientes valores de significancia basados en 1000 réplicas de *bootstrap*. En negritas los valores significativos.

Fu & Li Test	loica pampeana
D^*	-3.490 ($p < 0,02$)
F^*	-3,431 ($p < 0,02$)
$FU's$	-4.977 ($0,10 > p > 0,05$)

El análisis de distribución de diferencias pareadas presentó una distribución unimodal (Figura 6), indicando así, que se trata de una población que ha pasado por una expansión demográfica. El valor de la suma de desviación cuadrática (SSD) así como el "Raggedness Index", presentan un valor significativo, ambos análisis indican un ajuste al modelo de expansión demográfica reciente para este tipo de marcador molecular mitocondrial en loica pampeana.

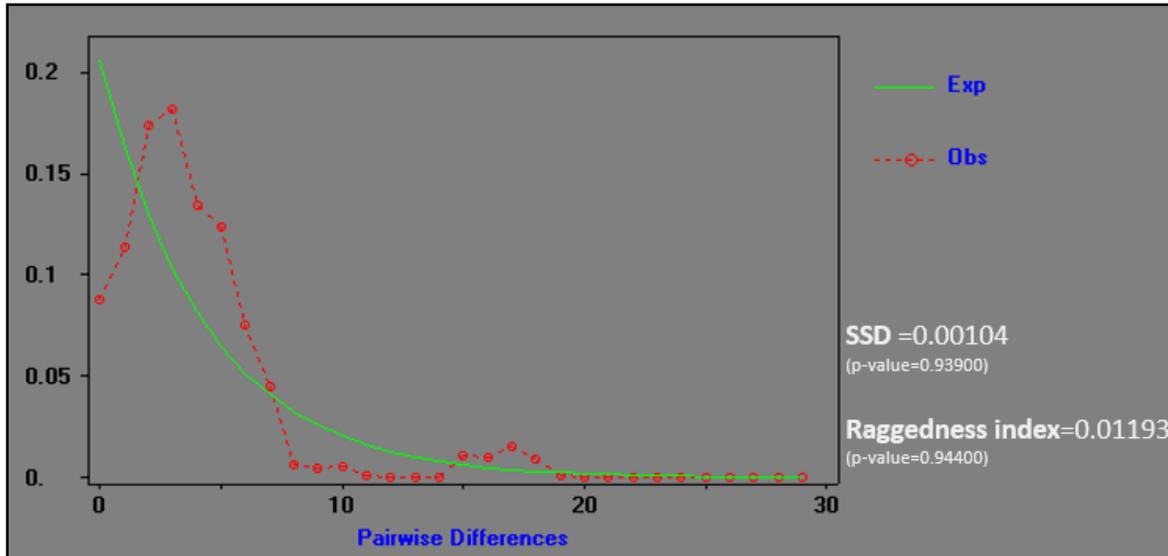


Figura 6. Gráfico de distribuciones de diferencias pareadas bajo el modelo de expansión poblacional para loica pampeana según los análisis de la región mitocondrial ND2 (número de pares vs diferencias pareadas). La distribución observada y los intervalos de confianza a un nivel del 99% de las distribuciones esperadas se encuentran representados en el gráfico.

2.5.8 Análisis demográfico

Los parámetros demográficos calculados para la población total de loica pampeana se presentan en la tabla 7, sobre la base del valor estimado de τ (tau), el tiempo medio de expansión demográfica de la especie habría sido hace 59.187 años antes del presente, lo que comprendería el período Pleistoceno tardío (comenzó hace 110.000 años y finalizó hacia el 10.000 A.C.), durante un período relativamente cálido.

Tabla 7. Parámetros calculados para loica pampeana, obtenidas del análisis “mismatch distribution”: edad de expansión en unidades de tiempo mutacional (τ) (intervalo de confianza del 95%), tamaño de la población antes (θ_0) y después de (θ_1) de la expansión en unidades de tiempo mutacional, y la edad de expansión (t) en los años calculado empleando 2,9% la tasa de mutación promedio.

Parámetros	loica pampeana
τ	3,5039 (1,699 - 6,679)
θ_0	0,312
θ_1	13,4
T	59.187

Tomando en cuenta los datos obtenidos se calculó el número efectivo de hembras en el momento de la expansión: $N_e = \theta/2\mu = 226.351$ hembras.

2.6 DISCUSIÓN : Análisis a partir de datos mitocondriales

2.6.1 Diversidad genética

No se encontraron indels o codones de parada que pudieran indicar la amplificación de las copias nucleares del ADNmt de *ND2*. La ausencia de pseudogenes nucleares (*numts*) fue apoyado por la coincidencia exacta de la superposición de secuencias independientemente amplificadas con estos primers, y también por la composición de nucleótidos de las secuencias para *ND2*, las cuales tenían típicamente alto contenido de citosina y bajo contenido de guanina (34,3% vs 10,2%), como se ha observado en otras especies (Drovetski *et al.* 2004, 2005; Johnson *et al.* 2006; García *et al.* 2008).

Muchos estudios sobre ADNmt en aves han permitido cuantificar la divergencia de secuencias entre diferentes taxones a diferentes niveles entre poblaciones, subespecies, especies, género, familias y taxones superiores. Las secuencias de la región de control de ADNmt se usan principalmente para investigar las relaciones dentro de las especies o entre especies estrechamente relacionadas (Omland *et al.* 2000; Kvist *et al.* 2001; Rhymer *et al.* 2001). Pero también ha sido fundamental como herramienta para evaluar el nivel de diversidad genética que presenta una especie, permitiendo efectuar inferencias sobre los procesos demográficos y evolutivos que han actuado sobre ella, definiendo así el estado de conservación de las distintas poblaciones de una especie, con lo cual se han podido desarrollar pautas para la conservación y desarrollo sustentable de las mismas (Avise 1995; González *et al.* 1998; Waits & Paetkau 2005).

Lacerda *et al.* (2007) utilizaron secuencias de la región de control, citocromo *b*, gen *ND2* y del ADN mitocondrial para evaluar los niveles de diferenciación molecular entre dos especies del orden de passeriformes: *Thamnophilus pelzelni* y *T. ambiguus*, los cuales solo pueden distinguirse por cambios sutiles en el color de plumaje entre machos y hembras. La divergencia genética encontrada entre *T. ambiguus* y *T. pelzelni* para los tres marcadores mitocondriales fue lo suficientemente alta como para corroborar el estatus de especies diferentes entre estos dos taxones. El índice de diversidad haplotípica para ambas especies fue alto y el número de haplotipos encontrados con *ND2* y con *Citb* fue similar, lo que muestra en este caso patrones de evolución similares para ambas regiones mitocondriales.

En el caso de la loica pampeana para el marcador *ND2* nos encontramos con una diversidad genética muy alta ($H=0,88$) en contraposición del reducido número de individuos de las poblaciones de Arerunguá y Bahía Blanca.

La diversidad haplotípica registrada fue de 0,8713 y 0,8846 respectivamente. Di Giacomo *et al.* (2014), encontraron una diversidad haplotípica para citocromo *b* en la especie de pastizal *Alectrurus risora*, a partir de 58 individuos de 0,69 (población de Corrientes) y de 0,38 (Formosa). Esta especie al igual que la loica pampeana ha sufrido una marcada reducción del 90% de su distribución geográfica histórica por la transformación de su hábitat, y se encuentra clasificada como vulnerable a nivel global por la IUCN Red List 2017. Las poblaciones de loica pampeana conservan una mayor variabilidad genética en comparación con ésta siendo que ambas especies han estado afectadas por una marcada declinación numérica. Otras especies de aves como el yetapá de collar (*Alectrurus risora*), el tordo amarillo (*Xanthopsar flavus*), viudita blanca grande (*Xolmis dominicanus*) son junto con *Sturnella*

defilippii, especies amenazadas que habitan los pastizales sudamericanos que han sufrido un fuerte decline en sus poblaciones durante el último siglo debido a cambios en el uso extensivo de las praderas (Azpiroz *et al.* 2012b).

Por otro lado la diversidad nucleotídica promedio de ambas poblaciones de loica para ND2 es de 0,395%, estudios realizados en especies de aves en general reportan un π de 0,266% (+/-0,0045) y en passeriformes un valor π de 0,285% (+/-0,00639) (Berlín *et al.* 2007). El alto valor de diversidad nucleotídica encontrada en loica pampeana evidencia un tamaño efectivo poblacional importante en el pasado, mantenido a lo largo del tiempo, lo que permitió acumular un mayor número de mutaciones (Primmer *et al.* 2002).

2.6.2 Relaciones filogenéticas entre especies integrantes del género *Sturnella*.

Powel *et al.* (2013) realizaron un exhaustivo análisis filogenético de la familia *Icteridae*, donde el análisis molecular fue fundamental para la reclasificación de grupos y especies a nivel intrafamilia. En el caso de *Sturnella*, algunas especies se consideraban conespecíficas, en el caso de *S. militaris* y *S. superciliaris*, *S. loyca* con *S. defilippii*. Los datos moleculares de regiones mitocondriales (región control, citocromo *b*, ND2) apoyaron la monofilia de los grupos de pecho colorados y pecho amarillos. Estos son genéticamente más divergentes (15%) que cualquier otro congénere dentro de *Icteridae*. No se encontraron secuencias reportadas para el gen ND2 para la loica pampeana en la base de datos del GenBank.

El test de máxima verosimilitud para las secuencias disponibles en GenBank de *Sturnella* mostró el mismo patrón de relacionamiento entre

especies incluyendo las secuencias de ND2 de loica pampeana de este trabajo. Este árbol apoya en un 100% que loica pampeana es una especie hermana de la loica común y entre ambas comparten mayor similitud genética según este marcador mitocondrial, al igual que el trabajo de Powell y colaboradores empleando secuencias del gen citocromo b y región control del ADN mitocondrial. El siguiente grupo más cercano a *S. defilippii* y *S. loyca* se compone de las especies *S. bellicosa*, *S. militaris* y *S. superciararis*. El tercer grupo se compone de *S. magna* y *S. neglecta* el grupo más distanciado genéticamente de *S. defilippii*. El patrón de relacionamiento que presentan en el árbol filogenético se condice con la distribución que tienen estas especies a lo largo del continente, donde las más alejadas por distribución son *S. magna* la cual llega al norte de Sudamérica y *S. neglecta* Centro América-Norte América. Por otro lado *S. bellicosa*, *S. superciliaris* y *S. militaris* presentan una distribución entre América del Sur hacia Centroamérica, y *S. loyca* con *S. defilippii* con una distribución histórica que ocupó el cono sur sudamericano.

La especiación de estas aves ocurrió en la época Pleistocénica. Numerosos trabajos reportan casos similares, por ejemplo, se sabe que algunas especies de aves norteamericanas estrechamente relacionadas se dividieron durante el Pleistoceno, y que los eventos de éste período separaron a muchas poblaciones que actualmente se consideran conespecíficas, causando una diversificación filogeográfica intraespecífica importante (Avice & Walker 1998; Klicka & Zink 1999). Los ciclos climáticos que acontecieron en el Pleistoceno contribuyeron directamente a la diversidad aviar actual de Norte América (Lovette 2008). La conexión con América del Norte abrió la puerta a un intercambio biótico que enriqueció también la flora y la fauna de América del Sur con nuevos linajes (Barker *et al.*, 2015). Barker *et al.* (2015) documentaron patrones de dispersión entre Norte América y Sudamérica de un grupo muy diverso de aves neotropicales (*Emberizidae*) que comenzó antes de que los

continentes estuvieran conectados por el Istmo de Panamá, y la posterior diversificación de varios clados ricos en especies en Sudamérica.

Las herramientas moleculares proporcionan una ventana al pasado que permite a los investigadores discernir patrones filogeográficos con una confianza que no es posible solamente con características morfológicas del plumaje (Kattan *et al.*, 2016).

Con el marcador mitocondrial (ND2) fue posible identificar taxonómicamente, con gran exactitud los ejemplares pertenecientes a las diferentes especies del género *Sturnella* (Los nuevos haplotipos determinados con este gen serán depositados a la base de datos de secuencias del GenBank). Además con este marcador fue posible especificar una escala temporal en la que se dieron dichas diversificaciones del género *Sturnella*.

2.6.3 Estructura poblacional y flujo génico entre las poblaciones

Los resultados de AMOVA mostraron que la mayor parte de la variación genética (87,88%) residía dentro de las poblaciones, confirmando la falta de estructura genética en la especie de loica pampeana con un valor de $F_{st}=0,12118$. La falta de estructuración genética encontrada puede ser explicada por el poco tiempo transcurrido desde que las poblaciones de loicas han ido quedando aisladas. El tiempo necesario para detectar las consecuencias genéticas de los procesos recientes de fragmentación y la pérdida de hábitat en aves en peligro de extinción puede ser de sólo unas pocas generaciones (Di Giacomo *et al.* 2014). Un estudio sobre la fragmentación del bosque seco del Cerrado y su asociación con la estructura genética poblacional de la cotorra de Pfrimer (*Pyrrhura pfrimeri*) sugirió un retraso de 35 años entre la deforestación y su efecto sobre la estructura

genética (Miller *et al.* 2013). Por otra parte, la capacidad de dispersión de la especie podría explicar el patrón genético. En el caso del gorrión Sierra Madre (*Xenospiza baileyi*), otra ave de pastizal amenazada, con poblaciones fragmentadas debido a pérdida de su hábitat en México, mostró una significativa diferenciación genética, lo que sugiere la incapacidad de ocupar áreas de hábitat inadecuadas para la especie (Oliveras de Ita *et al.* 2012). El yetapá de collar (*Alectrurus risora*), por otro lado tiene habilidad para volar grandes distancias debido a su comportamiento migratorio histórico. Esto le permite dispersarse entre poblaciones reproductivas y así generar flujo genético entre ellas. Es por esto que a pesar de sufrir una reducción poblacional abrupta debido a la fragmentación de su hábitat, la estructura genética poblacional es casi inexistente (Di Giacomo *et al.* 2014).

Podemos suponer entonces que cuando los cambios ambientales y la fragmentación del hábitat comenzaron a repercutir sobre la especie de loica pampeana que tenía un amplio rango de distribución, éstas se fueron concentrando en áreas más adecuadas para su reproducción y forrajeo, lo cual hubiera sido más difícil de haberse tratado de una especie con rango geográfico más restringido.

El flujo genético encontrado entre la población de Arerunguá y Bahía Blanca resultó ser de 3,6. Actualmente es bastante improbable el flujo de individuos entre estas poblaciones. Este flujo génico puede también ser resultado de un evento de expansión demográfico ocurrido en el pasado reciente (González *et al.* 1998).

2.6.4 Análisis Filogenético e historia demográfica de la especie

El árbol filogenético de Máxima Verosimilitud así como la red de haplotipos construida para ambas poblaciones de loica pampeana muestran una distribución indistinta entre los haplotipos de cada población, carente de estructuración o indicios de esta. La red de haplotipos radiada en forma de estrella, sugiere una rápida expansión demográfica a partir de un solo haplotipo base, presente en ambas poblaciones estudiadas (Hap2). Este haplotipo está representado en su mayoría por individuos de Arerunguá, esto puede deberse a un sesgo dado por el mayor número de individuos analizados de la población de ésta población respecto a Bahía Blanca. El patrón en forma de estrella, evidencia además una historia relacionada y más estrecha entre estas poblaciones de loica pampeana.

La importante variabilidad genética encontrada se puede explicar por un tamaño poblacional grande de la especie o que haya existido un evento de expansión demográfica sobre la misma. Los últimos censos realizado sobre estas poblaciones reflejan un reducido número de individuos (Azpiroz *et al.* 2015), por lo que se rechaza la teoría de que existan numerosos individuos integrando estas poblaciones. Por otro lado, las pruebas de neutralidad aplicadas para analizar comportamientos demográficos apoyan la teoría de una expansión poblacional. El análisis de estadísticos F_u y F_i D y F^* basada en las secuencias de la región *ND2* mitocondrial revelan valores significativamente diferentes a cero y negativos para la especie, lo que sugiere una expansión poblacional.

El análisis del test D de Tajima presentó un valor igual a -1.63446 y no significativo, aunque este test es mucho menos sensible que los test de F_u y F_i para D^* y F^* en este tipo de procesos (McVean 2002). Además, valores no

significativos en pruebas F_s combinadas con valores significativos de D^* y F^* han sido interpretadas por Fu (1997) como evidencia de una ausencia de antecedentes de la selección, por lo tanto, de expansiones demográficas.

Sumado a esto, el patrón unimodal de la curva de distribución desigual, valores de SSD y el "raggedness index" apoyan la existencia de expansión poblacional en el pasado.

De acuerdo a los datos demográficos calculados, la loica pampeana tuvo su expansión demográfica hace aproximadamente 59.000 años, lo cual ocurre en el Pleistoceno. En la región de los pastizales pampeanos, las inferencias paleoclimáticas realizadas para el Pleistoceno tardío son coincidentes en proponer condiciones climáticas frías y áridas-semiáridas y/o secas (Tonni *et al.* 2003; Prado & Alberti 1999; Prieto 2000; Quattrocchio *et al.* 2008), que cambiaron a subhúmedas-húmedas durante la transición Pleistoceno-Holoceno y continuaron durante el Holoceno temprano (Tonello & Prieto 2009).

Varios estudios indican expansiones poblacionales para esta época Pleistocénica, tales como un estudio de 14 especies de roedores sigmodontinos a lo largo de la Patagonia y Tierra del Fuego (Lessa *et al.* 2010), especies de peces patagónicos (Ruzzante *et al.* 2008) entre otros incluyendo fauna y flora, donde se revelan historias biogeográficas de expansiones y retracciones de la biota en el Pleistoceno (Haberle & Bennett 2004; Villagrán *et al.* 2004; Heusser *et al.* 2006). Los numerosos avances y retrocesos glaciares durante el Pleistoceno son bien conocidos (Rebassa 2008). Las distintas glaciaciones difirieron en extensión y duración por lo que probablemente también en su impacto sobre la abundancia y distribución de la biota local. Los ciclos climáticos del Pleistoceno tuvieron un impacto moderado en Sudamérica (Moreno 1997;

Moreno *et al.* 1999; Rabassa *et al.* 2005). Durante este período, las especies típicas de climas más templados sobrevivieron en diferentes refugios y luego durante los períodos de clima más benigno para estas especies (interglaciares) las áreas habitables se habrían ampliado, lo que permitió que las poblaciones de los refugios expandieran su rango (Lessa *et al.* 2010). Esto permitió que se produzcan procesos de expansiones poblacionales y también procesos de especiación. Tal es el caso de las aves, donde se encontró una fuerte evidencia de la importancia del Pleistoceno en la especiación (Mila *et al.* 2000; Johnson & Cicero 2004).

Se ha sugerido en publicaciones anteriores que la loica pampeana es una especie parcialmente migratoria (Aplin 1894; Tubaro y Gabelli 1999), hoy se sabe que en las poblaciones actuales esto no estaría ocurriendo, y la evidencia concreta, de si parte de la población es o era migratoria aún es limitada (Azpiroz 2015). Sin embargo podemos suponer que la especie fue capaz de colonizar diferentes áreas compuestas de pastizales ante los cambios ambientales de consideración del Pleistoceno, ya que los altos niveles de variabilidad hallados así lo indican. Al encontrarse ocupando un rango de distribución más amplio, éstas pudieron haberse movido a zonas más aptas para su reproducción y alimentación.

El número efectivo de hembras calculados antes de la expansión poblacional de la especie fue de 226.351 hembras, si se asume una proporción de sexos 1:1, podríamos inferir que el número efectivo total en la población era de 444.702 individuos totales.

En los últimos años la especie no ha sido registrada en numerosos sitios (40%-60%) ocupados en el pasado (población al sur de Buenos Aires) (Fernández *et al.* 2004; Gabelli *et al.* 2004) y la cantidad de ejemplares

observados en campañas recientes son sólo una fracción (7% y 12% en los años 2012 y 2013 respectivamente) de los registrados 20 años atrás (Meriggi *et al.* 2013; Meriggi *et al.* 2014). Los tamaños poblacionales actuales para loica pampeana en Arerunguá se estiman en aproximadamente 100 parejas (Azpiroz & Cozzani 2017), y en Bahía Blanca según último conteo publicado en la Lista Roja de Argentina (MayDs y AA 2015) la población sería menor a 2500 individuos maduros.

Actualmente, en Uruguay, conteos regulares y datos generados a través del anillamiento de ejemplares en Arerunguá muestran que la población permanece en el área durante todo el año (Azpiroz *comm. per.*) Este comportamiento actual de la especie podría ser consecuencia de la modificación y fragmentación del hábitat, lo que ha llevado a la reducción en número de sus poblaciones y a tener que habitar en parches fragmentados y actualmente aislados.

Por otro lado se ha constatado el uso de sitios previamente desocupados por la especie, aunque en menor proporción. Esto último estaría relacionado, en la mayoría de los casos, con la recuperación del pastizal natural en sitios perturbados, aunque este es un proceso que puede llevar de 5 a más de 15 años (Tubaro & Gabelli 1999) lo que indica que se podría estar a tiempo de recuperar el status actual de la especie si se implementan planes de conservación prioritarios.

3 CAPITULO III: OBTENCION DE DATOS GENETICOS DE LA ESPECIE: Loci microsatélites

3.1 Marcadores loci microsatélites

Los marcadores microsatélites son la herramienta molecular más utilizada en la investigación ecológica (Finger y Klank, 2010). Son marcadores genéticos de locus simple, que consisten en repetidos tandem de secuencias de entre dos y seis pares de bases de largo. Estos loci repetidos simples se postula que pueden haber evolucionado por ganancia y pérdida de las unidades repetidas y son por lo tanto altamente polimórficos, revelando en general más de doce alelos para un locus simple (Zane *et al.* 2002).

Dentro de la genética molecular, el análisis de loci de microsatélites se emplea en estudios de ecología y conservación jugando un rol significativo en varias áreas del manejo de especies amenazadas. Los mismos sirven para la determinación de la estructura genética de la población, analizar la diferenciación genética, el establecimiento del sistema de apareamiento, evaluar la estructura demográfica, el grado de parentesco entre los miembros dentro de los grupos y la estimación del grado de variación genética dentro y entre las poblaciones (Lettink *et al.* 2002; Ortega *et al.* 2002; van Hooft *et al.* 2003; Finger y Klank, 2010).

Empleando microsatélites es posible analizar si existieron en la población eventos tales como cuellos de botella, utilizando programas y modelos de simulación. Los mismos son capaces de inferir los cambios genéticos (pérdida de heterocigosidad, pérdida de alelos, cambios en la distribución alélica y variación en las frecuencias alélicas) causados por la reducción severa del

tamaño efectivo de la población (N_e), y los cuellos de botella “crípticos” (Hoelzel *et al.* 1993; Luikart *et al.* 1998, 1999; Galtier 2000; Spencer *et al.* 2000; Garza & Williamson 2001; Wisley *et al.* 2002). Este tipo de análisis ya ha sido empleado por ejemplo en poblaciones de *Falco punctatus*, especie endémica de las Islas Mauricio (Groombridge *et al.* 2000). El empleo de loci de microsatélites, resultó fundamental ya que permitió analizar la variabilidad genética en muestras de tejidos de ejemplares de museo, con más de 170 años de antigüedad, así como de ejemplares actuales, utilizando extracciones de ADN de plumas. De este modo, mediante el empleo de 12 microsatélites, se comprobó que la población actual presentaba cerca del 57% de la heterocigosidad y un 55% menos de diversidad alélica respecto a la población anterior al cuello de botella.

Además, los loci de microsatélites proporcionan una vista alternativa del ADN mitocondrial heredado por vía materna. Estos marcadores generalmente se caracterizan por altas tasas de mutación, un alto nivel de polimorfismo y, en consecuencia, una resolución final de la dinámica de la población (Hardy *et al.* 2003). Su alta variabilidad y su herencia co-dominante han permitido establecer relaciones de parentesco incluso en ausencia del genotipo de los padres (Emery *et al.* 2001; Strausberger & Ashley 2003).

Otra ventaja que presentan estos marcadores es que son útiles, por su elevado grado de polimorfismo, fiabilidad en la determinación de los alelos y facilidad de análisis. Permite además la asignación de un individuo a un probable grupo de origen, posibilitando analizar estructuras intrapoblacionales (Roques *et al.* 1999; Rüber *et al.* 2001; Beheregaray & Sunnucks 2001; Knutsen *et al.* 2003), determinar parentescos y efectuar análisis de paternidad (Taberlet *et al.* 1993; Wilmer *et al.* 1999), éxito reproductivo y estructuras sociales (Bourke *et al.* 1997; Herbers & Mouser, 1998; Tóth *et al.* 2002; Paxton *et al.* 2002).

Los loci de microsatélites se tipifican rápida y fácilmente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Sin embargo, la desventaja es que es necesario aislar *de novo* en las especies que se examinan por primera vez (Zane *et al*, 2002). Este procedimiento, que implica la construcción y análisis de bibliotecas genómicas, secuenciación de ADN y diseño de cebadores, se puede evitar mediante el uso de cebadores diseñados para el análisis de microsatélites en especies relacionadas filogenéticamente. Esto se denomina amplificación cruzada (*cross-amplification*) de microsatélites y es posible gracias a la existencia de regiones conservadas que flanquean la región hipervariable, sobre la cual se diseñan los cebadores. Se han realizado varias investigaciones usando microsatélites diseñados para especies de aves Passeriformes, mediante amplificación cruzada (Primmer *et al*. 1996; Dowson *et al*. 2010; De la Colina 2013)

3.2 Hipótesis

- A- Las poblaciones de loica pampeana presentan una baja variabilidad genética.
- B- La población global de la especie sufrió un cuello de botella reciente.
- C- Actualmente existe endogamia entre grupos de individuos muestreados.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

- Caracterizar la estructura genética de las poblaciones de loica pampeana de Arerunguá y Bahía Blanca mediante un adecuado set de loci microsatélites.
- Estudiar el grado de relacionamiento entre los grupos muestreados de loica pampeana para poder determinar si existe endogamia.

3.3.2 Objetivos específicos

- a- Caracterizar un set de loci microsatélites para la especie *Sturnella defilippii* suficientemente polimórfico para utilizar en el análisis genético de la población de Arerunguá y la población de Bahía Blanca.
- b- Estimar el grado de variabilidad genética, el grado de parentesco y si es posible detectar endogamia.
- c- Inferir parámetros demográficos como el número efectivo
- d- Determinar si existe estructuración poblacional.
- e- Analizar si existió un cuello de botella reciente.

3.4 Selección de loci microsatélites para loica pampeana

Los loci de microsatélites son mucho menos abundantes en el genoma de las aves que en algunos otros taxones, como los mamíferos y los peces (Primmer *et al.* 1997; Neff & Gross 2001). Por lo tanto, los estudios en las aves habitualmente utilizan protocolos de enriquecimiento para aislar los suficientes loci de microsatélites para análisis de paternidad, estudios poblacionales o mapas de ligamientos. El aislamiento y desarrollo de microsatélites involucran mucho trabajo y tiempo, por lo tanto es una técnica costosa de realizar. El aislamiento de microsatélites por lo tanto a menudo se realiza mediante

instalaciones especializadas de investigación o laboratorios comerciales (Dowson *et al.* 2010).

Existen demostraciones de la utilidad del empleo de microsatélites descritos para cierta especie de ave y aplicado a otras especies de aves relacionadas filogenéticamente (*cross-amplification*) (Primmer *et al.* 1996). Uno de los objetivos principales ha sido identificar cebadores de gran potencial para su empleo en una amplia gama de especies. Con este objetivo se van identificando un pequeño número de cebadores (Galbusera *et al.* 2000, ver <http://www.sheffield.ac.uk/molecol/deborah-dawson>).

En aves, Dowson *et al.* (2010) aislaron, seleccionaron y diseñaron 35 loci de microsatélites. Estos nuevos marcadores de microsatélites resultaron de gran utilidad para su empleo entre distintas especies de aves. Los loci descritos son adecuados para una amplia gama de aplicaciones que requieren de marcadores polimórficos, incluyendo estudios de paternidad y estudios poblacionales. Mediante estos microsatélites descritos, los costos y tiempo para desarrollar nuevos loci se pueden evitar ya que se pueden aplicar en numerosas especies.

De la Colina en su tesis doctoral (Colina, 2013) empleó loci microsatélites para estudiar la especie tordo renegrido (*Molothrus bonariensis*). Estos microsatélites habían sido empleados previamente en trabajos realizados sobre la especie tordo cabeza marrón (*Molothrus ater*) (Gibbs *et al.* 1997, Alderson *et al.* 1999, Longmire *et al.* 2001). Dichos trabajos aportaron información importante sobre estructura genética, relaciones de parentesco entre individuos de la población, entre otros y se puede comprobar el éxito en el empleo de dichos microsatélites en especies filogenéticamente emparentadas.

3.5 Material & Métodos

3.5.1 Muestras utilizadas

Para la amplificación mediante *loci microsatélites* se emplearon las muestras extraídas y cuantificadas, detalladas en la Tabla I en Anexo.

3.5.2 Selección y diseño experimental para la amplificación de set de loci microsatélites

En la búsqueda de microsatélites se exploró bibliográficamente y se buscó en base de datos disponible para marcadores microsatélites descriptos y utilizados con éxito para varias especies de aves (BIRDMARKER: <http://www.sheffield.ac.uk/molecol/deborah-dawson>). Se examinaron aproximadamente 200 loci, descritos en diversas publicaciones (Neumann & Wetton, 1996; Piertney *et al.* 1998; Alderson *et al.* 1999; Dawson *et al.* 2000; Longmire *et al.* 2001; García-Vigón *et al.* 2008; Olano-Merín *et al.* 2010). A partir de toda esta información se seleccionaron en función a la cercanía filogenética con la especie *Sturnella defilippii*, al número de especies en que se obtuvieron amplificaciones exitosas y al grado de polimorfismo obtenido en esos estudios. Estos fueron 15 loci de secuencias microsatélites (Ver Tabla 7).

Tabla 7. Loci de microsatélites empleados para loica pampeana. Se especifica nombre de locus, primers, temperatura óptima para la PCR (Tópt), rango aproximado de tamaño de fragmento, motivo del repetido y bibliografía. Los *loci microsatélites* marcados con negrita, fueron brindados en forma de alícuota para ser probados en loica pampeana por el laboratorio de Ecología y Comportamiento Animal (Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

Locus	Primers	T opt	Rango de tamaño aprox.	Motivo repetido	Bibliografía
Lox1 F Lox1 R	5'-ATGATGGTAAGTCTAATGAAAGC -3' 5'-CCACACACATTCACCTCTATTG -3'	50	269-273	(CTTT)30	<i>Piertney et al. 1998</i>
HrU2 F HrU2 R	5'- CATCAAGAGAGGGATGGAAAGAGG - 3' 5'-GAAAAGATTATTTTTCTTCTCCC -3'	51	129-139	(GA)6 (GT)7 (TG)3	<i>Primmer et al. 1996</i>
Pca7 F Pca7 R	5'-TGAGCATCGTAGCCAGCAG -3' 5'-GGTTCAGGACACCTGCACAATG -3'	57	127	(TG)24	<i>Piertney et al. 1998</i>
Pca4 F Pca4 R	5'-AATGTCTTACAGGCAAAGTCCCA - 3' 5'-AACTGAAGCTTCTGGCCTGAATG -3'	58	160-176	(AC)11 AT (AC)10	<i>Dawson et al. 2000</i>
Pca8 F Pca8 R	5'-ACTTCTGAAACAAAGATGAAATCA - 3' 5'-TGCCATCAGTGTCAAACCTG -3'	57	295	(GATA)16(TG)25	<i>Dawson et al. 2000</i>
Pca3 F Pca3 R	5'-GGTGTTGTGAGCCGGGG -3' 5'-TGTTACAACCAAAGCGGTCAATTG -3'	65	144-156	(GT)6 CT (GT)3 CT(GT)5 CT(GT)3 CT (GT)13	<i>Dawson et al. 2000</i>
Pdo u3 F Pdo u3 R	5'-CTGTTCATTAACACAGGT -3' 5'-TGTTGGAGGTAGGAGGCCTCT -3'	52	112-172	(AnGn)n(GAGAGAAA)13(GAAA)34	<i>Neumann & Wetton, 1996</i>
Mau 25 F Mau 25 R	5'-GTTGCTTCTACCACCTATTC-3' 5'-GTAACACAGATGAATGGATGA-3'	55	122-154	(AC)15	<i>Alderson et al. 1999</i>
Mau 20 F Mau 20 R	5'-TAAAAACAACAACAGCAAAC-3' 5'-ACTCAACGCCTGTAGTAGTAA -3'	52	120-172	(GT)25 AT(GT)2 (T)2 (GT)5	<i>Alderson et al. 1999</i>
Mau 29 F Mau 29 R	5'-CCCAAACCCCTCTATGATTC-3' 5'-GATTCTGACGCAAGGAGTCT-3'	55	115-137	(AC)6 GA (CA)14	<i>Alderson et al. 1999</i>
CB.1 F CB.1 R	5'- ACTTGTCTGATTACTGATGGATAAAGCC T-3' 5'-AATCAAGTATAATGTTCTGCGTA-3'	55	203-267	(GGTA)4 (GATA)10	<i>Longmire et al. 2001</i>
CB.15 F CB.15 R	5'- GGCTGTATAATATTTAAAATAGGATTCA CT-3' 5'- TAATTCATCTAGCATCTTTGAAGTCACTT- 3'	55	241-273	(GATA)4 GGTA (GATA)12	<i>Longmire et al. 2001</i>
CB.12 F	5'- AACGCTAGATATTGGACAGTCAGACCT -3'	55	152-248	(GATA)6 (GAAGTA (GATA)3 (GA)2 (GATA)10	<i>Longmire et al. 2001</i>

Locus	Primers	T opt	Rango de tamaño aprox.	Motivo repetido	Bibliografía
CB.12 R	5'-GAGGGGAAAGCGCCCGACCTTGT-3'				
Dpμ15b F Dpμ15b R	5'-AGGATGAACAAATATCAAAGAGA-3' 5'-GATAAATCACATAAGTGGAACA-3'	53	131	(AC)12 AT (AC)2	Alderson et al. 1999
Maμ23 F Maμ23 R	5'-TGCCAGTATTCTCTTTGTGCTT-3' 5'-CTGTGGGATGTAGGAATTGTG-3'	61	160-178	(TG)3 (T)3 (TG)15	Alderson et al. 1999

3.5.3 Juego de cebadores de loci microsatélites testeado

Un grupo de 6 loci microsatélites de los seleccionados en bibliografía, fueron cedidos para ser estudiados en loica pampeana por la Dra. Alicia De la Colina del Laboratorio de Ecología y Comportamiento Animal (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires), los cuales fueron empleados en su tesis doctoral (Colina, 2013). Dichos primers (CB.1, CB.12, CB.15, Maμ20, Maμ25, Maμ29,) fueron empleados en *Molothrus sp* y los mismo estaban marcados con distintos fluorocromos (FAM, VIC, PET y NED). Los cebadores sentido (Forward) llevaban la marcación fluorescente para el análisis de fragmentos.

La amplificación final se realizó agrupando los primers en dos set según el marcador fluorocromo y peso molecular de los loci: (set I: CB.1, CB.12 y CB.15, set II: Maμ20, Maμ25, Maμ29) según la optimización De la Colina. Para esta prueba se utilizaron 3 muestras de ADN de loica pampeana (SD10, SD39, SD55). Para ambos sets se utilizó un volumen total de 10μl con aproximadamente 5 ng/μl de ADN y el mix de reacción conteniendo: 0,2μM de cada uno de los cebadores (los cebadores sentido llevaban la marcación fluorescente para el análisis de fragmentos), 5μl de Master Mix (Immomix, Bionline) y agua ultrapura hasta completar los 10μl de reacción. Se realizó una *touchdown* siguiendo las indicaciones de PCR De la Colina, con los siguientes ciclos: una etapa inicial de

desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguida por 10 ciclos: 30 segundos a 94°C, 45 segundos bajando la temperatura de 55°C a 53°C (bajando medio grado cada 2 ciclos) y 45 segundos a 72 °C, luego 30 ciclos: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C y 45 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final a 72°C por 40 minutos. Dicha reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo Veriti (Applied Biosystems).

Los fragmentos amplificados fueron verificados mediante corridas electroforética en un gel de agarosa al 2% (Invitrogen). Un μL del producto del PCR fue agregado a 9 μL de solución formamida/LIZ600 (*Applied Biosystems*), que fue corrido y detectado en un secuenciador *Applied Biosystems 3500xL-Avant Genetic Analyzer* del laboratorio GeniaGEO.

La corrida de los fragmentos se realizó en un microcapilar de 50 cm de largo usando el polímero POP7 (*Applied Biosystems*) con los siguientes parámetros: 15 kV, 100 A, and 11mW a 60°C por 35 min. El análisis de fragmentos se realizó utilizando el software libre *MicroChecker 2.2.3* (*Van Oosternhout et al. 2004*) y el software con licencia *Genemapper IDX* (*Applied Biosystems*). Se determinó el tamaño en pares de bases de los alelos para los loci que se pudieron amplificar con éxito y se asignó el genotipo a cada una de las muestras.

3.5.4 Segundo set de microsatélites testeados

Como segundo paso, los demás loci de microsatélites seleccionados se enviaron a sintetizar a la empresa *IDT (Integrated DNA Technologies)*. La PCR se realizó utilizando tres cebadores: un cebador forward con una región complementaria a la que flanquea el microsatélite en cuestión, más una cola

de M13 (-21) en el extremo 5'; un cebador reverse secuencia específica del extremo 3' del microsatélite; y el cebador universal M13 (5'[6-FAM]TGTAACGGCCAGT-3'). Para esta prueba se emplearon las mismas 3 muestras de ADN de loica pampeana (SD10, SD39, SD55) testadas para el primer set de microsatélites. Se utilizó un volumen de reacción de 10µL, conteniendo 5ng de ADN, 5 pmol del cebador forward con la secuencia M13 (-21), 20 pmol del cebador universal M13 (-21), 20 pmol del cebador reverse específico, 5µl de *Master Mix Imommix* (Bioline). Las condiciones de termociclado consistieron en dos etapas diferentes; los primeros ciclos permitían que se incorporara el cebador forward; se eligió una única temperatura de hibridación para todos los cebadores, la segunda etapa permitía la incorporación del cebador M13. El ciclado se realizó en termociclador Veriti (A.B.) siguiendo estas condiciones: 10 minutos a 95°C, seguido de 29 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de 9 ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para confirmar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen), donde se corrieron 5µL de cada uno de los productos del PCR. La corrida se extendió por 120 min a 100 V y 50 mA, se incluyó una escalera de ADN de 50 pb DNA Ladder (Bioron). Un µL del producto del PCR fue agregado a 9 µL de solución formamida/LIZ600 (*Applied Biosystems*), que fue corrido y detectado en un secuenciador *Applied Biosystems 3500xL-Avant Genetic Analyzer* del laboratorio GeniaGEO.

La migración se realizó en un microcapilar de 50 cm de largo usando el polímero POP7 (*Applied Biosystems*) con los siguientes parámetros: 15 kV, 100 A, and 11mW a 60°C por 35 min. El análisis de fragmentos se realizó utilizando el software libre *MicroChecker 2.2.3* (*Van Oosternhout et al. 2004*) y el software con licencia *Genemapper IDX* (*Applied Biosystems*). Se determinó el tamaño en

pares de bases de los alelos para los loci que se pudieron amplificar con éxito y se asignó el genotipo a cada una de las muestras.

3.5.5 Obtención de fragmentos de microsatélites y genotipificación

A partir de los resultados obtenidos con el 2do set de microsatélites testeados, 4 marcadores seleccionados se enviaron a sintetizar (cebadores sentidos con marcador fluorocromo indicado en tabla 9), mediante ThermoFisher-Scientific. En tabla 9 se detallan todos los marcadores seleccionados para amplificar en loica pampeana.

Tabla 9. Se detallan cada marcador con su rango de tamaños, color de fluorocromo con el que se encuentra marcado, color en que emite y a que grupo pertenece para la Multiplex PCR (1 o 2).

Loci	Tamaño (pb)	Fluorocromo	Color en que emite	Set para Multiplex
Maμ25	112-170	FAM™	Azul	1
Maμ29	115-137	HEX™	Rojo	1
Pca3	142-176	NED™	Negro	1
Maμ23	160-178	HEX™	Rojo	1
CB1	187-241	PET®	Amarillo	2
CB15	207-261	FAM™	Azul	2
Dpμ15b	129-183	NED™	negro	2

Se desarrollaron dos multiplex para la amplificación PCR: cuatro loci en multiplex 1 y tres loci en multiplex 2, la elección de los conjuntos de loci por multiplex se basó en las temperaturas de anidamiento de los cebadores (las más similares posibles), los tamaños esperados de los productos lo menos solapados y que presenten diferencias en el fluorocromo. La combinación de estos aspectos permite asignar con relativa facilidad el fragmento observado a un locus determinado.

Luego de varias optimizaciones en cuanto a las concentraciones finales para cada loci microsatélite, el Multiplex 1 consistió en un volumen de reacción de 10ul conteniendo: 5ng de ADN, 5µl de *Master Mix Immomix* (Bioline), 30pmol de cada cebador F+R de Maµ25, 8pmol de cada cebador F+R de Maµ29, 5 pmol de cada cebador F+R de Pca3, 20 pmol de cada cebador F+R de Maµ23 y agua ultrapura hasta completar los 10ul de reacción.

Se optimizaron las concentraciones finales para cada loci microsatélites para el Multiplex 2. El mismo consistió en un volumen de reacción de 10µl conteniendo 5ng de ADN, 5µl de *Master Mix Immomix* (Bioline), 15 pmol de cada cebador F+R de CB1, 10 pmol de cada cebador F+R de CB15, 10 pmol de cada cebador F+R de Dpµ15b, y agua ultrapura hasta completar los 10µl de reacción.

Los Multiplex de PCR 1 y 2 se amplificaron en un termociclador Veriti (A.B) siguiendo estas condiciones: una etapa inicial de 95°C por 10 minutos, seguida por 10 ciclos: 30 segundos a 94°C, 45 segundos bajando la temperatura de 55°C a 53°C (bajando medio grado cada 2 ciclos) y 45 segundos a 72 °C, luego 30 ciclos: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C y 45 segundos a 72°C, seguidos por una extensión final a 72°C por 40 minutos.

Todas las muestras fueron procesadas y los productos de PCR se corrieron mezclando 1µL del producto del PCR con 9 µL de solución formamida/LIZ600 (*Applied Biosystems*), y se corrieron en un secuenciador *Applied Biosystems* 3500xL *Genetic Analyzer* del laboratorio GeniaGEO.

La migración se realizó en un microcapilar de 50 cm de largo usando el polímero POP7 (*Applied Biosystems*) con los siguientes parámetros: 15 kV, 100 A, and 11mW a 60°C por 35 min. El análisis de fragmentos se realizó utilizando el

software libre *MicroChecker 2.2.3* (Van Oosterhout *et al.* 2004) y el software con licencia *Genemapper IDX* (Applied Biosystems). Se determinó el peso molecular de los alelos para los loci que se pudieron amplificar con éxito y se asignó el genotipo a cada una de las muestras.

3.6 Cálculo de los parámetros poblacionales

3.6.1 Errores de genotipado

Se pueden encontrar distintos tipos de errores durante el genotipado, estos son errores estocásticos (ausencia de alélelos y tartamudeo) y errores sistemáticos (alelos nulos) (Pompanon *et al.* 2005; Cosse 2010).

Los errores estocásticos pueden ser observados debido al reducido número de copias del ADN molde, la amplificación puede producir varias copias de relativamente baja calidad. Esta pérdida de alelos puede causar asignación incorrecta de homocigotas, subestimando la heterocigosidad observada (Wang *et al.* 2012).

Por otro lado, los errores sistemáticos son aquéllos que se originan a partir de mutaciones en el sitio de unión al cebador, dando lugar a alelos no amplificados (alelos nulos) o estocásticos, por artefactos en el proceso de amplificación que producen la ausencia de alelos (*pérdida de alelos*) donde pueden ocurrir deleciones y por lo tanto pequeños cambios en el peso de algunos alelos acentuando el efecto de "*stuttering*". Este efecto provoca un mayor número de picos alrededor del pico correspondiente al verdadero alelo, lo que puede dar lugar a errores de interpretación en el proceso de genotipado, al no poder distinguir si el alelo es homocigota o heterocigoto, este tipo de error es común en repetidos de dinucleótidos (Oosterhout *et al.* 2004).

Cuando estos alelos no amplifican se producen falsos homocigotas, generando así deficiencia en la frecuencia de ciertos heterocigotas (Selkoe & Toonen 2006; Chapuis & Estoup 2007; Cosse 2010). Tales errores de genotipado suelen ocasionar desvíos de las proporciones esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) (Oosterhout *et al.* 2004).

Se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004) para evaluar los errores de genotipado causados por alelos nulos, pérdida de alelos o errores de genotipado. Luego de identificar la presencia o no de estos errores, el software puede estimar las frecuencias de alelos nulos y ajustar las frecuencias observadas, las cuales pueden ser utilizadas en análisis de genética poblacional (Oosterhout *et al.* 2004). El software Micro-Checker implementa una distribución binomial acumulada para calcular la probabilidad observada de homocigotos dentro de cada clase de alelo homocigota (Weir, 1996). Los valores de p son calculados a través de un ranking de frecuencias observadas en la distribución al azar de genotipos. Finalmente se identifican desviaciones significativas de las proporciones esperadas para el equilibrio H-W, indicando si las mismas son consistentes con alelos nulos, errores de genotipado o pérdida de alelos (Oosterhout *et al.* 2004; Cosse 2010). El software ofrece distintos estimadores de alelos nulos, otorgando sugerencias sobre cuál estimador es más apropiado en cada situación (Oosterhout *et al.* 2003-2005). En este caso, dado que los loci no amplificados podrían ser artefactos, tener alelos nulos, ADN degradado o problemas con el PCR el programa sugiere utilizar la ecuación de Brookfield 1

(Brookfield, 1996):

$$\hat{r} = (H_e - H_o) / (1 + H_e)$$

Siendo H_o la heterocigosidad observada calculada a partir de los datos como $n_2/(n_1+n_2)$, en donde n_1 es el número de homocigotas y n_2 el de heterocigotas en la muestra en un alelo dado. H_e es la heterocigosidad esperada calculada como la suma del producto de todas las frecuencias alélicas observadas (Oosterhout *et al.* 2003-2005).

3.6.2 Test de equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) es la base de las teorías evolutivas y de la genética de poblaciones. Establece que en una población ideal, sin fuerzas evolutivas actuando, las frecuencias génicas y genotípicas se mantendrán constantes de generación a generación y se relacionarán, para un locus con dos alelos con una distribución binomial de homo y heterocigotas (Beebee & Rowe, 2008) de acuerdo con la siguiente relación:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p y q son las frecuencias de los alelos A y a en la población. El análisis del equilibrio de H-W sirve como hipótesis nula, para la comprensión de los procesos que afectan a una población real sometida a diferentes fuerzas evolutivas.

El marcador genético utilizado para analizar procesos demográficos en una población, debe ser neutro desde el punto de vista evolutivo. Esto significa que no esté bajo presión de selección. Cada uno de los loci utilizados en este trabajo, fue evaluado para estimar la probabilidad de que se encontrara en equilibrio de H-W. Para un locus autosómico con m -alelos, los arreglos genotípicos dados según la ley de H-W deben ser los siguientes:

$$\sum_i p_i A_i A_i + \sum_{i < j} 2 p_i p_j A_i A_j$$

p_i es la frecuencia alélica de A_i y p_j la frecuencia alélica de A_j . Una vez que se estableció que cada uno de los loci se encuentra en equilibrio de H-W, el conjunto de microsatélites puede ser utilizado para analizar si una población dada está en equilibrio. Mediante el programa GenePop versión 4.0 en línea, se estimó la probabilidad exacta para H-W (Raymond & Rousset 1995) que emplea cadenas de Markov mediante el método descrito por Guo & Thomson (1992). Se realizó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989).

3.6.3 Desequilibrio de ligamiento

Para que todos los loci que se incluyen en un análisis aporten nueva información, se debe confirmar previamente que no exista desequilibrio de ligamiento. Esto significa que los genotipos presentes en un locus deben ser independientes a los genotipos en otro locus (Weir 1996; Rousset 2008). Para ello, el coeficiente de desequilibrio de ligamiento (D) analiza la asociación entre genotipos diploides en ambos loci. Para los alelos A y B en dos loci, este coeficiente compara la frecuencia gamética (p_{AB}) con el producto de las frecuencias alélicas ($p_A p_B$) (Weir, 1996) según:

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$$

Este análisis fue realizado para cada par de locus mediante un test de X^2 en el software GenePop (Raymond & Rousset 1995). Se realizaron las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989).

3.6.4 Contenido de información polimórfica y probabilidad de no exclusión

El grado de información que nos puede proveer un conjunto de loci de microsatélites dependerá de cuan informativos o polimórficos sean cada uno de los loci incluidos. El polimorfismo de un marcador genético estará dado por el número y la frecuencia de alelos que presente. El índice de Contenido de Información Polimórfica (PIC) (Botstein *et al.* 1980) es definido como la probabilidad de que se pueda deducir, a partir de un marcador de genotipo de la descendencia, de qué parental fueron heredados cada uno de sus alelos (Botstein *et al.* 1980; Guo & Elston 1999). Para un locus con n -alelos el valor de PIC se calcula de la siguiente manera:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

p_i y p_j son las frecuencias alélicas para los n alelos de un locus (Botstein *et al.* 1980). Cuando $PIC > 0,5$ se considera altamente informativo, razonablemente informativo para $0,5 > PIC > 0,25$ y débilmente informativos $PIC < 0,25$ (Botstein *et al.* 1980). Cuando se construyen genealogías a partir de datos moleculares es posible rechazar una hipótesis de parentesco debido a la ausencia de alelos compartidos. Sin embargo, al existir homoplasia, se puede calcular la probabilidad de que dos individuos que comparten alelos puedan tener una relación de parentesco dada. Por consiguiente, se puede determinar la probabilidad de error en el proceso de exclusión de padres potenciales en un análisis de parentesco. La probabilidad de no exclusión para el par parental (NE-PP) es la probabilidad de considerar como posible par parental a dos individuos que no son los padres. Esta probabilidad de no exclusión (NE-PP) se puede estimar para un individuo dado en un locus (Marshall 1998-2007; Kalinowski *et al.* 2007). En el análisis de identidad, la probabilidad de no exclusión es la probabilidad de que los genotipos en un locus no se diferencian

entre dos individuos elegidos al azar. Ésta puede ser calculada de dos maneras, una de ellas asume que los dos individuos no están relacionados (NE-I) mientras que la otra permite que los individuos puedan ser hermanos (NE-SI) (Marshall 1998-2007; Waits *et al.* 2001).

Las probabilidades de no exclusión, así como también el PIC fueron estimados mediante el uso del programa Cervus 3.0 ® (Marshall 1998-2007). Fueron calculados para cada locus y se halló el promedio para el conjunto de loci.

3.6.5 Análisis de parentesco

El coeficiente r es una medida continua de la similitud genética por parentesco entre dos individuos respecto a dos individuos aleatorios de una población de referencia y expresa la proporción de alelos idénticos compartidos en promedio por descendencia directa. Los valores teóricos que el coeficiente r puede tomar para las relaciones de parentesco más comunes pueden observarse en la Figura 10. Con la utilización del software libre *iRel* versión 1.0 (Gonçalves da Silva & Russello 2011), se calcularon los coeficientes de parentesco según Queller & Goodnight (1989) y Lynch & Ritlands (1999) y se evaluó siguiendo la metodología descrita en Russello & Amato (2004), el desempeño de cada estimador según la distribución de frecuencias alélicas de la muestra. Una vez seleccionado el mejor estimador, se calculó el coeficiente de parentesco entre muestras utilizando el software libre *ML-Relate* (Kalinowski *et al.* 2006).

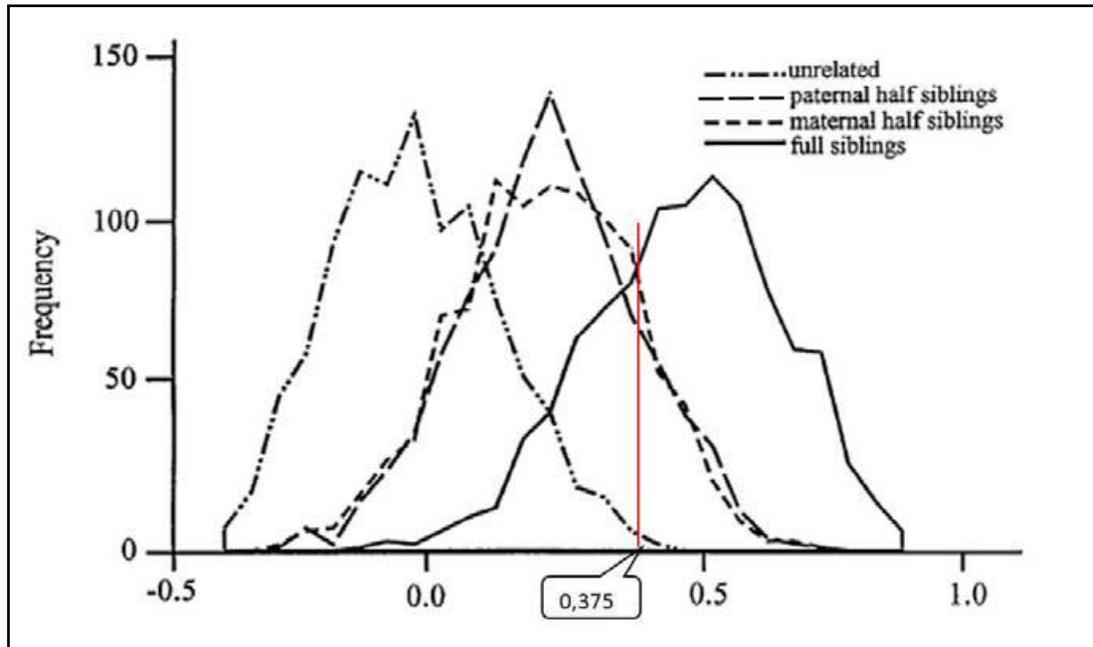


Figura 10. Distribución de probabilidades del coeficiente de parentesco (valor r) para individuos no relacionados (línea con puntos), medio hermanos maternos y paternos (líneas incompletas), y hermanos completos (línea completa) (tomado de Queller y Goodnight 1989).

El programa *ML-Relate* calcula el coeficiente entre individuos evaluando los casos de a pares y utilizando el método de estimación de r por máxima verosimilitud (Blouin 2003; Wagner *et al.* 2006). Milligan (2003) demostró que las estimaciones del coeficiente de parentesco por este método estadístico usualmente poseen menor error que otros estimadores.

A partir de los valores de r para cada par de muestras, se identificaron aquellos pares que correspondían a hermanos completos. Esto incluiría pares de huevos puestos por la misma hembra y fertilizados por el mismo macho. No

se utilizaron aquellos pares de huevos correspondientes a medios hermanos dado que no se puede distinguir si son medio hermanos paternos o maternos. El valor de corte teórico para distinguir entre medio hermanos y hermanos completos es $r = 0.375$ (ver fig. 1, Blouin *et al.* 1996). Al existir una probabilidad no nula de asignar erróneamente una relación de parentesco si el valor de r observado cae por fuera del rango de valores de r esperados teóricamente, para minimizar este error se calculó el valor de corte específico para las muestras del presente estudio (obtenido de utilizar las frecuencias alélicas muestrales) utilizando el software *iRel* según el procedimiento detallado en Russello & Amato (2004).

Una vez calculado el coeficiente r se estableció la relación de parentesco con la mayor probabilidad para cada par de pichones que presentaron valores de r mayores al valor de corte. Para ello se utilizó el programa *ML-Relate* que compara la probabilidad de las diferentes relaciones de parentesco posibles entre dos individuos, basado en simulaciones y en los datos genotípicos. La robustez de estas estimaciones se puso a prueba utilizando una prueba de hipótesis específica para cada par de individuos, donde se plantea como relación putativa y la relación alternativa de hermanos completos versus medio hermanos con 10.000 simulaciones (Kalinowski *et al.* 2006). Este procedimiento permite maximizar la potencia para rechazar la hipótesis alternativa ($p < 0,05$) y de este modo reducir la probabilidad de cometer un error de tipo I (tomar una relación entre pichones como hermanos completos cuando son medio hermanos). Las metodologías estadísticas que utiliza el *ML-Relate* para estos test son las mismas que comúnmente se utilizan en los análisis de pedigrí (Goodnight & Queller 1999, McPeck & Sun 2000, Kalinowski *et al.* 2006).

3.6.6 Estudio de filopatría y dispersión

La dispersión sesgada o asimétrica entre sexos, donde los individuos de un sexo pueden quedarse o volver a su sitio natal (o grupo) para reproducirse, mientras que los individuos del otro sexo tienden a dispersarse, es una tendencia común en especies de vertebrados. En general, los mamíferos presentan una dispersión sesgada a los machos (los machos tienen mayor tasa de dispersión que las hembras) (Dobson 1982) mientras que en las aves el patrón es generalmente inverso (Greenwood 1980; Clarke *et al.* 1997).

Slatkin (1985) distingue dos clases de métodos para estimar los niveles de dispersión de las poblaciones naturales. Uno de ellos es el “método directo”, basado en las observaciones de campo sobre la especie, aunque este método resulta muchas veces difícil de aplicar en algunas especies elusivas. Por ello, con los avances de la biología molecular han proporcionado acceso a la información de dispersión mediante “métodos indirectos”. Estos métodos se pueden aplicar permitiendo efectuar inferencias del comportamiento de los individuos (Neigel 1997). Se pueden distinguir entre dos tipos: métodos basados en marcadores heredados bi-parentales (por ejemplo, microsatélites) y los contruidos a partir de las comparaciones entre los marcadores con diferentes tipos de herencia (por ejemplo, ADN mitocondrial y marcadores ligados al cromosoma sexual del macho, ambos heredados uni-parentalmente) (Prugnolle & Meeus 2002).

En general los estudios de dispersión sesgada al sexo se realizan mediante datos de ADN mitocondrial en conjunto con marcadores nucleares (Prugnolle & Meeus 2002). De esta manera se toma en cuenta la contribución genética de ambos sexos a la diversidad genética de la progenie. Si solo tomáramos en

cuenta un marcador uni-parental, la información se vería sesgada (Prugnolle & Meeus 2002). En aquellas situaciones donde un sexo es filopátrico y el otro sexo se dispersa, los individuos del sexo filopátrico tienen una mayor grado de parentesco entre ellos que entre aquellos que se dispersan (Knight *et al.* 1999).

En el caso de inferir la tendencia en las tasas de migración entre machos y hembras es necesaria una comparación entre estimaciones del estadístico F_{st} de Wright entre sub-poblaciones (Rassman *et al.* 1997; Balloux *et al.* 1998; Mossman & Waser 1999). De hecho, F_{st} es un parámetro que mide la diferenciación genética (es decir, diferencias en las frecuencias alélicas) entre las poblaciones (Hartl & Clark 1997). Uno puede esperar que el sexo con mayor dispersión tendrá un menor valor de F_{st} entre los sub-poblaciones en comparación con el sexo que se dispersa menos (Mossman & Waser 1999).

En el caso de la loica pampeana, se abordó el análisis de filopatría mediante marcador nuclear (microsatélites). Para ello se empleó el programa *STRUCTURE 2.2* (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000). El programa implementa un método de agrupamiento basado en modelos para inferir la estructura de la población que utiliza los datos de genotipo que consta de marcadores no ligados. Los parámetros empleados para ejecutar el *STRUCTURE* fueron burn-in= 10.000 y un MCRC (Markov chain Monte Carlo) de 20.000 para calcular la distribución. Se empleó el modelo "admixture" y la opción de frecuencias alélicas correlacionadas. En todos los demás parámetros se dejaron los valores por defecto. El rango de K_s evaluado fue desde 1 hasta 5 clústers.

3.6.7 Número efectivo de la población

El número efectivo de la población (N_e) fue estimado con el programa LDNE (Waples & Do 2008, 2010) que se basa en el desequilibrio de ligamiento de las frecuencias alélicas en la población, según:

$$\hat{N}_e = \frac{1}{3(\hat{r}^2 - 1/S)}$$

Donde r^2 es un estimador del cuadrado de la correlación de las frecuencias alélicas para cada par de loci y S corresponde al número de individuos utilizado en el análisis genético, para el desarrollo de esta fórmula ver Waples & Do (2010). Este análisis permite evaluar el sesgo de los alelos que se encuentran en baja frecuencia. Para ello el estimador r^2 se computa de manera independiente, excluyendo aquellos alelos que se encuentran por debajo de una frecuencia dada (por ejemplo 0,05; 0,02; 0,01).

3.6.8 Análisis de procesos de cuello de botella

El análisis de procesos de cuello de botella reciente se realizó usando el programa BOTTLENECK versión 1.2.0.2 (Cornuet & Luikart 1996). Una población que sufrió un cuello de botella reciente experimenta una reducción tanto en el número como en la heterocigosidad de loci polimórficos, pero el número de alelos se reduce más rápidamente que la heterocigosidad (Luikart *et al.* 1998). Es así que se espera observar un exceso de la heterocigosidad en relación a lo esperado en el equilibrio de H-W, dejando vacíos en la distribución de alelos de la población (Hajji *et al.* 2007) y esto se ha visto en un gran número de poblaciones salvajes (Hudson *et al.* 2000; Keller *et al.* 2001; Nyström *et al.* 2006; Packer *et al.* 1991; Zhang *et al.* 2004). En el análisis se incluyeron tres modelos de evolución de microsatélites, el modelo mutacional paso a paso estricto o de

alelos infinitos (**IAM**), el modelo de mutación de un paso (**SMM**) y el de dos fases o híbrido (**TPM**). Este último sería el más apropiado ya que el modelo de IAM y SMM no son buenos explicando la dinámica mutacional en *loci microsatélites* (Di Rienzo *et al.* 1994).

El modelo de dos fases (TPM) requiere la especificación de dos parámetros: (1) el porcentaje de mutaciones que siguen un estricto proceso mutacional paso a paso y (2) la varianza en el tamaño de mutaciones de múltiples pasos. Nuevos conocimientos sobre la dinámica mutacional de microsatélites en aves sugieren que hasta ~ 60% a 80% de las mutaciones implican un cambio de un solo paso (Brohede *et al.* 2002, 2004; Beck *et al.* 2003; Ibarguchi *et al.* 2004; Ortego *et al.* 2008). Se realizó el modelo de dos fases teniendo en cuenta los rangos observados de tamaños de los alelos de microsatélites detectados en loica pampeana (Anexo II), (Di Rienzo *et al.* 1994). Para cada análisis se realizarán 1000 réplicas.

3.6.9 Número de migrantes

La migración tiende a homogeneizar la constitución genética entre los demos, es así que el número promedio de migrantes con éxito reproductivo (Nm) entre dos subpoblaciones puede ser derivado del F_{ST} en función de la siguiente ecuación:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{F_{st}} - 1\right)}{2}$$

Los estadísticos F , el número de migrantes y la heterocigocidad, fueron evaluados con el programa GENEPOP en línea (Raymond & Rousset 1995;

Rousset 2008), este usa una estimación del número de migrantes por el método de alelos privados (Barton & Slatkin 1986).

3.7 Resultados de los análisis de marcadores loci microsatélites

3.7.1 Panel de microsatélites seleccionado para loica pampeana

El patrón de amplificación en tres individuos, de los 15 cebadores testeados, fue consistente para 7 loci (Tabla 11). El locus HrU2 y LOX1 resultaron ser monomórficos, y se descartan para posteriores amplificaciones. Los loci Pca7, Pca4, Pca8, Pdo u3 y CB12 no lograron amplificarse o bien se observó un patrón no claro en la amplificación, en el caso de CB12, se observaron múltiples fragmentos amplificados en el gel de agarosa, por lo que se descartaron todos ellos para posteriores amplificaciones.

Tabla 11. Lista de los loci testeados con los alelos observados en los tres individuos analizados. N/A: no amplificable; A/I: amplificación inespecífica.

Numero	Locus	SD10	SD39	SD55	Alelos	Observaciones
1	LOX1	259 / 259	259 / 259	259 / 259	1	Buen patrón de amplificación, MONOMÓRFICO
2	HrU2	127 / 127	127 / 127	127 / 127	1	Buen patrón de amplificación, MONOMÓRFICO
3	Pca7	N/A	N/A	N/A	-	No amplificable
4	Pca4	N/A	N/A	N/A	-	Patrón de amplificación no claro
5	Pca8	N/A	N/A	N/A	-	No amplificable
6	Pca3	150 / 157	159 / 165	161 / 163	6	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO
7	Pdo u3	N/A	N/A	N/A	-	No amplificable
8	Mau 25	116 / 133	119 / 145	124 / 126	6	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO
9	Mau 20	A/I	A/I	A/I	-	Amplificación inespecífica
10	Mau 29	122 / 128	119 / 132	119 / 122	4	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO
11	CB.1	206 / 207	229 / 241	202 / 202	5	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO

12	CB.15	229 / 310	207 / 211	233 / 245	6	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO
13	CB.12	N/A	N/A	N/A	-	No amplificable
14	Dpμ15b	144 / 165	152 / 152	137 / 165	4	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO
15	Maμ23	166 / 168	164 / 174	165 / 168	5	Buen patrón de amplificación, POLIMÓRFICO

La combinación de los *loci* microsatélites seleccionados con el cebador universal unido a fluorocromo M13 (Schuelke 2000) sirvió para seleccionar un grupo de marcadores genéticos hipervariables, lo cual es una buena herramienta en ecología molecular (a un costo reducido).

3.7.2 Caracterización de loci microsatélites en loica pampeana: Errores de genotipados

Mediante los 7 loci seleccionados se genotipificaron 53 muestras de las dos poblaciones de loica pampeana, la información de los genotipos obtenidos para este análisis se muestra en Anexo II.

Población de Arerunguá:

Para las 38 muestras de la población de loica pampeana de Arerunguá, el análisis de errores en el genotipado con los 7 microsatélites mostró que 5 de ellos presentaban alelos nulos (Ver tabla 12). Se realizó la corrección de genotipos para estos loci, según el algoritmo de Brookfield¹ para cada loci.

Tabla 12. Resultado de la corrección de frecuencias alélicas para la población de loica pampeana de Arerunguá, se detalla el locus, la presencia de alelos nulos y la frecuencia estimada según las distintas aproximaciones.

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
CB1	No	-0,004	-0,0037	-0,0034	0,3439
CB15	Yes	0,0911	0,0895	0,0757	0,1764
Maμ25	Yes	0,0798	0,0861	0,0764	0,5435
Maμ29	Yes	0,0832	0,0881	0,0745	0,1756
Pca3	Yes	0,0958	0,1072	0,0891	0,297

Dpμ15b	Yes	0,138	0,1555	0,1284	0,3849
Maμ23	No	-0,0067	-0,006	-0,0055	0,552

Luego de corregir las frecuencias alélicas, 3 loci se encontraban bajo equilibrio H-W, y luego de aplicar la corrección de Bonferroni ($p > 0,0023$) solo 1 loci: Dpμ15b siguió presentando un valor de **p** altamente significativo.

Para calcular la presencia de exceso de homocigotas se calculó el índice Fis para cada locus (Tabla 13). Los valores hallados son moderados, pero todos ellos de signo positivo, por lo tanto, indican un exceso de éstos.

Tabla 13. Resultado del análisis de equilibrio H-W para cada locus, población de Arerunguá y coeficiente de endogamia (FIS). En negrita los loci que se encuentran dentro del equilibrio H-W.

Locus	P-val	FIS	Steps
CB1	0.4114	0.0107	1222 switches
CB15	0.0953	0.1475	1766 switches
Maμ25	0.0061	0.1801	1158 switches
Maμ29	0.0149	0,1760	5478 switches
Pca3	0.0163	0,2088	4523 switches
Dpμ15b	0.0000	0,2848	1586 switches
Maμ23	0.4209	0,0123	8136 switches

El estudio de diversidad alélica para esta población reveló un rango de entre 9 a 19 alelos por locus (Tabla 14), Maμ23 presentó la menor diversidad alélica mientras que Dpμ15b y Maμ25 la mayor. La diversidad alélica promedio fue de 15 alelos/locus.

Población de Bahía Blanca:

Para las 15 muestras genotipadas de la población de loica pampeana de Bahía Blanca, el análisis de errores en el genotipado de los 7 microsatélites mostró que 3 de ellos presentaban alelos nulos (Ver tabla 14). Se realizó la corrección de genotipos para estos loci, según el algoritmo de Brookfield¹ para cada loci).

Tabla 14. Resultado de la corrección de frecuencias alélicas para la población de loica pampeana de Bahía Blanca, se detalla el locus, la presencia de alelos nulos y la frecuencia estimada según las distintas aproximaciones.

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
CB1	No	-0,0728	-0,0516	-0,048	0,6053
CB15	No	0,1353	0,145	0,1098	0,3124
Maμ25	Yes	0,1913	0,2453	0,1781	0,6148
Maμ29	No	-0,0915	-0,0728	-0,0701	0,0841
Pca3	Yes	0,2242	0,2941	0,2083	0,4514
Dpμ15b	Yes	0,1398	0,1572	0,1274	0,3128
Maμ23	No	-0,1887	-0,1321	-0,1186	0,7226

Luego de corregir las frecuencias alélicas, 3 loci se encontraban bajo equilibrio H-W, y luego de aplicar la corrección de Bonferroni solo el loci Maμ25 y Pca3 presentaron un valor de **p** altamente significativo (Ver tabla 14). Para calcular la presencia de exceso de homocigotas se calculó el índice Fis para cada locus (Tabla 15). Los valores hallados son moderados a bajos, solamente Dpμ15b presentó valor 0, pero todos ellos de signo positivo, por lo tanto, indican un exceso de homocigotas.

Tabla 15. Resultado del análisis de equilibrio H-W para cada locus, población de Bahía Blanca. En negrita los loci que se encuentran dentro del equilibrio H-W.

Locus	P-val	FIS	Steps
CB1	0.4188	0.0378	1222 switches
CB15	0.1165	0.0220	1766 switches
Maμ25	0.0008	0.0044	1158 switches
Maμ29	0.7955	0.0043	5478 switches
Pca3	0.0002	0.0068	4523 switches
Dpμ15b	0.0145	0.0000	1586 switches
Maμ23	0.4063	0.0204	8136 switches

El estudio de diversidad alélica para esta población reveló un rango de entre 4 a 11 alelos por locus, Maμ23 presentó la menor diversidad alélica

mientras que Dp μ 15b la mayor. La diversidad alélica promedio fue de 7,3 alelos/locus.

Los errores de genotipados encontrados en los análisis de las muestras de loica pampeana pueden deberse a que varios de los loci seleccionados presentan repetidos de dinucleótidos (Ma μ 23, Pca3, Ma μ 25, Ma μ 29, Dp μ 15b), este tipo de repetidos produce muchas veces cierto "tartamudeo" lo que dificulta la asignación de alelos (Oosterhout *et al.* 2004).

3.7.3 Desequilibrio de ligamiento

El análisis de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci reveló que todos los loci presentaban un valor mayor a $p=0,0023$ y por lo tanto no significativo luego de la corrección de Bonferroni. Ninguno de los 7 loci resultó ligado a otro lo cual significa que la información que aporta cada uno de los locus al análisis es independiente y aporta información al realizar estudios poblacionales que se requieran con este grupo de microsatélites (Ver tabla 16).

Tabla 16. Comparaciones múltiples entre los loci analizados para determinar desequilibrio de ligamiento.

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches
CB1	CB15	0.57541	0.047829	286
CB1	Maμ25	1.00000	000000	410
CB15	Maμ25	1.00000	000000	417
CB1	Maμ29	0.01062	0.007512	376
CB15	Maμ29	0.01927	0.012664	307
Maμ25	Maμ29	1.00000	000000	348
CB1	Pca3	0.51771	0.047049	562
CB15	Pca3	0.49908	0.046253	473
Maμ25	Pca3	0.27386	0.043694	405
Maμ29	Pca3	0.0398	0.01814	575
CB1	Dpμ15b	1.00000	000000	423
CB15	Dpμ15b	0.35079	0.046159	248
Maμ25	Dpμ15b	0.13371	0.03323	380
Maμ29	Dpμ15b	0.14869	0.033523	373
Pca3	Dpμ15b	0.05833	0.023255	471
CB1	Maμ23	1.00000	000000	649
CB15	Maμ23	0.50086	0.044938	715
Maμ25	Maμ23	0.1635	0.035215	541
Maμ29	Maμ23	1.00000	000000	666
Pca3	Maμ23	0.44915	0.044826	918
Dpμ15b	Maμ23	0.50283	0.045085	759

3.7.4 Diversidad alélica y PIC para todas las muestras

La diversidad alélica encontrada presenta un rango en toda la muestra, de entre 9 y 22 alelos por locus (Tabla 17), siendo la diversidad alélica global promedio de 16,3 alelos/locus.

La heterocigosidad esperada incluyendo todos los loci fue de 0,89 y el valor de la heterocigosidad observada incluyendo todos los loci fue de 0,74. Por lo que se puede observar que la población presenta variabilidad genética.

El valor medio de PIC de 0,867. La probabilidad de no exclusión de paternidad incluyendo todos los loci es de NE-1P= 0.00102 y NE-2P= 0.0000352. La probabilidad combinada de no-exclusión P (ID)= 4.58E-09.

Tabla 17. Se presentan los valores de diversidad alélica y contenido de información polimórfica observada. K: número de alelos detectados; N: número de individuos analizados; H. Obs: Heterocigosidad observada; H. Exp: Heterocigosidad esperada; PIC: Contenido de Información Polimórfica; NE-1P: probabilidad de no exclusión para el primer parental; NE-2P: probabilidad de no exclusión para el segundo parental.

Locus	k	N	PIC	HObs	HExp	NE-1P	NE-2P
CB1	18	36	0.853	0.861	0.878	0.418	0.263
CB15	14	49	0.868	0.694	0.889	0.386	0.239
Maμ25	20	33	0.925	0.697	0.944	0.249	0.143
Maμ29	13	50	0.848	0.780	0.871	0.428	0.270
Pca3	14	45	0.846	0.622	0.871	0.435	0.277
Dpμ15b	22	44	0.915	0.659	0.931	0.273	0.158
Maμ23	9	27	0.812	0.852	0.848	0.502	0.331

La heterocigosidad esperada es mayor en 5 de los 7 loci y aproximadamente igual en dos de ellos.

Diversidad alélica y PIC en población de Arerunguá:

La heterocigosidad esperada incluyendo todos los loci fue de 0.8875 y la heterocigosidad observada incluyendo todos los loci fue de 0,76 (Tabla 18). El valor medio de PIC fue de 0.8592. La probabilidad de no exclusión de paternidad incluyendo todos los loci para el primer parental fue de NE-1P = 0.00138209 y segundo parental NE-2P = 0.00005036. La probabilidad combinada de no-exclusión P(ID) fue de $9,091 \times 10^{-12}$.

Tabla 18. Se presentan los valores de diversidad alélica y contenido de información polimórfica observada en población de **Arerunguá**. K: número de alelos detectados; N: número de individuos analizados; H. Obs: Heterocigosidad observada; H. Exp: Heterocigosidad esperada; PIC: Contenido de Información Polimórfica; NE-1P: probabilidad de no exclusión para el primer parental; NE-2P: probabilidad de no exclusión para el segundo parental.

Locus	K	N	PIC	HObs	HExp	NE-1P	NE-2P
CB1	17	28	0.837	0.857	0.866	0.446	0.286
CB15	14	35	0.845	0.743	0.87	0.428	0.271
Ma μ 25	19	23	0.926	0.783	0.951	0.247	0.141
Ma μ 29	12	35	0.837	0.714	0.865	0.452	0.29
Pca3	12	32	0.835	0.688	0.866	0.459	0.295
Dp μ 15b	19	30	0.906	0.667	0.928	0.298	0.175
Ma μ 23	9	21	0.829	0.857	0.868	0.473	0.306

Se evidencia más Heterocigotos esperados que los observados en los 7 loci analizados (dos de ellos tienen valores similares para Hexp y Ho).

Diversidad alélica y PIC en población de Bahía Blanca:

La heterocigosidad esperada incluyendo todos los loci fue 0.8329 la heterocigosidad observada incluyendo todos los loci fue de 0,69 (Tabla 19).

El valor medio de PIC fue de 0.7627. La probabilidad de no exclusión de paternidad incluyendo todos los loci fue de NE-1P = 0.01502084 y NE-2P = 0.00109979. La probabilidad combinada de no-exclusión P(ID) fue de 4.85×10^{-9} .

Tabla 19. Se presentan los valores de diversidad alélica y contenido de información polimórfica observada para la población de **Bahía Blanca**. K: número de alelos detectados; N: número de individuos analizados; H. Obs: Heterocigosidad observada; H. Exp: Heterocigosidad esperada; PIC: Contenido de Información Polimórfica; NE-1P: probabilidad de no exclusión para el primer parental; NE-2P: probabilidad de no exclusión para el segundo parental.

Locus	k	N	PIC	HObs	HExp	NE-1P	NE-2P
CB1	7	8	0.759	0.875	0.842	0.584	0.406
CB15	6	14	0.729	0.571	0.794	0.629	0.45
Maμ25	8	10	0.803	0.5	0.868	0.516	0.344
Maμ29	7	15	0.78	0.933	0.834	0.555	0.379
Pca3	8	13	0.828	0.462	0.88	0.475	0.308
Dpu15	11	14	0.871	0.643	0.915	0.384	0.236
Maμ23	4	6	0.569	0.833	0.697	0.781	0.634

Se evidencia más Heterocigotos esperados que los observados en 4 de los 7 loci analizados, otros dos presentan He menor que la observada y CB1 que presenta valores similar entre Hexp y Ho.

El conjunto de loci microsatélites seleccionados para ambas poblaciones (Arerunguá y Bahía Blanca) presentaron un PIC >0,5, y esto se considera altamente informativo (Botstein *et al.*, 1980). Ambas poblaciones presentan una alta probabilidad de no exclusión que permiten ser utilizados para

identificación individual y asignación de parentesco con un alto nivel de confianza. Para evitar errores y malas asignaciones alélicas, es que se busca obtener un conjunto mínimo de marcadores con un buen nivel de diversidad alélica y heterocigosidad (Taberlet *et al.* 1999; Waits *et al.* 2001; Waits & Paetkau 2005). Solamente uno de los marcadores microsatélites se encontraba fuera del equilibrio H-W en la población de Arerunguá y dos en la población de Bahía Blanca.

3.7.5 Equilibrio de H-W y Estadísticos F

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg estableció que las poblaciones de Arerunguá y Bahía Blanca presentan una probabilidad estadísticamente significativa de no estar en equilibrio ($p < 0,0001$). Estas poblaciones no presentan un índice de endogamia importante, siendo la de mayor nivel de endogamia la población de Arerunguá (Tabla 20).

Tabla 20. Se detalla el número de individuos incluidos en este análisis, el valor de probabilidad p para el test de H-W, Coeficiente de endogamia (FIS) según la varianza de la identidad alélica, se detalla la variabilidad intra e inter individual: 1-Qintra y 1-Qinter.

Población	Arerunguá	Bahía Blanca
N	38	15
P	HS	0,0060
1-Qintra	0.7586	0.7544
1-Qinter	0.8772	0.8328
FIS	0.1352	0.0942

El grado de sub-estructuración entre estas poblaciones es muy moderado, ya que el valor de FST es próximo a 0,04 y la endogamia global FIT es de 0,21 ($p \leq 0,05$).

El número de migrantes para un tamaño medio de muestra (por población) de 20 individuos, con una frecuencia media de alelos privados de 0,05 es de 2,57 migrantes por generación.

3.7.6 Estructura poblacional de la loica pampeana

Para analizar el número de clústers posibles entre ambas poblaciones se realizó el análisis en el STRUCTURE. Se incluyeron todos los genotipos para ambas poblaciones (Fig. 11).

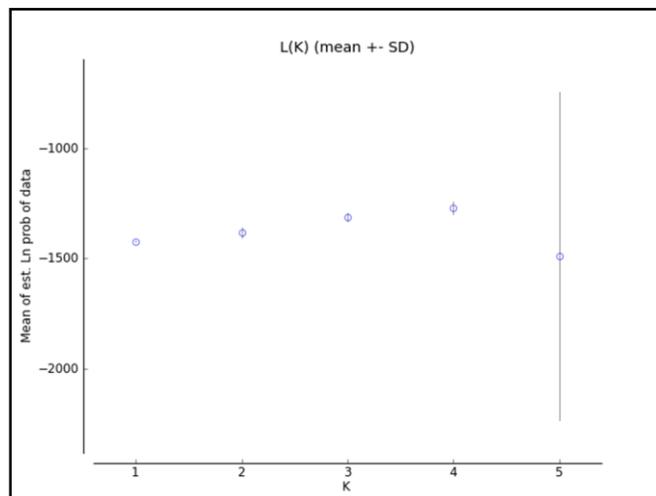


Figura 11. Gráfica que representa los valores medios del LnP (D) y el desvío estándar (S/D) obtenido para 10 réplicas con distintos modelos de clústers (k=1 al 5) obtenidos mediante el programa STRUCTURE, cuyo resultado se analizó en STRUCTURE Harvester, para construcción del gráfico.

El método Bayesiano para el análisis de estructuración indica que el número de clústers que presentaba el mayor valor medio para el Ln de Máxima Verosimilitud y menor desvío estándar fue k=4 (Fig 12). Además, los valores de ΔK apoyan la existencia de 4 clústers reales

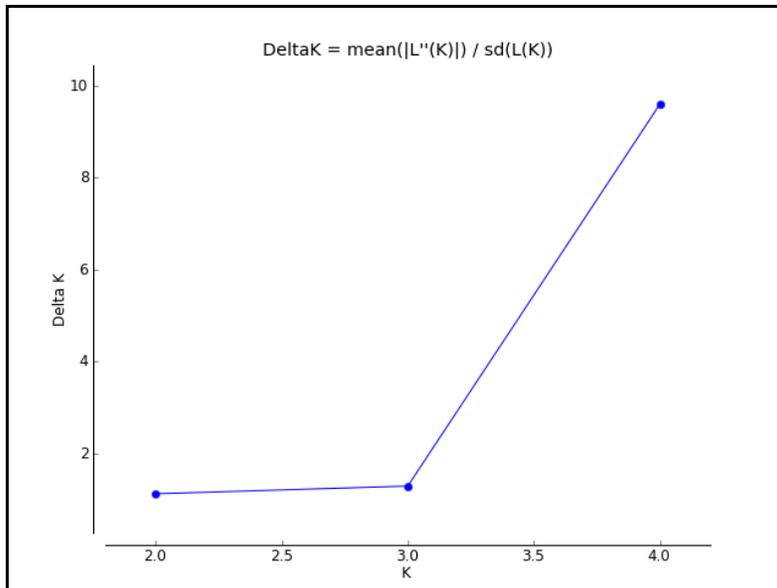


Figura 12. Gráfica de la magnitud de ΔK (tasa de cambio del $\ln P(X/K)$) en función de K clústers en las muestras analizadas.

La estructura poblacional puede reflejar desequilibrio de ligamiento entre loci y además desvíos del equilibrio de H-W, para esto se analizó la posible existencia de subdivisión poblacional con el software STRUCTURE.

Esta estructuración define 4 grupos, donde los individuos muestreados en Arerunguá se agrupan en 3 clúster: azul, rojo y verde, siendo este último el predominante. Los individuos de Bahía Blanca agrupan en dos clúster: rojo y amarillo, este último no se encuentra representado por ningún individuo con una probabilidad mayor al 50% en la población de Arerunguá (Fig 13).

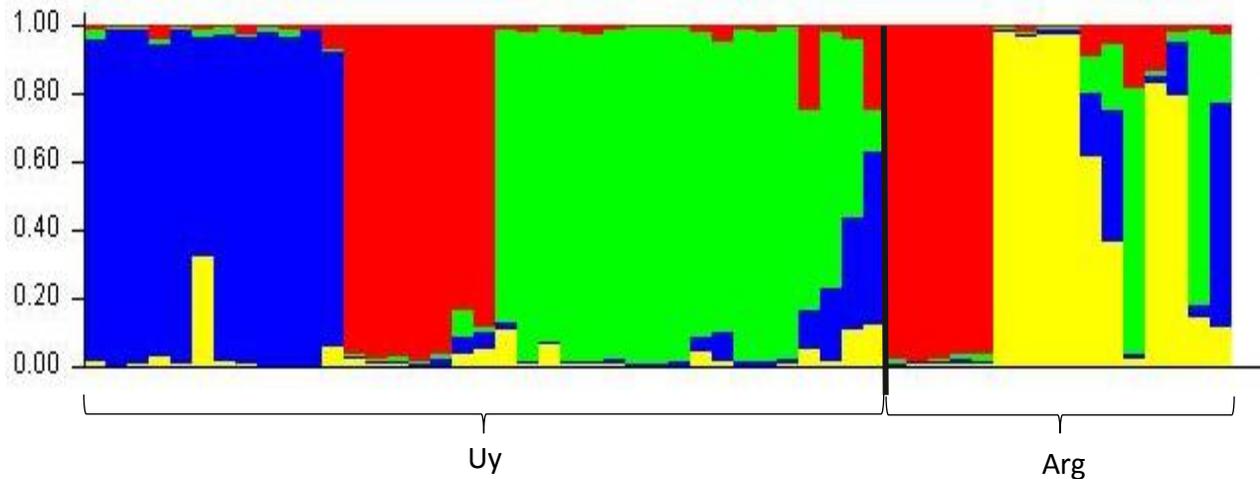


Figura 13. Gráfico de simulación en Structure que muestra el patrón de la probabilidad de pertenecer a cada uno de los clúster detectados con este programa. $k=4$ (1=rojo, 2=verde, 3=azul y 4=amarillo). Cada barra representan las probabilidades de cada individuo de pertenecer al clúster rojo, verde, azul o amarillo. En el eje de las X se puede identificar con corchetes las agrupaciones para los individuos de Uruguay y para los individuos de Argentina.

Además se puede observar que hay dos individuos con una probabilidad alta de pertenecer al clúster verde, que se encuentra en la población de Arerunguá.

Estructura genética e identificación de agrupamientos genéticos en Arerunguá:

Se volvió a analizar en Structure exclusivamente a los individuos de la población de Arerunguá para analizar su estructura poblacional y la posibilidad de encontrar grupos definidos de individuos dentro de la población.

El rango de K_s evaluado fue desde 1 hasta 5 clústers (Fig 14). El análisis de estructuración realizado indicó que el número de clúster que presentaba el mayor valor medio para el Ln de Máxima Verosimilitud y menor desvío estándar

fue $k=4$ (Fig 15).

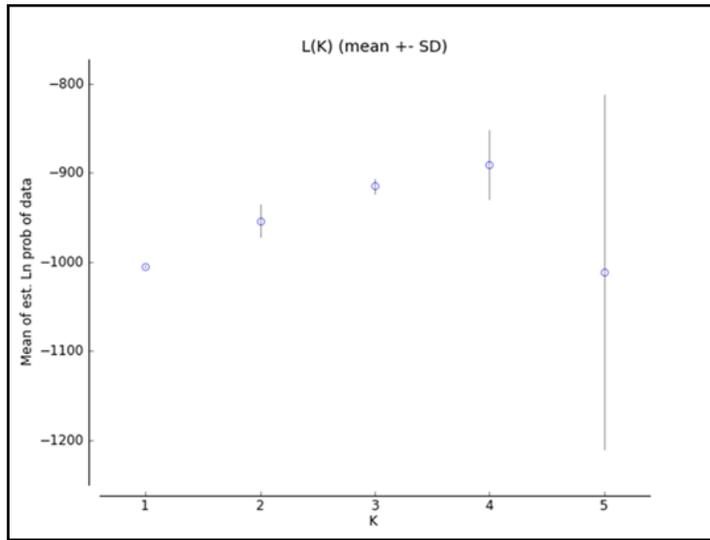


Figura 14. Gráfico que representa los valores medios del $L(K)$ (D) y el desvío estándar (S/D) obtenido para 10 réplicas con distintos modelos de clústeres ($k=1;2;3;4;5$) obtenidos mediante el programa STRUCTURE, cuyo resultado se analizó en STRUCTURE Harvester, para construcción del gráfico.

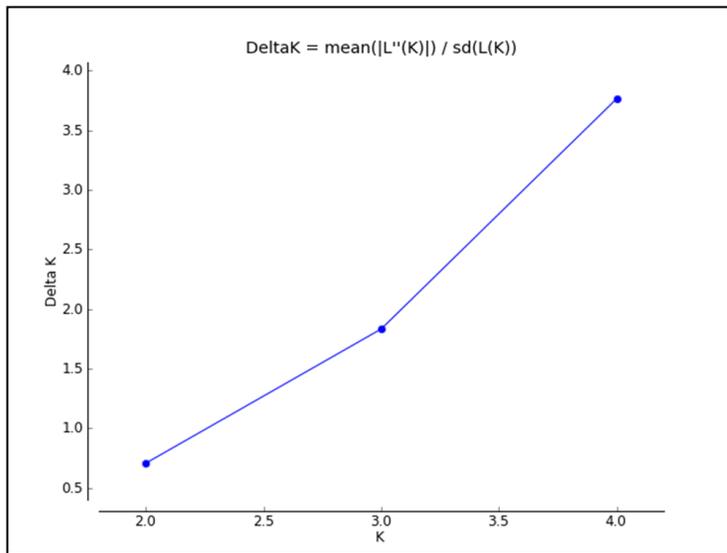


Figura 15. Gráfica de la magnitud de ΔK (tasa de cambio del $L(K)$) en función de K clústeres en las muestras analizadas.

En la figura 16 se grafica una simulación de los 4 clústers cada uno de ellos representados por un color (rojo, verde, azul y amarillo), donde cada barra representa la probabilidad de un individuo a pertenecer a ese grupo.

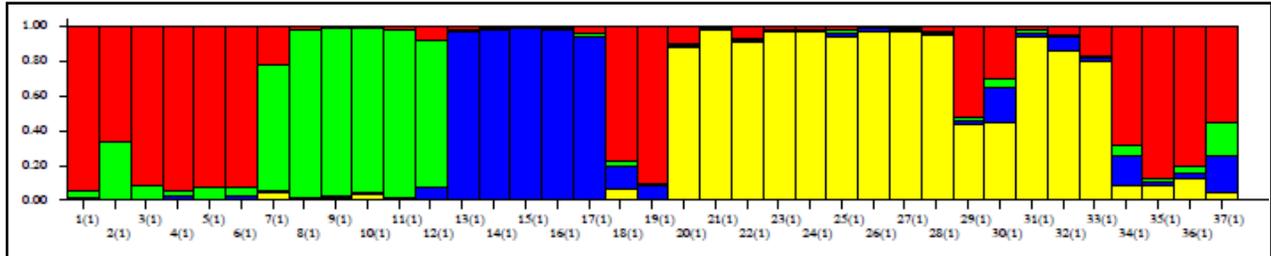


Figura 16. Gráfico de simulación en Structure que muestra el patrón de la probabilidad de pertenecer a cada uno de los clúster detectados con este programa. $k=4$ (rojo, verde, azul y amarillo). Para cada individuo se presenta una barra que grafica la probabilidad de este de pertenecer al clúster rojo, verde, azul o amarillo. Se numera en el eje de las X, los genotipos desde el 1 al 37 de los individuos pertenecientes a la población de Arerungá.

Los individuos SD1 al SD6, SD18 y SD19 y SD34 al SD37 comparten el clúster rojo. Estos individuos pertenecen a 6 nidos distintos, la mayoría de ellos localizados en el campo “El Silencio” y los últimos 4 individuos a dos nidos del campo “Casa Amarilla”.

Los individuos SD7 al SD12 comparten el clúster verde, pertenecen a 2 nidos distintos localizados en el campo “El Silencio”.

Los individuos SD13 al SD17 comparten el clúster azul, pertenecen a 2 nidos distintos localizados también en el campo “El Silencio”.

El clúster amarillo se conforma por el mayor número de individuos genotipados. Estos 14 individuos pertenecen a 8 nidos distintos, donde la mitad son del campo “El Silencio” y la otra mitad del campo “Casa Amarilla”. Dos individuos tienen casi un 50% de pertenecer al clúster rojo, conformado por individuos exclusivamente de “El Silencio”.

La población de Arerunguá presenta una probabilidad estadísticamente significativa de no encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,0000$). El cálculo de la endogamia (FIS) fue de 0,146 con valores de diversidad intra individual ("1-Qintra") de 0,7500 y entre individuos ("1-Quinter") de 0,8875.

El número efectivo poblacional se calculó para la población de Arerunguá tomando en cuenta solo los individuos muestreados en 2008 (23 muestras) siendo ese año donde se censaron más individuos y para no solapar generaciones. El valor calculado fue de **79 individuos** (teniendo en cuenta apareamientos al azar, y exclusión de alelos con una frecuencia $< 0,01$) con un intervalo de confianza de 95% (40 a 482 individuos).

Luego se calculó el tamaño efectivo poblacional del total de muestras procesadas para Arerunguá correspondientes a los censos 2008 a 2015 (36 muestras). El valor calculado fue muy similar, siendo de **73 individuos** (teniendo en cuenta apareamientos al azar, y exclusión de alelos con una frecuencia $< 0,01$) con un intervalo de confianza de 95% (43 a 187 individuos).

Estructura genética e identificación de agrupamientos genéticos en Bahía Blanca:

El rango de Ks evaluado fue desde 1 hasta 5 clústers (Fig 17).

El análisis de estructuración realizado indicó que el número de clúster que presentaba el mayor valor medio para el Ln de Máxima Verosimilitud y menor desvío estándar fue $k=1$ (Fig 18). Además, los valores de ΔK apoyan la existencia de 1 clúster real para la población de Bahía Blanca.

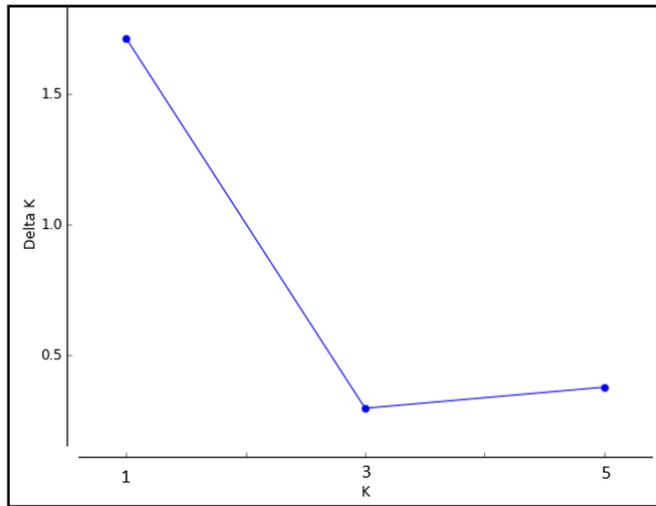


Figura 17. Gráfica que representa los valores medios del ΔK (D) y el desvío estándar (S/D) obtenido para 10 réplicas con distintos modelos de clústers ($k=1; 2; 3; 4; \text{ y } 5$) obtenidos mediante el programa STRUCTURE para la población de Bahía Blanca, cuyo resultado se analizó en STRUCTURE Harvester, para construcción del gráfico.

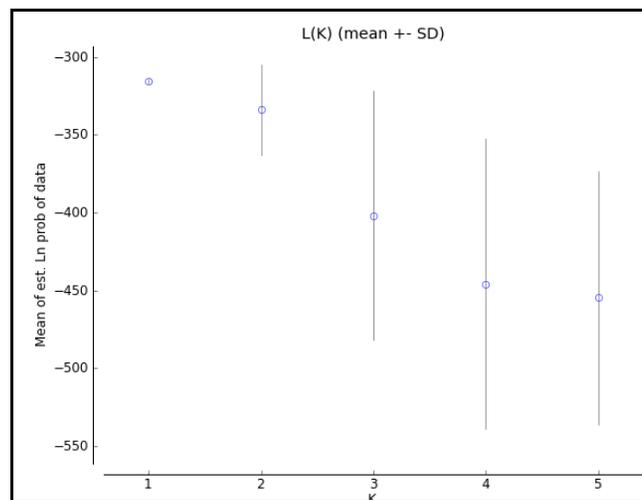


Figura 18. Gráfica de la magnitud de ΔK (tasa de cambio del $\ln P(X/K)$) en función de K clústers en las muestras analizadas.

La población de Bahía Blanca presenta una probabilidad estadísticamente significativa de no encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,0000$). El cálculo de la endogamia (FIS) fue de 0,161 con valores

de diversidad intra individual ("1-Qintra") de 0,688 y entre individuos ("1-Quinter") de 0,838.

El cálculo de número efectivo para la población de Bahía Blanca fue de valor negativo (teniendo en cuenta apareamientos al azar, y exclusión de alelos con una frecuencia $< 0,01$) con un intervalo de confianza de 95% (82 a ∞ individuos). Esto puede ser explicado por error de muestreo sin invocar a una posible deriva genética, por lo que la explicación biológica sería $N_e = \infty$ y en esta situación los datos no aportan evidencia si la población es "muy grande" (Laurie-Ahlberg & Weir 1979).

3.7.7 Análisis de cuello de botella.

Todos los análisis utilizando alelos infinitos y modelo de dos fases para ambas localidades muestreadas de loica pampeana, produjeron resultados significativos al nivel $\alpha = 0.05$ (Tabla 21). La población de Bahía Blanca presentó un valor no significativo para el modelo de IAM y en el test TPM con los parámetros (14-60). De todas formas, es posible concluir que de manera global no se observa en los análisis de microsatélites un exceso de heterocigosidad como el esperado bajo un proceso de cuello de botella reciente.

Tabla 21. *p*-valores de los análisis diseñados para identificar evidencia de cuellos de botella recientes para la especie en las localidades muestreadas. Los resultados significativos ($p < 0,05$) se destacan en CURSIVA. IAM: modelo de alelos infinitos, TPM: modelo de dos fases, SMM: modelo de un paso mutacional. Bajo los resultados de los análisis TPM, los valores entre paréntesis reflejan los parámetros utilizados. El primer valor refleja la varianza para TPM (saltos en el tamaño mutacional multi-estado de los alelos testeados), el segundo refleja el porcentaje de mutaciones que se adherieron a un estricto modelo mutacional paso a paso.

Región	IAM	TPM						SMM	
		(2-60)	(2-80)	(4-60)	(4-80)	(6-60)	(6-80)		(8-60)
Arerunguá	0.5591	0.4847	0,1016	0.32416	0.09669	0,6044	0.29240	0.57958	
Bahía Blanca	0,0257	0.43349	0.42751	0.15461	0,4117	0.14776	0.41858	0.15328	
Región		TPM						SMM	
		(8-80)	(10-60)	(10-80)	(12-60)	(12-80)	(14-60)		(14-80)
Arerunguá		0.58389	0,5404	0.60323	0.39126	0,5998	0.39579	0.60845	0,2109
Bahía Blanca		0.15965	0,0293	0.41211	0.14995	0.15175	0.02816	0.15965	0,4278

3.7.8 Composición genética de grupos

Para la matriz de individuos de la población de Arerunguá, con siete loci representados ($N = 37$), se obtuvo un grado importante de diversidad alélica (Tabla 22). Se realizó el análisis de parentesco entre individuos que compartían el mismo nido y se estudió el grado de parentesco de medios hermanos y de hermanos. Estos resultados, junto con el nivel de heterocigosidad esperada para el conjunto de loci (0,887) y el alto valor medio de PIC (0,859) así como la probabilidad significativa de no exclusión, indican que el set de microsatélites es informativo para este tipo de análisis, con suficiente poder para no caer en errores de tipo II (la probabilidad de que se dé un falso negativo). Se realizaron los cálculos de r solo para los individuos genotipados con 5 o más loci microsatélites.

Se estimó la media de parentesco (r) para las muestras colectadas en 2008 ($N= 23$), este primer grupo presentó un valor de $r=0,0997$ y un desvío estándar de 0,2323. Este grupo se compone por individuos pertenecientes a 6 nidos (29, 6, 20, 7, 11 y 28). El tipo de relaciones de parentesco (PO= padre-hijo, FS=hermanos totales, HS=medio hermanos, U=no relacionados) entre los individuos se presenta en las siguientes tablas. Solo se realizaron los cálculos en aquellos individuos con genotipados completos o al menos que presentaran 5 *loci microsatélites* con información alélica.

Tabla 22. Se detalla el coeficiente de parentesco r (bajo la diagonal) y las relaciones entre los individuos muestreados para algunos nidos (encima de la diagonal) del grupo de muestreo 2008; p= pichón.

Nido #29

Individuo	SD3 (♂)	SD4 (♀)	SD5 (p)
SD3 (♂)		U	PO
SD4 (♀)	0		PO
SD5 (p)	0,72	0,85	

Nido #6

Individuo	SD6 (♂)	SD8(p)
SD6 (♂)		HS
SD8(p)	0,35	

Nido #20

Individuo	SD10 (p)	SD11 (p)	SD12 (p)
SD10 (p)		FS	FS
SD11 (p)	0,5		FS
SD12 (p)	0,4	0,41	

Nido #11

Individuo	SD17 (p)	SD18 (p)	SD19 (p)
SD17 (p)		FS	FS
SD18 (p)	0,4		FS
SD19 (p)	0,61	0,4	

La media de parentesco (r) para las muestras colectadas en 2010 ($N= 7$), presentó un valor de $r=0,195$ y un desvío estándar de 0,35. Este grupo se compone por individuos pertenecientes a 2 nidos (#1005) (Tabla 23), nido #1021, y otro individuo volantón, de otro nido, tabla 23.

Tabla 23. Se detalla el coeficiente de parentesco r (bajo la diagonal) y las relaciones entre los individuos muestreados de uno de los nidos (encima de la diagonal) del grupo de muestreo 2010; p=pichón.

Nido
#1005

Individuo	SD34 (p)	SD35 (p)	SD36 (p)
SD34 (p)		FS	FS
SD35 (p)	0,51		FS
SD36 (p)	0,42	0,41	

En cuanto a la media de parentesco (r) para las muestras colectadas en 2011 ($N= 6$), este segundo grupo presentó un valor de $r=0,27$ y un desvío estándar de 0,38.

- **Nido N°29:** Los individuos SD3 y SD4 serían los parentales del pichón SD5. Los parentales no están relacionados entre sí. A su vez, el individuo SD3 (macho adulto) está relacionado con un individuo del nido N°6, hermanos (pichón SD8). SD3 también está relacionado con SD26 (hermanos) muestreado en 2011.
- **Nido N°6,** el adulto macho muestreado (SD6) está relacionado al pichón de este nido (SD8), como medios hermanos.
- **Nido N°20:** Los tres pichones en este nido son hermanos entre sí.
- **Nido N°11:** Los tres pichones en este nido son hermanos entre sí.

- **Nido N°1005:** Los tres pichones en este nido son hermanos entre sí.

Para las muestras colectadas en Uruguay (N= 37), la media de parentesco (r), presentó un valor de $r=0,087$ y un desvío estándar de 0,038. De acuerdo a los agrupamientos en Arerunguá según el STRUCTURE ($k=4$), y los cálculos de relacionamiento entre individuos con el MLRelate se encontró: para grupo Amarillo un $r=0,177$, grupo Rojo $r=0,123$, grupo Azul $r=0,28$ y grupo Verde $r=0,219$.

En cuanto a las muestras colectadas en Bahía Blanca (N= 16), se estimó la media de parentesco de $r=0,145$ y un desvío estándar de 0,276.

Tomando en cuenta todas las muestras colectadas en Uruguay y Argentina (N=53), la media de parentesco (r) presentó un valor de $r=0,086$ y un desvío estándar de 0,195.

La media de parentesco entre ejemplares machos fue de $r=0,2329$; y un desvío estándar de 0,36; no se contaba con un número de individuos identificados como hembras necesario para realizar el cálculo de parentesco entre hembras.

3.8 Discusión de análisis según los marcadores microsatélites

3.8.1 Caracterización de los *loci microsatélites* y variabilidad genética detectada

Se encontró que ambas poblaciones, tanto la de Arerungá como la de Bahía Blanca, presentaron un apartamiento del equilibrio de H-W, y en cuanto a los valores de endogamia (Fis) resultaron ser bajo/moderado. Los resultados mostraron que hay un leve exceso de homocigotas en la especie, dado los valores positivos pero muy cercanos a cero de Fis, lo que podría ser interpretado en dos sentidos, como consecuencia de: presencia de alelos nulos, selección neutra, efecto Wahlund o una posible endogamia (Hedrik 2011). En el caso de la primer hipótesis podríamos estar subestimando la heterocigosidad (He), debido a que su cálculo depende del número de alelos como de las frecuencias alélicas (Rosas-Osorio 2009). Si estamos detectando una posible endogamia, esto podría deberse a que los individuos de loica pampeana actualmente están compartiendo territorios muy acotadas para la reproducción y poca dispersión de sus individuos. Aparentemente algunas hembras, al menos, no se están dispersando. Esto se pudo constatar en una de las temporadas de relevamiento en Arerungá, donde se encontró a una pareja adulta con nido (ambos individuos anillados) que no se habían alejado del territorio que compartían en "El Silencio" (Azpiroz *comm per.*).

Uno de los marcadores microsatélites se encontraba fuera del equilibrio H-W en la población de Arerungá y dos en la población de Bahía Blanca. Algunas de las explicaciones de que esto esté ocurriendo es que los loci estén ligados a genes o regiones genómicas sometidas a selección o debido a que se trata de un número bajo de muestras analizadas, y quizás aumentando el N, estos loci pasen a encontrarse dentro del equilibrio H-W (Mannise 2009).

De manera general, se observa que la especie presenta valores aún adecuados de variabilidad genética ($H=0,74$). La población de Arerungá presentó valores de heterocigocidad apenas un poco superiores a la de Bahía Blanca. En otras poblaciones de aves de pastizal se han visto valores de variabilidad genética un poco menores. Tal es el caso del Yetapá de Collar (*Alectrurus riosa*), donde la pérdida de variabilidad genética se vio acentuada en esas poblaciones que han estado sufriendo un fuerte impacto de la fragmentación del hábitat y de los cambios ecosistémicos que impactaron sobre ellas ($H=0,69$ y $H=0,38$ para la población de Corrientes y Formosa respectivamente) (Di Giacomo *et al.* 2014). La reducción de la variabilidad genética se ha detectado en otras especies de aves que se encuentran atravesando procesos de reducción y fragmentación del hábitat, pero en muchos casos se ve acentuada, agravando las posibilidades de recuperar a la especie (Kvistad *et al.* 2015; García-Vigón *et al.* 2008).

Nuestros resultados demuestran que la loica pampeana aún retiene una sorprendente variabilidad genética, por lo que, efectuando acciones correctivas de manejo los productores agropecuarios, sería posible recuperar a la especie.

En cuanto a la endogamia total (Fit), ésta presentó un valor más elevado, posiblemente explicado por un aumento de apareamientos consanguíneos entre los individuos de la población total. Se encontró que la especie mantiene variabilidad genética, sin embargo se necesita indagar en los procesos demográficos que ha sufrido la especie que puedan explicar las causas de este apartamiento del equilibrio.

A pesar de la drástica reducción poblacional de la especie, no se encontró con estos marcadores nucleares, evidencia de un proceso de cuello de botella reciente para las poblaciones analizadas. Sin embargo, el apartamiento del equilibrio de H-W en la que se encuentran estas poblaciones podría estar relacionado a las fluctuaciones en el tamaño poblacional a lo largo del tiempo. Esto provoca una pérdida de señal genética de eventos tales como cuellos de botella o un efecto fundador (Pimm *et al.* 1989; Cornuet & Luikart 1996; McEachern *et al.* 2010). Quizás en unas cuantas generaciones más será posible la detección de un evento de este tipo, sobre todo cuando la reducción ha sido tan reciente. Por ejemplo, un estudio sobre la fragmentación en el bosque seco del Cerrado, y su asociación con la estructura genética poblacional de *Pyrrhura pfrimeri* (cotorra de Pfrimer) sugieren un retraso de 35 años entre la deforestación y sus efectos en la estructura y dinámica poblacional de esta especie (Miller *et al.* 2013). En otro ejemplo, el carpintero de cresta roja (*Picoides borealis*) era una especie abundante en Norteamérica y en aproximadamente 200 años las poblaciones que comenzaron a fragmentarse hoy evidencian gran diferenciación genética entre poblaciones (Stangel *et al.* 1992).

3.8.2 Análisis de sub-estructuración poblacional

Los 7 microsatélites analizados demostraron tener alto contenido de información polimórfica (PIC) y obtuvimos valores adecuados de probabilidad de no exclusión. Esto significa que pueden ser utilizados para análisis de sub-estructuración poblacional, así como para la identificación individual y la asignación de parentesco.

El análisis Bayesiano realizado con el software STRUCTURE muestra la existencia de estructura genética, donde el número más probable de clústers fue 4, dos de ellos exclusivos de la población de Arerunguá (Fig. 13, azul y verde), otro compartido por individuos de Arerunguá y de Bahía Blanca (rojo), y uno exclusivo de la población de Bahía Blanca (amarillo).

Para los análisis en STRUCTURE, se escogió como escenario el muestreo mixto, ya que este combina muestras obtenidas a partir de colectas ocasionales y esfuerzos de muestreo en proyectos puntuales de investigación, tal es el caso de las muestras analizadas de loica pampeana. Schwartz & McKelvey (2009) analizaron como distintos tipos de muestreo pueden llegar a influir en la correcta identificación de sub-estructuración genética.

Se evaluó la media de parentesco entre los individuos muestreados en los años: 2008, 2010 y 2011. Se encontró que en el 2008 los individuos presentaron un menor valor de relacionamiento/parentesco ($r=0,0997$) entre los individuos con respecto a los muestreos del 2010 ($r=0,195$) y 2011 ($0,27$) respectivamente. Lo que está indicando que año a año los grupos se encuentran más emparentados entre sí.

Las agrupaciones para la población de Arerunguá se dan mayoritariamente en el campo "El Silencio". Es posible que estas 4 agrupaciones, estén reflejando un comportamiento reproductivo ancestral. Muchas especies altamente móviles exhiben una fuerte estructura poblacional como resultado de la filopatría natal, y se espera una mayor estructura de la población en el sexo más filopátrico o menos disperso (Fitz Simmons *et al.* 1997; Harrisson *et al.* 2013).

En la loica pampeana el macho es más territorial que la hembra en épocas de nidificación (Tubaro & Gabelli 1999). A pesar de esta asimetría en el comportamiento de machos y hembras es importante destacar que actualmente esto no estaría ocurriendo como cuando la población global de la especie era mayor.

Se ha constatado en época de nidificación que ambos sexos se mantienen asociados al territorio. Acostumbran a realizar tanto machos como hembras "excursiones" o desplazamientos cortos fuera del territorio principal fundamentalmente con fines de búsqueda de alimento (Azpiroz *comm per.*). Es posible que esta sub-estructuración que se evidencia, corresponda a la filopatría natal ancestral que dejó una huella genética en la especie.

Los valores de media de parentesco entre machos tuvo un valor de $r=0,2329$. No fue posible calcular dicho valor para las hembras por no tener identificadas un número suficientemente representativo de éstas, se comparó ese valor con el valor de r que presentó la población de la especie en general ($r=0,0865$). El nivel medio de relacionamiento entre los machos es claramente superior, lo que condice con el comportamiento filopátrico de este sexo. Esta información genética se correlacionaron con las observaciones de campo, donde se encontró que los grupos están conformados por individuos con cantos similares (Azpiroz *comm per.*).

La sub-estructuración detectada en Arerungá con un $k=4$ corresponde a las agrupaciones de individuos más relacionados entre sí dentro de cada grupo que entre grupos. Es posible que con una población tan pequeña y el poco hábitat disponible con el que cuenta la especie actualmente, algunas de las características biológicas se vean alteradas, tales como el comportamiento

migratorio. Se ha sugerido que la loica pampeana es una especie migratoria, al menos parcialmente (Aplin 1894; Jaramillo & Burke 1999), sin embargo hoy, las poblaciones en Arerunguá parecen ser residentes (Azpiroz *comm per.*) y las elecciones de territorios de anidación se ven cada vez más acotados y restringidos debido a la alteración del campo natural. Esto podría estar incidiendo en el aumento de las chances de que se produzcan cruzamientos consanguíneos.

Este tipo de comportamiento también se ha visto en otras especies de pastizales tal como *Alectrurus risora* (yetapá de collar) donde la transformación de las pasturas naturales que eran parte del territorio de distribución de la especie ha llevado a esta a cambiar de un comportamiento migratorio a residente desde hace aproximadamente 50 años (Di Giacomo & Di Giacomo 2004). En consecuencia, los individuos de las poblaciones estudiadas pueden ser asignados con mayor probabilidad a las áreas reproductivas ancestrales y tendrían que pasar más generaciones para causar la homogeneización genética de las mismas.

Para comprender mejor cómo la fragmentación del hábitat y los cambios recientes en el comportamiento migratorio en esta especie están influyendo en determinar el patrón genético observado dentro y entre las poblaciones, se deberían incluir muestras de museo con buena preservación. Luego mediante cebadores diseñados específicamente para este tipo de muestras con degradación (amplificación de fragmentos de pequeño tamaño) poder realizar estudios genéticos.

En cuanto a la población de Bahía Blanca esta presentó un $k=1$ como más probable. Esta población mostró niveles de consanguinidad menor que la de Arerunguá.

Además no se encontró evidencia de un cuello de botella reciente. Sin embargo, se detectó un apartamiento del equilibrio de H-W, posiblemente a causa de las fluctuaciones en los tamaños poblacionales que ha venido sufriendo la especie en las últimas décadas.

La sub-estructuración poblacional que presenta no es tan acentuada como en Arerunguá, el hecho de que el agrupamiento más probable sea 1 comparando con Arerunguá podría estar sugiriendo que no existe tanta preferencia por sitios puntuales para anidamiento y reproducción como si parecen tener los individuos de la población de Arerunguá. De este modo también se explica que los niveles de consanguinidad en esta población sean bastante más bajos que en la población de Arerunguá.

En cuanto al cálculo del tamaño efectivo para la población de Bahía Blanca el valor estimado fue infinito. Por los datos recabados en los últimos censos sobre esta población (Tubaro & Gabelli 1999; Meriggi *et al*, 2013, 2014), los cuales indican una gran reducción poblacional, consideramos que el valor calculado no pudo ser bien determinado mediante el programa LDNE. Además, esta población tampoco se encuentra bajo equilibrio de H-W, por lo que tamaños poblacionales fluctuantes en el pasado reciente también están actuando sobre el equilibrio de las mismas.

Consideramos que es necesario aumentar el número de individuos genotipados para poder estimar un valor N_e más acertado.

Por otro lado, el cálculo de migrantes por generación fue de 2,57 lo cual se considera por encima del umbral crítico ($N_m=1$) a partir del cual las subpoblaciones no divergirán genéticamente a causa de la deriva génica

(Wang, 2002). En conservación, un migrante por generación es considerado un nivel adecuado de flujo génico y cierto nivel de conectividad entre poblaciones es esencial para mantener la variabilidad genética, adaptación local y prevenir la endogamia (Wang 2002; Beebee & Rowe, 2008).

Estos valores evidencian entonces que en el pasado reciente ambas poblaciones hoy distanciada por aproximadamente 1000km mantenían un flujo poblacional por encima del umbral crítico, lo cual es coherente con la poca diferenciación genética que existe entre ambas poblaciones.

3.9 Análisis genético mediante marcadores con distinta tasa de evolución

El análisis poblacional global teniendo en cuenta el marcador mitocondrial (tasa de evolución estimada para *ND2* de 0,029 mutaciones/sitio/MY) y marcadores nucleares hipervariables (tasa mutacional aproximada 10^{-2} a 10^{-6} eventos por locus por generación), posibilitan que se encuentren múltiples sustituciones nucleofídicas y alelos por locus en cada sistema. Este alto nivel de polimorfismo de ambos permite que puedan ser empleados para realizar inferencias acerca de eventos genéticos poblacionales recientes.

Ambos marcadores determinaron un bajo nivel de estructuración poblacional para la especie (ADNmt $F_{st}=0,1211$ vs *loci microsatélites* $F_{st}=0,04$). El análisis de secuencias de ADNmt, mostró una diferenciación significativa mayor a la encontrada por los *loci microsatélites*.

Los análisis de procesos demográficos ocurridos sobre las poblaciones de la especie indican una expansión poblacional de la misma, y no apoyan la hipótesis de que hayan atravesado un cuello de botella a pesar de la drástica reducción poblacional de la especie.

Los valores de variabilidad genética que presenta aún la especie son altos, pero si la reducción del tamaño poblacional se mantiene en pocas generaciones se podrían evidenciar la pérdida de heterocigosis por la acción de la endogamia (Miller *et al.* 2013).

3.10 Implicancias para la conservación de la loica pampeana

La loica pampeana ha ocupado extensos territorios de la pampa en el pasado, generando una gran abundancia y distribución, que se refleja hoy en día, en la variación genética presente en las limitadas y reducidas poblaciones que aún conserva la especie. En el Uruguay se han logrado importantes avances en el conocimiento de la biología de la especie, confirmándose que la loica pampeana se reproduce en Uruguay. Se estimó el número de la población reproductora, y se creó consciencia pública en la zona de Arerunguá sobre la especie. La confirmación de la reproducción de esta especie en el Uruguay es especialmente importante desde el punto de vista de la conservación, ya que solamente se ha confirmado que la misma se reproduce en Arerunguá y Tacuarembó; mientras que en Argentina solamente en Bahía Blanca (y áreas aledañas de La Pampa) (Azpiroz 2005).

Muchas poblaciones de aves de pastizal exclusivas del bioma de la "pampa" tanto en Uruguay como Argentina están bajo amenaza o en riesgo de extinción debido a la drástica reducción de su hábitat por la ganadería

extensiva y producción agrícola. Las poblaciones que son distintas genéticamente podrían requerir un manejo individual (Moritz 1994). La ausencia de una fuerte estructuración genética que presentan las poblaciones de Bahía Blanca y Arerunguá, nos permite definir una única Unidad Evolutiva Significativa (ESU).

De acuerdo con la definición de Moritz (Moritz 1994) las poblaciones que no presentan una separación filogenética completa, conectadas por un flujo genético bajo y por lo tanto demográficamente tienen cierta independencia y diferencias genéticas únicas (ejemplo: haplotipos únicos que presenta cada población), son importantes para mantener la variabilidad genética total de la especie. Por ello se definen 2 unidades de manejo (UM) para la especie: las UM a diferencia de las ESU, generalmente no muestran una evolución independiente a largo plazo ni fuerte diferenciación adaptativa. En este caso, ambas poblaciones de loica pampeana son importantes para la conservar en el tiempo toda una ESU. La conservación de más de una población es muchas veces fundamental para asegurar la persistencia a largo plazo de la especie.

El área de Arerunguá representa una zona de prioridad para la conservación de la biota tanto de aves, como de especies emblemáticas (tal es el caso de una de las dos poblaciones de venado de campo, *Ozotoceros bezoarticus arerunguaensis*, remanentes en el Uruguay). La loica pampeana es de especial interés debido a que existen muy pocas poblaciones de reducido número registradas y además se considera una especie indicadora de la calidad de los pastizales, contribuyendo a la salud del ecosistema (controladores de plagas, diseminadores de semillas, entre otras).

Afortunadamente, la conciliación entre la producción y la conservación de la biodiversidad mediante la identificación y puesta en marcha de prácticas

productivas amigables con la conservación ("wildlife-friendly practices") se ha ido llevando a cabo en Uruguay. Particularmente para la población de Arerunguá, se implementaron planes de manejo mediante el Proyecto de Producción Responsable (MGAP_GEF). En el mismo, los productores locales y profesionales (biólogos, agrónomos, antropólogos sociales, etc.) desarrollaron buenas prácticas ganaderas que permitieron compartir las pasturas entre ganadería y las especies amenazadas; lamentablemente hoy dicho proyecto se encuentra suspendido (González & Sans 2009). En Argentina han realizado un proyecto con objetivos similares, tales como el GEF Founder Project, elaborando guías de conocimiento y manejo para los agricultores. También en Brasil, se realizaron al menos siete programas centrados en el desarrollo sostenible de la ganadería en pastizales naturales (Velez *et al.*, 2009).

Debido a la transformación de las pasturas naturales por los efectos de la actividad agropecuaria, se recomienda apuntar como primera acción a la protección del hábitat, específicamente de estos sitios de reproducción que tiene la especie.

A partir del estudio realizado por Azpiroz & Blake (2016), sobre la asociación de las aves de pastizal con la estructura de la vegetación, los autores plantean que las poblaciones de aves que habitan pastizales de las pampas se beneficiarían de estrategias de política centradas en la preservación de pastizales nativos, pero también de directrices de manejo para sitios de agricultura. Para los pastizales convertidos a la agricultura, se necesitan estudios adicionales para comprender mejor el uso de los recursos de pastizales.

Un tipo de acción sería generar planes de manejo que incluyan las siguientes pautas: un pastoreo rotativo en los potreros, dejando áreas de

pasturas naturales que aseguren un sitio reproductivo adecuado para la loica pampeana y que sea lo suficientemente atractivo en pasturas para retener individuos que se encuentren en dispersión y en búsqueda de nuevos sitios para reproducción y nidificación. Mantener los campos con cargas ganaderas que no superen la unidad ganadera (0,7) (González & Sans 2009).

Se considera además que la información de los individuos anillados es de gran ayuda para contabilizar a las aves en los territorios de nidificación año a año, contribuyendo a determinar el número de individuos reproductores necesarios para mantener una población saludable y viable.

Tomando en cuenta que el aumento de la población y la dispersión de los juveniles podrían permitir el establecimiento de nuevas poblaciones reproductivas, e incluso poder ser fundadas de otras poblaciones, es que se considera necesario alentar a la conservación de otras áreas de pastizales naturales mediante un trabajo conjunto entre investigadores, conservacionistas y productores rurales con un apoyo gubernamental. La buena comunicación entre ellos es fundamental para la toma de decisiones sobre prácticas agrícolas, promover la aplicación de la ley, y gestionar la vida silvestre en agroecosistemas (Johnson *et al.* 2011).

Es muy importante para poder desarrollar áreas protegidas en establecimientos privados proponer medidas tales como exoneración de impuestos, incentivos fiscales entre otros, que logren estimular la acción de conservación en áreas privadas (González & Sans 2009; Azpiroz *et al.* 2012a). Las reservas privadas juegan un rol muy importante en la conservación de aves amenazadas de pastizales. Tal es el caso de la Reserva El Bagual en Formosa (Provincia, Argentina), tan solo como un ejemplo, la cual tiene poblaciones reproductoras de varias especies amenazadas a nivel mundial. Estas aves se

han estudiado y monitoreado desde la 1990s a través de un acuerdo entre los propietarios y la ONG Aves Argentinas (Di Giacomo 2005).

De manera global, los planes de manejo que se realicen sobre la población de loica pampeana (como “especie paraguas”), podrían influir colateralmente y de forma positiva al estado de conservación de otras especies de aves amenazadas tal como la cachirla dorada (*Anthus nattereri*), chorlo cabezón (*Oreopholus ruficollis*), playerito canela (*Tryngites subruficollis*), viudita chocolate (*Neoxolmis rufiventris*).

3.11 Conclusiones y perspectivas generales

- Sorprendentemente, ambos marcadores moleculares han demostrado que la especie retiene altos niveles de variabilidad genética, con niveles de diversidad genética y haplotípicas superiores a lo esperado.
- El set de microsatélites seleccionado para la loica pampeana puede ser utilizado para la identificación individual y la asignación de parentesco con un alto nivel de confianza.
- Ambos marcadores moleculares desestiman una estructuración genética poblacional. Aspectos genéticos, ecológicos y aislamiento de las poblaciones sugieren: DOS UNIDADES DE MANEJO a corto plazo, para asegurar la continuidad de la especie.
- Se recabaron datos genéticos inéditos para la especie, siendo auspicioso que aún se está a tiempo de recuperar a la especie si se aplican planes de manejo inmediatos con los productores de los establecimientos rurales. La efectividad de las medidas aplicadas podrá ser controlada mediante estudios de campo y de genética.

Demostrada la eficiencia de ambos marcadores sobre esta especie, se recomienda continuar con un monitoreo genético de la población de Arerunguá, para proveer información de la demografía y el *fitness* genético de la especie. También se considera necesario realizar estudios genéticos sobre individuos de loica pampeana en colecciones de museo, para poder cuantificar la historia demográfica de la especie y poder comparar con el status actual que tiene la misma. El tipo de muestra a tomar puede ser de dedo de platilla del pie para no dañar los ejemplares. El ADN extraído a partir de este tipo de muestras suelen presentar una degradación significativa, por ello se recomienda como técnica de caracterización genética el empleo de SNPs (cambios de un solo nucleótido) por sobre técnicas tales como loci microsatélites y fragmentos de ADN mayores a 100pb.

Se propone además realizar un mayor esfuerzo de muestreo en población de Bahía Blanca. Además, incluir muestreo de las poblaciones de Tacuarembó y Flores (Uruguay) y de Corrientes, La Pampa y San Luis (Argentina). De manera de estudiar el estado de conservación genético de estas poblaciones.

Mediante las muestras de ADN obtenidas también se podrían realizar análisis de sexado de los individuos muestreados en Arerunguá (pichones, cáscaras de huevo), de modo de analizar proporción de sexos, análisis de filopatría y dispersión, entre otros.

Los precedentes generados con este proyecto en base a la loica pampeana y el poder de estos marcadores moleculares para determinar la variabilidad y estructuración genética de la especie podrían ser replicados en otras aves de pastizal amenazadas.

4 BIBLIOGRAFÍA

Andrews, T.D. & Easteal, S. (2000). Evolutionary rate acceleration of cytochrome c oxidase subunit I in simian primates. *J. Mol. Evol.*50:562-568

Aplin, O.V. (1894). On the birds of Uruguay. With an introduction and notes by P. L. Sclater. *Ibis*. 6(6):149–215.

Aris-Brosou, S. & Excoffier L. (1996). The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol Biol Evol.* 13(3):494-504.

Arballo, E. & Cravino, J. (1999). Aves del Uruguay. Manual ornitológico Vol. 1. Montevideo, Uruguay: Editorial Hemisferio Sur.

Avise, J. (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conserv. Biol.*, 9: 686-690.

Avise, J.C. & Walker, D. (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* (265):457-463.

Azpiroz, A. B. (1997). Áreas de importancia para aves en Uruguay. In: BirdLife International (ed.) Memorias del Taller sobre Áreas de Importancia para Aves en las Américas. Cayambe, Ecuador: BirdLife International.

Azpiroz, A. B. (2000). Biología y conservación del Dragón (*Xanthopsar flavus*, Icteridae) en la Reserva de Biosfera Banados del Este. PROBIDES, Rocha, Uruguay.

Azpiroz, A. B. (2003). Aves del Uruguay. Lista e introducción a su biología y conservación. Aves Uruguay, Montevideo.

Azpiroz, A. B. (2005). Conservation of Pampas Meadowlark (*Sturnella defilippii*) in Uruguay. Cotinga. 23: 71-73.

Azpiroz, A. B. & Blake, J. G. (2009). Avian assemblages in altered and natural grasslands in the Northern Campos of Uruguay. Condor. 111: 21-35.

Azpiroz, A. (2012). Aves de las Pampas y Campos de Argentina, Brasil y Uruguay. Una guía de identificación. PRESSUR, Nueva Helvecia, Uruguay. 350pp.

Azpiroz, A.B, Isacch, J.P, Dias, R.A., Di Giacomo, A.S, Suertegaray Fontana, C. & Morales Palarea, C. (2012a). Ecology and conservation of grassland birds in southeastern South America: a review. J. Field Ornithol. 83(3):217–246

Azpiroz, A., Alfaro, M. & Giménez, S. (2012b). Lista roja de las aves del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la avifauna nacional con base en los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. 82pp.

Azpiroz, A. (2015). Shiny Cowbird (*Molothrus bonariensis*) Parasitism Records for Three Globally Threatened Species from the South American Pampas. The Wil. Jour. of Ornithol. 127(4):746-752.

Azpiroz, A.B. & Blake J. G. (2016). Associations of grassland birds with vegetation structure in the Northern Campos of Uruguay. *The Condor: Ornithological Applications*. 118:12–23.

Azpiroz, A.B., Cozzani N. En prep. (2017). Loica pampeana (*Sturnella defilippii*). En: Libro Rojo de las Aves de Uruguay. Vol. 1. Especies Extintas, En Peligro Crítico y En Peligro (A.B. Azpiroz, S. Jiménez & M. Alfaro, Eds.). UICN/DINAMA/DINARA, Montevideo.

Balloux, F., Goudet, J., Perrin N. (1998). Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crocidura russula*. *Evol.* 52: 1230–1235.

Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. and Evol.* 16(1): 37–48.

Barker, F.K., Burns K.J., Klicka, J., Lanyon, S.M. & Lovette I.J. (2015). New insights into New World biogeography: an integrated view from the phylogeny of blackbirds, cardinals, sparrows, tanagers, warblers, and allies. *The Auk Ornithol. Adv.* (132): 333-348.

Barton, N.H. & Slatkin, M. (1986). A Quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*. 56:409-15

Beebee, T., & Rowe, G. (2008). Conservation genetics, in *An Introduction to Molecular Ecology Second Edition*. Oxford University Press.

Beck, N.R., Double, M.C. & Cockburn, A. (2003). Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Mol. Biol. & Evol.* 20: 54–61.

Bencke, E. G. A., Fontana, C. S., Dias, R. A., Maurício, G. N. & Mahler-JR, J. K. F. (2003). Aves. In: Fontana, C. S., Bencke, G. A. & Reis, R. E. eds. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Edipucrs. p.189-479.

Beheregaray, L. B. & Sunnucks, P. (2001). Fine-scale structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Mol. Ecol.*, 10: 2849-2866.

BirdLife International (2017). Species factsheet: *Leistes defilippii*. Disponible en <http://www.birdlife.org> (consultado el 07/11/2017).

Brohede, J., Moller, A.P., & Ellegren, H. (2004). Individual variation in microsatellite mutation rate in Barn Swallows. *Mutat. Research*. 545: 73–80.

Brohede, J., Primmer, C.R.A., Moller & Ellegren H. (2002). Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Research*. 30:1997–2003.

Bourke, A. F. G., Green, H. A. A. & Bruford, M., (1997). Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analyzed with microsatellites. *Proc. R. Soc. Lond*. 264: 277-283.

Bucher E.H. & Nores M. (1988). Present status of birds in steppes and savannas on northern and central Argentina. Pp. 71-79 en: PD Goriup (ed) Ecology and conservation of grasslands birds. International Council for bird preservation, Cambridge.

Burmeister, H. (1861). Viaje a través de los estados de La Plata con especial Consideración al físico Personalidad y cultura antdisturbios la República Argentina. Realizado en los años 1857, 1858, 1859 y 1860 ... H.W. Schmidt, Hall, 2: i-iv + 1-538.

Caccone, A., Gentile, G., Burns, C.E, Sezzi, E., Bergman, W., Ruelle, M., Saltonstall, K. & Powell J.R. (2004). Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Mol. Phylogenet. and Evol.* 31: 794–798.

Chebez, J.C. & Tubaro, P. (2008). Loica pampeana. Pp 404-407 en: Chebez JC (ed) Los que se van. Fauna argentina amenazada. Tomo 2:, Albatros, Buenos Aires.

Claramunt, S. & Cuello, J. P. (2004). Diversidad de la Biota Uruguaya. Aves. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología (Segunda Serie)*, 10(6):1-76.

Clarke, A.L., Saether, B.E., Roskaff, E. (1997). Sex biases in avian dispersal: a reappraisal. *Oikos*. 79: 429–438.

Collar, N. J., Gonzaga, L. P., Krabbe, N., Madroño Nieto, A., Naranjo, L. G., Parker, T. A. & Wege, D. C. (1992). Threatened birds of the Americas: the
Cornuet, J.M. & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *GeneT.* 144:2001-2014.

Cosse, M. (2010). Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis* Pautas para su conservación (Tesis de Doctorado). Universidad de la República. Facultad de Ciencias.

Cozzani, N., Sánchez, R. & Zalba, S.M. (2004). Nidificación de la loica pampeana (*Sturnella defilippii*) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Hornero* 19(2): 47-52.

Dawson, D.A., Hannote, O., Greg, C., Stewart, I.R.K. & Burke, T. (2000). Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Mol. Ecol.* 9:1941–1944.

Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Stewart, I.R.K., Ball A.D., Durrant, K.L., Hansson, B., Bacon I., Bird, S., Klein, Á., Lee, J-W, Martín-Gálvez, D., Simeoni M., Smith, G., Spurgin, L.G. & Burke, T. (2010). New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high utility – as demonstrated for birds. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 475–494.

De la Colina, M. A. (2013). Estudio a nivel individual de las estrategias de parasitismo del tordo renegrado (*Molothrus bonariensis*) (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Di Giacomo, A.S. & Di Giacomo, A.G. (2004). Extinción, historia natural y conservación de las poblaciones del Yetapá de Collar (*Alectrurus risora*) en la Argentina. *Ornitol. Neotrop.* 115: 145 – 157.

Di Giacomo, A.S. (2005). Aves de la Reserva El Bagual. In: Historia natural y paisaje de la Reserva El Bagual, Provincia de Formosa, Argentina. Inventario de la fauna de vertebrados y de la flora vascular de un área protegida del Chaco

Humedo (A. G. Di Giacomo, AND S. F. Krapovickas, eds.), pp. 201–465. Aves Argentinas / Asociacion Ornitológica del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Di Giacomo, A., Di Giacomo, A., Kliger, R., Reboreda, J., Tiedemann, R., & Mahler, B. (2014). No evidence of genetic variation in microsatellite and mitochondrial DNA markers among remaining populations of the Strange-tailed Tyrant *Alecturus risora*, an endangered grassland species. *Bird Conserv. Intern.* 25(2): 127-138.

Dobson, F.S. (1982). Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Anim. Behav.* 30: 1183–1192.

Dolman G. & Joseph E. (2016). Multi-locus sequence data illuminate demographic drivers of Pleistocene speciation in semi-arid southern Australian birds (*Cinclosoma* spp.). *BMC Evol. Biol.* 16: 226

Drovetski, S.V., Zink, R.M. & Fadeev, I.V. (2004). Mitochondrial phylogeny of *Locustella*, related genera. *J. Avian Biol.* 5: 105–110.

Drovetski, S.V., Pearson, S.F. & Rohwer, S. (2005). Streaked horned lark *Eremophila alpestris strigata* has distinct mitochondrial DNA. *Conserv. Genet.* 6, 875–883.

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

Excoffier, L. (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 13: 853–864.

Excoffier, L. & Lischer H.E.L (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 39: 783-791.

Fernandez G.J., Posse, G., Ferretti V. & Gabelli F.M. (2004). Bird–habitat relationship for the declining Pampas meadowlark populations in the southern Pampas grasslands. *Biolog. Conserv.* 115: 139–148.

FitzSimmons, N.N., Limpus, C.J., Norman, J.A., Goldizen, A.R., Miller, J.D. & Moritz, C. (1997). Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of the United States of America.* 94: 8912–8917.

Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genet.* 133:693-709.

Fu, Y. X. (1996). New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genet.* 143: 557-570.

Gabelli, F.M., Fernández, G.J., Ferretti, V., Posse, G., Coconier, E., Gavieiro, H.J., et al. (2004). Range contraction in the pampas meadowlark *Sturnella defilippii* in the southern pampas grasslands of Argentina. *Oryx* 38: 164-170.

Galbusera, P., van Dongen, S. & Matthysen, E. (2000). Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conserv. Gen.* 1:163-168.

Galtier, N., Depaulis, F. & Barton, N. (2000). Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genet.* 155: 981-987.

García, J.T., Suárez F, Garza V, Calero-Riestra M, Hernández J. & Pérez-Tris J. (2008). Genetic and phenotypic variation among geographically isolated populations of the globally threatened Dupont's lark *Chersophilus duponti*. *Mol Phylogenet Evol.* 46(1): 237-51.

Garcia-Vigon, E., Cordero, P.J. & Veiga, J.P. (2008). Cross-Amplified Polymorphic Microsatellites for the Spotless Starling *Sturnus Unicolor*. *Ardeola* 55: 3-11.

Garza, J. C. & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol.* 10: 305-318.

Gochfeld, M. (1978). Social Facilitation of singing: group size and flight song rates in the pampas meadowlark *Sturnella defilippii*. *Short Communications, IBIS* 120: 338-339.

Gochfeld, M. (1979). Brood parasite and host coevolution: interactions between Shiny Cowbirds and two species of Meadowlarks. *American Naturalist.* 113:855-870.

González, S., Maldonado, J.E., Leonard, J.A., Vilà, C., Duarte, J.M.B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N. & Wayne, R.K. (1998). Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mol. Ecol.* 7: 47-56.

González, S. & Duarte, J.M.B. (2003b). Emergency Pampas deer capture in Uruguay. *Deer Specialist Group News* 18: 16-17.

González, S. & Sans, C. (2009). Diagnóstico del Área Prioritaria Arerunguá. Informe presentado al Proyecto de Manejo Integral de los Recursos Naturales y la Biodiversidad – Producción Responsable-Ministerio Ganadería Agricultura y Pesca pp. 272.

Greenwood, P.J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim. Behav.* 28: 1140–1162.

Groombridge, J.J., Jonest, C.G., Bruford, M.W. & Nichols, R.A. (2000). “Ghost” alleles of the Mauritius kestrel. *Nature*. 403: 616-617.

Haberle, S. & Bennett, K. (2004). Postglacial formation and dynamics of North Patagonian Rainforest in the Chonos Archipelago, Southern Chile. *Quatern. Scien. Reviews*. 23: 2433-2452.

Hajji, G.M.; Zachos, F.E., Charfi-Cheikrouha, F. & Hartl, G.B. (2007). Conservation genetics of the imperilled Barbary red deer (*Cervus elaphus barbarus*) in Tunisia. *Anim. Conserv.* 10: 229– 235

Harpending, H.C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66:591–600.

Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R. & Stoneking, M. (1993). Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthropol.* 34:483–496.

Harrison, K.A., Pavlova, A., Amos, J.N., Takeuchi, N., Lill, A., Radford, J.Q., et al. (2013). Disrupted fine-scale population processes in fragmented landscapes despite large-scale connectivity for a widespread and common cooperative breeder: the superb fairy-wren (*Malurus cyaneus*). *Jour. of Animal Ecol.* 82: 322–333.

Hartl D.L. & Clark A.G. (1997). *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts.

Herbers, J. M. & Mouse, R. L. (1998). Microsatellite DNA markers reveal details of social structure in forest ants. *Mol. Ecol.* 7: 299-306.

Hedrick, P.W. (2011). *Genetics of populations*. 4th ed. Boston (MA): Jones & Bartlett.

Heusser, L., Heusser, C. & Pias, N. (2006). Vegetation and climate dynamics of southern Chile during the past 50,000 years: results of ODP Site 1233 pollen analysis. *Quaternary Sci. Rev.* 25, 474-485.

Hoelzel, A. R., Halley, J., O'Brien, S. J., Campagna, C., Arnbom, T., Boeuf, B., Ralls, K. & Dover, G. A. (1993). Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity.* 84: 443-449.

Hudson, Q.J., Wilkins, R.J., Waas, J.R. & Hogg, I.D. (2000). Low genetic variability in small populations of New Zealand kokako, *Callaeas cinerea wilsoni*. *Biol. Conserv.* 96: 105-112.

Ibarguchi, G., Gissing, G.J., Gaston, A.J., Boang, P.T. & Friesen, V. L. (2004). Male-biased mutation rates and the overestimation of extrapair paternity: problem, solution, and illustration using Thick-billed Murres (*Uria lomvia*, Alcidae). *Journal of Hered.* 95: 209–216.

Ibrahim A. Arif, Haseeb A. Khan, Ali H. Bahkali, Ali A. Al Homaidan, Ahmad H. Al Farhan, Mohammad Al Sadoon & Mohammad Shobrak (2011). DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 18(3): 219-225.

Jaramillo, A. & Burke, P. (1999). *New World blackbirds*. Princeton, NJ: Princeton University Press. 117(1): 270-271.

Johnson, K. P. & Lanyon, S. M. (1999). Molecular systematic of the grackles and allies, and the effect of additional sequence (cyt b and ND2). *Auk.* 116:759-768.

Johnson, A.J., Lerner, H.R.L., Rasmussen, P.C. & Mindell, D.P. (2006). Systematics within *Gyps* vultures: a clade at risk. *BMC Evol. Biol.* 6: 65.

Johnson, N. K., & Cicero C. (2004). New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evol.* 58:1122-1130.

Johnson, R. J., Jedlicka, J. A. Quinn, J. E & Brandle, J. R. (2011). Global perspectives on birds in agricultural landscapes. In: *Issues in agroecology: present status and future prospectus, volume 1, Integrating agriculture, conservation and ecotourism: examples from the field* (W. B. Campbell and S. L. Ortíz, eds.): 55–140.

Khan, H.A., Arif, I.A., Bahkali, A.H., Al Farhan, A.H. & Al Homaidan, A.A. (2008). Bayesian, maximum parsimony and UPGMA models for inferring the phylogenies of antelopes using mitochondrial markers. *Evol. Bioinform.* 4: 263–270

Kalinowski, S.T., Wagner, A.P. & Taper, M.L. (2006). ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 576-579.

Keller, L.F., Jeffery, K.J., Arcese, P., Beaumont MA, Hochachka, W.M., Smith, J.N.M. & Bruford, M.W. (2001). Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: Introduction 16 evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences.* 268: 1387-1394.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Mol. Evol.* 16: 111-120.

Kishino, H. & Hasegawa, M. (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *Journ. of Mol. Evolut.* 29:170-179.

Klicka, J. and Zink, R.M. (1999). Pleistocene phylogeographic effects on avian evolution. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B (266):* 695-700.

Knight, M.E., Oppen M.J., Smith H.L., Rico C., Hewitt G.M. & Turner G.F. (1999). Evidence for male-biased dispersal in lake Malawi cichlids from microsatellites. *Mol. Ecol.* 8: 1521–1527.

Knutsen, H., Jorde, P. E., André, C. & Stenseth, N. C. (2003). Fine-scale geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Mol. Ecol.* 12: 385-394.

Kruskal, J. (1956). On the shortest spanning subtree of a graph and the travelling salesman problem. *Proc. of the Amer. Mathem. Society.* 71: 48-50.

Kvist, L., Martens, J., Ahola, A. & Orell, M. (2001). Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine, the willow tit (*Parus montanus*). *J. Evol. Biol.* 14: 930-941.

Kvistad, L., Ingwersen, D., Pavlova, A., Bull, J.K., & Sunnucks, P. (2015). Very Low Population Structure in a Highly Mobile and Wide-Ranging Endangered Bird Species. *PLoS ONE* 10(12).

Lacerda, D.R., Marini, M.A. & Santos, F.R. (2007). Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924) and the Sooretama (*T. ambiguus* Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: *Thamnophilidae*). *Braz. J. Biol.* 67(4, Suppl.): 873-882.

Laurie-Ahlberg, C.C. & Weir, B.S. (1979). Allozymic variation and linkage disequilibrium in some laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet.* 92:1295-1314.

Lerner, R.L., Meyer, M., James, H.F., Hofreiter, M. & Fleischer R.C. (2011). Multilocus Resolution of Phylogeny and Timescale in the Extant Adaptive Radiation of Hawaiian Honeycreepers. *Current Biol.* 21: 1838-1844.

Lessa, E.P., D'Elía G. & Pardiñas, U.F.J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Mol. Ecol.* 19:3031-3037.

Lettink, M., Jamieson, I.G., Millar, C.D., & Lambert, D. M. (2002). Mating system and genetic variation in the endangered New Zealand takahe. *Conserv. Gen.* 3: 427–434.

Librado, P.J.R. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics.* 25:1451-2.

López-Lanús, B., Grilli, P., Coconier, E., Di Giacomo, A. & Banchs, R. (2008). Categorización de las aves de la Argentina según su estado de conservación. Informe de Aves Argentinas / AOP y Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Buenos Aires, Argentina.

Lovette, I.J. (2008). Glacial cycles and the tempo of avian speciation. *TRENDS in Ecol. and Evolut.* 20(2):57:59

Luikart, G., Sherwin, W. B., Steele, B. M. & Allendorf, F. W. (1998). Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol. Ecol.* 7: 963-974.

Luikart, G. & England, P.R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecol. and Evol.* 14: 253-256.

Lynch, M. & Ritland, K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genet.* 152: 1753–1766.

MAYDS y AA (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable y Aves Argentina) (2017). Categorización de las Aves de la Argentina (2015). Informe del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación y de Aves Argentinas, edición electrónica. C. A. Buenos Aires, Argentina. 143 pp.

Mannise, N. (2013). Análisis de la estructura genética de poblaciones de aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*). Universidad de la República. Facultad de Ciencias

Marshall, H. D. & Baker, A.J. (1997). Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla spp.*) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Biol. Evol.* 14:173–184.

Marshall, T. C., Slate, L. E., Kruuk, L. E. B. & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.

Marshall, T. C. 1998-2007. Cervus 3.0 help. Field Genetics Ltd. Copyright Tristan Marshall.

McEachern, M., Van Vuren, D., Floyd, C., May, B. & Eadie, J. (2010). Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conservat. Genet.* 12: 285–296

McVean, G.A.T. (2002). A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. *Genet.* 162:987–991.

Meriggi, J. L., H. V. Ibáñez & J. A. Aguirre. (2013). Diagnóstico del estado poblacional y acciones para la conservación de la loica pampeana (*Sturnella*

defilippii) en las provincias de Buenos Aires y La Pampa. Informe técnico. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Buenos Aires.

Meriggi, J. L., H. V. Ibáñez & J. A. Aguirre. (2014). Monitoreo Poblacional de la loica pampeana (*Sturnella defilippii*) y Acciones para su Conservación. Temporada 2013. Informe técnico. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Buenos Aires.

Milá, B., Girman, D. J., Kimura, M. & Smith, T. B. (2000). Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. Proc. of the Royal Soc. Lond. B. 267:1033-1040

Miller, M.P., Bianchi, C.A., Mullins, T.D. & Haig, S.M. (2013). Associations between forest fragmentation patterns and genetic structure in Pfrimer's Parakeet (*Pyrrhura pfrimeri*), an endangered endemic to central Brazil's dry forests. Conserv. Genet. 14: 333 – 343.

Milligan, B.G. (2003). Maximum-likelihood estimation of relatedness. Genet. 163: 1153–1167.

Moritz, C. (1994). Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. Mol. Ecol. 3:401-411.

Mossman, C.A. & Waser, P.M. (1999). Genetic detection of sex-biased dispersal. Mol. Ecol. 8: 1063–1067.

Nabholz, B. et al. (2008). Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals – the longevity hypothesis. Mol. Biol. Evol. 25: 120–130

Nabholz, B., Lanfear, R. & Fuchs, J. (2016). Body mass-corrected molecular rate for bird mitochondrial DNA. *Mol Ecol.* 25(18):4438-49

Neff, B. D. & Gross, M. R. (2001). Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evol.* 55: 1717-1733.

Nei M. (1987). *Mol. Evolut. Genet.* New York: Columbia University Press (512 p.).

Neigel, J.E. (1997). A comparison of different alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Ann Rev Ecol Syst* 28: 105–128.

Nyström, V., Angerbjörn, A. & Dalén, L. (2006). Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos.* 114: 84-94.

Omland, K.E., Tarr, C.L., Boarman, W.I., Marzluff, J.M. & Fleisher, R.C. (2000). Cryptic genetic variation and paraphyly in ravens. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 2475-2482.

Ortega, J., Maldonado, J. E., Arita, H. T., Wilkinson, G. S. & Fleischer, R. C. (2002). Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes.* 2: 462-464.

Oliveras de Ita, A., Oyama, K., Smith, T. B., Wayne, R. K. & Milla, B. (2012). Genetic evidence for recent range fragmentation and severely restricted dispersal in the critically endangered Sierra Madre Sparrow, *Xenospiza baileyi*. *Conserv. Genet.* 13: 283 – 291.

Packer, C., Puse, A.E., Rowley, H., Gilbert, D.A., Martenson, J. & Obrien, S.J. (1991). Case Study of a Population Bottleneck - Lions of the Ngorongoro Crater. *Conserv. Biol.* 5: 219-230.

Paxton, R. J., Ayasse, M., Field, J. & Soro, A. (2002). Complex sociogenetic organization and reproductive skew in a primitively eusocial sweat bee, *lasioglossum malachurum*, as revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* 11: 2405-2416.

Powell, A.F., Barker F.K., Lanyon, S.M., Burns, K.J., Klicka, J. & Lovette I.J. (2013). A comprehensive species-level molecular phylogeny of the New World 4 blackbirds (*Icteridae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 71:94-112.

Prado, J.L. & Alberdi, M.T. (1999). The mammalian record and climatic change over the last 30,000 years in the Pampean Region, Argentina. *Quat. Internat.* 57/58: 165-174.

Prieto, A.R. (2000). Vegetational history of the Late glacial Holocene transition in the grassland of eastern Argentina. *Palaeogeog. Palaeoclimat. Palaeoecol.* 157: 167-188.

Pimm, S.L., Gittleman, J.L., McCracken, G.F. & Gilpi, M.E. (1989). Plausible alternatives to bottlenecks to explain reduced genetic diversity Trends. *Ecol. & Evol.* 4:176-8

Primmer, C. R., Moller, A. P. & Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of crossspecies microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.* 5: 365-378.

Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P. & Ellegren, H., (1997). A low frequency of microsatellite in the avian genome. *Gen. Research.* 7: 471-482.

Primmer. C. R., T. Borge., J. Lindell & G-P Saetre. (2002). Single nucleotide Polymorphism characterization in species with limited available sequence Information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol. Ecol.* 11: 603-612.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet.* 155: 945 – 959.

Prugnolle, F. & Meeus T. (2002). Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Hered.* 88: 161–165.

Queller, D. C. & Goodnight, K. F. (1989). Estimating relatedness using molecular markers. *Evolut.* 43: 258–275

Quattrocchio, M.E., Borrromei, A.M., Deschamps, C.M., Grill, S.C. & Zavala, C.A. (2008). Landscape evolution and climate changes in the Late Pleistocene-Holocene, southern Pampa (Argentina): Evidence from palynology, mammals and sedimentology. *Quarter. Internat.* 181: 123-138.

Rabassa, J. (2008). Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. En Rabassa, J. (ed.) *The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego, Developments in Quaternary Science.* 11: 151-204.

Rhymer, J.M., Fain, M.G., Austin, J.E., Johnson, D.H. & Krajewski, C. (2001). Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation

genetics of sandhill cranes (*Grus canadensis*; Aves: Gruidae). *Conserv. Genet.* 2: 203-218.

Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journ. of Hered.* 86: 248–249.

Riverón S. (2011). Estructura poblacional e historia demográfica del "pericote patagónico", *Phyllotis xanthopygus* (Rodentia: Sigmodontinae) en Patagonia Argentina (Tesis de Maestría). Universidad de la Republica. Uruguay.

Roques, S., Duchesne, P. & Bernatchez, L. (1999). Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (*genus Sebastes*) species complex as a case study. *Mol. Ecol.* 8: 1703-1717.

Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9 (3):552-569.

Rogers, A.R. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population expansion. *Evolut.* 49:608–615.

Rosas-Osorio, J. (2009). Variabilidad genética de *Quercus grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas). México: UNAM.

Rousset F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 103-6.

Rüber, L., Meyer, A., Sturmbauer, C. & Verheyen, E. (2001). Population structure in two sympatric species of the Lake Tanganyika cichlid tribe Eretmodini: evidence for introgression. *Mol. Ecol.* 10: 1207-1225.

Russello, M. A. & Amato, G. (2004). Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Mol. Ecol.* 13: 2829-2840.

Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Gosse, J.C., Cussac, V.E., Habit, E., Zemplak, T.S., Adams, E.D. (2008). Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Mol. Ecol.* 17:2234–2244.

Ryder, O.A. & Fleischer, R.C. (1996). Genetics Research and Its Application in Zoos. En D. G. Kleiman, M. Allen, & K. V. Thompson, Wild. Mammals in Captivity. Principles and Techniques (págs. 255-262). The University Chicago Press.

Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin version 2.000: a software for population genetics data analysis. Suiza: University of Geneva.

Shields G.F., Helm-Bychowski K.M. (1988) Mitochondrial DNA of Birds. In: Johnston R.F. (eds) Current Ornithology. Current Ornithology, vol 5. Springer, Boston, MA

Schwartz, M.K. & McKelvey, K.S. (2009). Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservat. Genet.* 2009;10:441–452

Slatkin, M. (1985). Gene Flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393–430.

Slatkin, M. & Hudson R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics.* 129(2): 555-562.

Smith, M.A., Poyarkov, N.A & Hebert, P.D.N. (2008). CO1 DNA Barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Res.* 8: 235–246.

Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, I. J. (1998). *Molecular systematics of plants II, DNA sequencing*. Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers Boston.

Sorenson, M.D., J.C. Ast, D.E. Dimcheff, T. Yuri & D.P. Mindell. (1999). Primers for a PCR based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogen. and Evolut.* 12:105-114.

Sorenson MD. Avian mtDNA primers. (2003).
<http://people.bu.edu/msoren/Bird.mt.Primers.pdf>

Spencer, C.C., Neigel, J. E. & Leberg, P.L. (2000). Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Mol. Ecol.* 9: 1517-1528.

Stangel, P. W., Lennartz M. R. & Smith M. H. 1992. Genetic variation and population structure of red-cockaded woodpeckers. *Conserv. Biol.* 6: 283–292.

Strobeck, C. (1987). Average number of nucleotide differences in a sample from a single subpopulation: a test for population subdivision. *Genet.* 117: 149–153.

Subramanian, S., Denver, D.R., Millar, C.D., Heupink, T., Aschrafi, A., Emslie, S.D., Baroni, C., & Lambert, D.M. (2009). High mitogenomic evolutionary rates and time dependency. *Trends. Genet.* 25: 482–486.

Taberlet, P., Mattock, H., Dubois-Paganon, C. & Bouvet, J. (1993). Sexing free-ranging brown bears *Ursus arctos* using hairs found in the field. *Mol. Ecol.* 2: 399-403.

Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecol. and Evol.* 14 (8): 323–327.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genet.* 105: 437-460.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genet.* 123:585–595

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. and Evol.* 24(8): 1596-1599.

Tonni, E.P., Huarte, R.A., Carbonari, J.E. & Figini, A.J. (2003). New radiocarbon chronology for the Guerrero Member of the Luján Formation (Buenos Aires, Argentina): palaeoclimatic significance. *Quarter. Internat.* 109-110: 45-48.

Tonello, M.S & Prieto, A.R. (2009). Pastizales pampeanos: unidades de vegetación natural potencial y su relación con el espectro polínico actual. *Quaternário do Rio Grande do Sul: Integrando conhecimentos. Monografias da Sociedade Brasileira de Paleontologia:* 95-105.

Tóth, E., Strassmann, J. E., Nogueira-Neto, P., Imperatriz-Fonseca, V. L. & Queller, D., (2002). Male production in stingless bees: variable outcomes of queen - worker conflict. *Mol. Ecol.* 11: 2661-2667.

Tubaro, P. L. (1997). Bioacústica aplicada a la sistemática, conservación y manejo de poblaciones naturales de aves. *Etología*. 7:19-32.

Tubaro, P.L. & Gabelli, F.M. (1999). The decline of the pampas Meadowlark: difficulties of applying the IUCN criteria to neotropical grassland birds. *Studies in avian Biol.* 19: 250-257.

Uruguay-MVOTMA (2005): Concepto del Proyecto "Fortalecimiento de capacidades para la implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Uruguay". SNAP (DINAMA - MVOTMA/PNUD/ GEF/ URU/05/001). <http://www.snap.gub.uy>

van Hooft, W. F., Groen A. F. & Prins, H. H. T. (2003). Genetic structure of African buffalo herds based on variation at the mitochondrial D-loop and autosomal microsatellite loci: Evidence for male-biased gene flow. *Conserv. Genet.* 4: 467–477.

Vélez, E., Chomenko, L., Schaffer, W. & Madeira, M. (2009). Um panorama sobre as iniciativas de conservacao dos Campos Sulinos. In: *Campos Sulinos: conservacao e uso sustentavel* (V. P. Pillar, S. C. Muller, Z. M. S. Castilhos, AND A. V. A. Jacques, eds.), pp. 356–379. Ministerio do Meio Ambiente, Brasilia, Brazil.

Vickery, P.D., Hunter Jr., M.L. & Melvin, S.M. (1994). Effects of habitat area on the distribution of grassland birds in Maine. *Conserv. Biol.* 8: 1087–1097.

Vickery, P.D., Tubaro, P.L., Cardoso da Silva, J.M., Peterjohn, B.G., Herkert, J.R. & Cavalcanti, R.B. (1999). Conservation of grassland birds in the Western Hemisphere. *Studies in Avian Biol.* 19: 2–26.

Villagrán, C., León, A. & Roig., F.A. (2004). Paleodistribución del alerce y ciprés de las Guaitecas durante períodos interestadiales de la Glaciación Llanquihue: provincias de Llanquihue y Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. *Revista geológica de Chile*. 31: 133-151.

Waits, L.P., Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *J. Wildlife manage.* 69: 1419–33.

Waits, L.P., Luikart, G. & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.* 10:249–256.

Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genet.* 160: 1203–1215

Waples, R. S. & Do, C. (2008). LdNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 753–756

Waples, R. S. & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Applicat.* 3: 244–262

Weir B.S. (1996). *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sunderland, Sinauer Associates. *Open Access Library Journal*, 1: 3

Weir, J.T., & Schluter, D. (2008). Calibrating the avian molecular clock. *Mol. Ecol.* 17: 2321–2328.

Wilmer, J. W., Allen, P. J., Pomeroy, P. P., Twiss, S. D. & Amos, W. (1999). Where have all the fathers gone? An extensive microsatellite analysis of paternity in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Mol. Ecol.* 8: 1417-1430.

Wisley, S. M., Buskirk, S. W., Fleming, M. A., McDonald, D. B. & Ostrander, E. A. (2002). Genetic diversity and fitness in black-footed ferrets before and during a bottleneck. *The Journal of Hered.* 93: 231-237.

Yi, S.J., Ellsworth, D.L., & Li, W.H. (2002). Slow molecular clocks in Old World monkeys, apes, and humans. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2191–2198.

Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11(1): 1-16.

Zhang, B., Fang, S.G. & Xi Y.M. (2004). Low genetic diversity in the Endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. *Bird Conserv. Internat.* 14: 183-190.

Zalba S.M. & Cozzani N.C. (2004). The impact of feral horses on grassland bird communities in Argentina. *Animal Conservation* 7: 35– 44.

Zink, R.M., Drovetski, S.V., Rohwer, S. (2006). Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. *Mol. Phylogenet. and Evolut.* 40:679–686.

Anexo I – Ejemplares muestreados

Ejemplares de loica pampeana muestreados desde el año 2008 por el Dr. Adrián Azpiroz, pertenecientes a la población de Arerunguá (Departamento de Salto, Uruguay) y muestras de loica pampeana muestreadas en Bahía Blanca Argentina. Además de muestras obtenidas del museo MNHN.

Código (SD)	Fecha colecta	Especie	Tipo de muestra	Anillo	Sexo	Localidad	País	Nido
SD1	29/10/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	401-402	S/D	El Silencio	Uruguay	15
SD2	02/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	801	S/D	El Silencio	Uruguay	35
SD3	08/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	804	Macho	El Silencio	Uruguay	29
SD4	08/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	802	hembra	El Silencio	Uruguay	29
SD5	08/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	803	S/D	El Silencio	Uruguay	29
SD6	09/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	805	Macho	El Silencio	Uruguay	6
SD7	09/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	808	S/D	El Silencio	Uruguay	6
SD8	09/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	806	S/D	El Silencio	Uruguay	6
SD9	09/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	807	S/D	El Silencio	Uruguay	6
SD10	11/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	810	S/D	El Silencio	Uruguay	20
SD11	11/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	809	S/D	El Silencio	Uruguay	20
SD12	11/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	811	S/D	El Silencio	Uruguay	20
SD13	12/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	812	S/D	El Silencio	Uruguay	9
SD14	12/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	815	S/D	El Silencio	Uruguay	7
SD15	12/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	813	S/D	El Silencio	Uruguay	7
SD16	12/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	814	S/D	El Silencio	Uruguay	7
SD17	13/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	818	S/D	El Silencio	Uruguay	11
SD18	13/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	817	S/D	El Silencio	Uruguay	11
SD19	13/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	816	S/D	El Silencio	Uruguay	11
SD20	16/11/2008	<i>A. furcetus</i>	pluma	S/D	S/D	El Silencio	Uruguay	
SD21	20/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	821	S/D	El Silencio	Uruguay	28
SD22	20/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	822	S/D	El Silencio	Uruguay	28
SD23	20/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	823	S/D	El Silencio	Uruguay	28
SD24	20/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	824	S/D	El Silencio	Uruguay	28
SD25	14/11/2009	<i>Sturnella defilippii</i>	sangre	S/D	S/D	El Silencio	Uruguay	907
SD26	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	844	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	NII008
SD27	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	845	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	NII008
SD28	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	846	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	Pi11002
SD29	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	841	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	Pi11001
SD30	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	842	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	N11008
SD31	18/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	843	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	N11008
SD32	08/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	827	S/D	El Silencio	Uruguay	10003
SD33	08/11/2008	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	828	S/D	El Silencio	Uruguay	10003
SD34	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	832	S/D	El Silencio	Uruguay	1005
SD35	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	833	S/D	El Silencio	Uruguay	1005
SD36	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	834	S/D	El Silencio	Uruguay	1005
SD37	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	835	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	1021
SD38	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	836	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	1021
SD39	21/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	837	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	1021
SD40	18/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	831	S/D	Casa Amarilla	Uruguay	PL 10002

SD41	14/11/2009	<i>Sturnella defilippii</i>	2 sangre, 1 pluma	S/D	S/D	El Silencio	Uruguay	907
SD42	11/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	830	S/D	El Silencio	Uruguay	1004
SD43	08/11/2011	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	829	S/D	El Silencio	Uruguay	10001
SD44	26/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	840	S/D	El Silencio	Uruguay	1003
SD45	25/11/2010	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	838	S/D	El Silencio	Uruguay	1007
SD46	15/03/2012	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	S/D	macho	Canelones, Piedra Alta	Uruguay	
SD47	15/03/2012	<i>Sturnella defilippii</i>	piel	S/D	macho	Tacuarembó	Uruguay	
SD48	15/03/2012	<i>Sturnella defilippii</i>	piel	S/D	macho	Flores, Cerro Colorado	Uruguay	
SD49	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	851 (N06)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD50	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	850 (N06)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD51	26/01/1900	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	847 (N06)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD52	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	848 (N06)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD53	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	849 (N06)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD54	05/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	852 (N01)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD55	05/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	853 (N01)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD56	05/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	854 (N01)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD57	05/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	855 (N01)	S/D	Bahía Blanca	Argentina	
SD58	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SD59	26/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	hembra	Bahía Blanca	Argentina	
SD60	30/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SD61	03/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SL1	03/12/2013	<i>Sturnella Loyca</i>	músculo	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SD62	10/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SD63	10/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	músculo	S/D	hembra	Bahía Blanca	Argentina	
SD64	15/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	huevo	S/D	S/D	S/D	Uruguay	
SD65	15/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	huevo	S/D	S/D	S/D	Uruguay	
SD66	15/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	huevo	S/D	S/D	S/D	Uruguay	
SD67	15/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	huevo	S/D	S/D	S/D	Uruguay	
SD68	16/12/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	tejido	S/D	macho	Bahía Blanca	Argentina	
SD69	09/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	S/D	S/D	Arerunguá (UY)	Uruguay	
SD70	08/11/2013	<i>Sturnella defilippii</i>	pluma	S/D	S/D	Arerunguá (UY)	Uruguay	
SD71	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD72	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD73	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD74	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD75	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD76	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	
SD77	04/11/2015	<i>Sturnella defilippii</i>	toe pad	S/D	macho	Museo (MNHN)	Uruguay	

Anexo II – Frecuencias y Tamaños

Tabla de frecuencias para cada loci en loica pampeana y rango de tamaños encontrado para cada loci microsatélite en cada población (SD40 representa población Arerunguá y SD68 población Bahía Blanca).

Tables of allelic frequencies for each locus:

Locus: CB1

Pop	Alleles	Genes
	187 191 201 203 207 209 211 213 215 217 221 223 227 229 231 237 241	
1_SD40	0.018 0.018 0.054 0.054 0.286 0.018 0.196 0.036 0.071 0.143 0.018 0.018 0.018 0.018 0.018 0.000 0.018 56	
2_SD68	0.000 0.000 0.000 0.188 0.000 0.000 0.312 0.062 0.250 0.062 0.000 0.000 0.062 0.000 0.000 0.062 0.000 16	

Locus: CB15

Pop	Alleles	Genes
	207 211 213 217 221 229 233 237 241 245 249 257 259 261	
1_SD40	0.014 0.014 0.057 0.014 0.100 0.129 0.100 0.086 0.300 0.014 0.071 0.000 0.014 0.029	
2_SD68	0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.107 0.286 0.321 0.000 0.179 0.000 0.071 0.000 0.036	

Locus: Mu25

Pop	Alleles	Genes
	112 114 116 118 120 124 126 128 130 132 134 136 138 140 142 144 146 152 164 170	
1_SD40	0.087 0.043 0.022 0.043 0.130 0.022 0.000 0.065 0.109 0.043 0.087 0.043 0.043 0.022 0.065 0.022 0.043 0.043 0.022 0.043 46	
2_SD68	0.100 0.000 0.100 0.050 0.000 0.250 0.050 0.000 0.050 0.000 0.250 0.000 0.000 0.150 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 20	

Locus: Mu29

Pop	Alleles	Genes
	115 117 119 121 123 125 127 129 131 133 135 137	
1_SD40	0.014 0.000 0.257 0.057 0.043 0.200 0.029 0.143 0.100 0.071 0.014 0.071 70	
2_SD68	0.000 0.100 0.267 0.067 0.133 0.133 0.267 0.033 0.000 0.000 0.000 0.000 30	

Locus: Pca3

Pop	Alleles	Genes
	142 150 152 156 158 160 162 164 166 168 170 172 174 176	
1_SD40	0.016 0.016 0.016 0.016 0.047 0.109 0.031 0.188 0.156 0.172 0.203 0.031 0.000 0.000	64
2_SD68	0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.038 0.077 0.231 0.115 0.192 0.115 0.000 0.154 0.077	26

Locus: Dpu15b

Pop	Alleles	Genes
	129 131 133 135 137 139 141 143 145 151 153 155 157 159 161 163 165 169 171 175 181 183	
1_SD40	0.050 0.017 0.017 0.033 0.017 0.000 0.000 0.117 0.083 0.033 0.183 0.100 0.067 0.067 0.033 0.050 0.067 0.000 0.017 0.017 0.017 0.017 60	
2_SD68	0.000 0.000 0.179 0.000 0.107 0.071 0.036 0.000 0.071 0.000 0.179 0.071 0.000 0.036 0.000 0.000 0.107 0.036 0.000 0.107 0.000 0.000 28	

Locus: Mau23

Pop	Alleles	Genes
	160 164 166 168 170 172 174 176 178	
1_SD40	0.024 0.143 0.119 0.214 0.119 0.095 0.214 0.024 0.048	42
2_SD68	0.000 0.000 0.417 0.417 0.000 0.083 0.083 0.000 0.000	12

Anexo III – Matriz de genotipos

```
"Title line: "loicas""
CB1
CB15
Mu25
Mu29
Pca3
Dpu15b
Mau23
POP
1_SD1 , 191207 217233 000000 119131 164164 151151 000000
1_SD2 , 201211 259261 134134 119123 152158 145145 000000
1_SD3 , 217217 241241 130142 129131 000000 000000 164176
1_SD4 , 000000 233237 000000 125125 160160 143143 000000
1_SD5 , 187217 233241 130142 125125 160160 143143 000000
1_SD6 , 207217 237249 112134 125131 168168 157157 000000
1_SD8 , 207217 241249 000000 129131 000000 153155 000000
1_SD9 , 211211 245249 000000 000000 000000 000000 000000
1_SD10 , 207207 229229 116132 123129 150158 145165 166168
1_SD11 , 201211 221221 120120 123129 170170 145165 168168
1_SD12 , 201207 237237 120120 121127 158170 145165 160168
1_SD13 , 203211 213285 144152 115119 164164 135163 170172
1_SD14 , 211215 213221 114114 119119 162164 137161 172172
1_SD15 , 211215 229249 000000 119129 164172 161183 166170
1_SD16 , 000000 213229 138164 119129 164172 159181 166178
1_SD17 , 211215 221241 000000 125125 164170 143163 000000
1_SD18 , 207215 221221 000000 127133 164170 000000 000000
1_SD19 , 207207 241241 132134 125125 164170 143163 000000
1_SD21 , 227230 229229 000000 125137 166170 143155 170172
1_SD22 , 203207 229241 000000 133137 166166 155157 164168
1_SD24 , 000000 221241 000000 124131 166170 000000 000000
1_SD25 , 203213 213249 128130 000000 168170 131133 166174
1_SD26 , 000000 241241 000000 119129 000000 153175 000000
1_SD27 , 207217 229233 000000 119119 168170 000000 000000
1_SD28 , 000000 221229 000000 119125 142166 135165 000000
1_SD29 , 000000 229241 000000 121121 168170 000000 000000
1_SD30 , 217223 241241 118136 119129 168170 153155 168174
1_SD31 , 207217 233233 118140 119119 160170 153153 168174
1_SD32 , 207209 000000 128128 137137 156164 155155 164168
1_SD33 , 000000 233261 124142 121137 166168 157171 166178
1_SD34 , 000000 241241 112170 125133 168168 129159 168174
1_SD35 , 000000 000000 130170 119129 168168 129159 170174
1_SD36 , 207213 241241 130152 125129 166166 129159 174174
1_SD37 , 207211 229237 112138 133135 162164 153153 000000
1_SD38 , 207212 237241 120146 131133 160166 153153 164174
1_SD39 , 229241 207211 120146 119131 160166 153153 164174
1_SD40 , 211221 241241 112136 119119 000000 000000 164170
POP
2_SD49 , 211215 229245 134140 117127 164170 155175 000000
2_SD50 , 215227 237237 134140 119127 164164 145175 000000
2_SD51 , 211215 229245 118140 117127 174174 145175 166168
2_SD52 , 211237 237237 134134 119121 164164 153153 168172
2_SD53 , 000000 229233 130134 117127 174174 153155 000000
2_SD54 , 000000 233245 124124 119123 168176 165169 166166
2_SD55 , 203203 233245 124126 119123 162164 137165 166168
2_SD56 , 000000 233233 000000 119127 168176 139165 000000
2_SD57 , 000000 233233 124124 119127 162168 139159 166168
2_SD58 , 000000 233257 000000 000000 000000 000000 000000
2_SD59 , 000000 237257 000000 119125 000000 133141 000000
2_SD60 , 213215 245261 112112 125127 170170 153153 000000
2_SD62 , 203211 237237 000000 123127 000000 000000 000000
2_SD63 , 211217 237237 000000 119123 166166 137137 000000
2_SD65 , 000000 000000 000000 125125 168168 133133 000000
2_SD68 , 000000 000000 116116 121129 160166 133133 168174
```

Matriz de genotipos generada, se presentan en la primera fila inicial los locus analizados y las columnas corresponden al genotipo correspondiente a cada locus. Cada fila corresponde a un individuo, la ausencia de datos por locus se representa como "000000".