Tesis de Maestría en Biología – Subárea Genética

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

PEDECIBA

AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

# Evaluación de la estructuración genética del gato montés (*Leopardus geoffroyi*) en Uruguay y en un contexto regional

Lic. Nadia Bou

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Departamento de Biodiversidad y Genética

Orientador: Dra. Mariana Cosse

Co-orientador: Dra. Adriana Mimbacas


Integrantes del Tribunal:

Presidente: Dr. Álvaro Soutullo

Vocal: Dr. Arley Camargo

Vocal: Dra. Constanza Napolitano

**Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a Mariana Cosse por haber sido tan exelente tutora. Me dio el espacio suficiente para que yo manejara el desarrollo de las distintas etapas de la tesis y me moviera a mi ritmo, pero a la vez estuvo siempre presente, siempre atenta enseñando, asesorando y orientando. Trabajó conmigo codo a codo para solucionar las distintas dificultades que fueron surgiendo en el proceso.

También quiero agradecer a Adriana Mimbacas por haber aceptado ser una de mis orientadoras a pesar de que la temática no es tan próxima a su línea de investigación. Su participación fue muy significativa para el desarrollo de esta tesis. Siempre que solicité orientación, la redacción de una carta, lectura del manuscrito, una firma, siempre respondió con prontitud y eficiencia.

A Álvaro Soutullo, Arley Camargo y Constanza Napolitano por haber aceptado formar parte del tribunal. Agradezco su exhaustiva corrección del manuscrito y todos sus valiosos aportes, comentarios y observaciones que sin dudas mejoraron mucho el trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Biodiversidad y Genética por hacer los días de trabajo tan amenos. Me han ayudado a lo largo de todo el proceso, siempre dispuestos a dar una mano, un consejo, una palabra de aliento o un momento divertido.

A Javier Pereira, Mariano Merino, Tatiane Trigo, Caroline Espinosa por las colaboraciones generadas y el aporte de muestras regionales.

A todos los que colaboraron aportando muestras de gato montés en Uruguay o información para acceder ellas: Susana González, Mariana Cosse, Natalia Mannise, María Pía Aristimuño, Yanina Leone, Florencia Grattarola, Carmen Leizagoyen, Juan Villalba, Ana Pérez, Enrique M. González, Diego Moreno, Diego Queirolo, Lorena Cohelo, Olivia Lluch, Carol Fontes, Sergio Duarte, Fernando Pérez-Piedrabuena, Cristhian Clavijo, ECOBIO (Hugo Coitiño y Felipe Montenegro), guardaparques de Cabo Polonio (Néstor Pérez, Carolina Della Ratta, Martin Amarilla, Emiliano Sánchez), a Eduardo Méndez, Andres de Mello y Alejandro Rodríguez de la Reserva Natural Salus, a Maria Nube y Sofia Scanavio de Vida Silvestre.

A la ANII por otorgarme la beca de maestría (POS_NAC_2013_1_11716)

A mi familia por estar siempre.

A mis padres por su eterno amor, confianza y apoyo incondicional.

A Cristhian por ser tan buen compañero de vida. Por su amor y su paciencia infinita, por ser siempre una fuente de fortaleza emocional.

A Kia y Leila-Roberta por su presencia silenciosa, sus mimos y calor peludo que tantas tardes y noches me hicieron compañía.

**ÍNDICE**

**RESUMEN** ..... **1**

**INTRODUCCIÓN** ..... **2**

**El gato montés** ..... **2**

**Antecedentes genéticos del gato montés** ..... **6**

**Flujo génico entre poblaciones y estructuración genética** ..... **8**

**Microsatélites y su uso en genética de poblaciones** ..... **10**

**Uruguay y la región** ..... **12**

**HIPÓTESIS** ..... **14**

**OBJETIVOS** ..... **14**

**MATERIALES Y MÉTODOS** ..... **15**

**Obtención de muestras** ..... **15**

**Procedimiento de laboratorio** ..... **16**

Extracción de ADN ..... 16

Determinación de la especie-Sonda TaqMan ..... 16

Sexaje ..... 18

Selección y amplificación de loci de microsatélites ..... 18

**Caracterización de loci de microsatélites** ..... **20**

Test de equilibrio de Hardy-Weinberg ..... 20

Test de desequilibrio de ligamiento ..... 20

Errores de genotipado ..... 21

Contenido de información polimórfica (PIC) ..... 21

**Análisis de la estructuración poblacional** ..... **22**

Validación de la matriz de datos ..... 22

Estructuración poblacional ..... 22

Análisis factorial de correspondencia (AFC) ..... 23

Estadísticos F ..... 24

Número de migrantes..... 24

Aislamiento por distancia ..... 25

**RESULTADOS .....26**

**Obtención de muestras y procedimientos de laboratorio.....26**

Muestras, extracción y amplificación ..... 26

Determinación de la especie-Sonda TaqMan ..... 28

Sexaje ..... 30

**Caracterización de loci de microsatélites .....32**

**Análisis de la estructuración poblacional.....34**

Validación de la matriz de datos..... 34

Estructuración poblacional ..... 37

Análisis factorial de correspondencia (AFC) ..... 41

Caracterización de loci en cada grupo ..... 42

Estadísticos F ..... 43

Número de migrantes..... 44

Aislamiento por distancia ..... 45

**DISCUSIÓN .....46**

**Muestras.....46**

**Marcadores.....48**

**Proporción de sexos .....50**

**Estructuración genética .....51**

**Unidades de manejo e implicancias para la conservación.....56**

**CONCLUSIONES .....57**

**PERSPECTIVAS .....59**

**BIBLIOGRAFÍA.....60**

**Anexo I.....69**

**Anexo II.....72**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.Distribución y apariencia del gato montés .....3

Figura 2. Subespecies del gato montés .....7

Figura 3. República Oriental del Uruguay .....13

Figura 4. Muestras por año de colecta .....27

Figura 5. Secuencias sondas TaqMan .....29

Figura 6. Curvas de amplificación en RTPCR con sondas TaqMan .....29

Figura 7. Sexaje .....31

Figura 8. Distribución espacial de las muestras por género .....31

Figura 9. Logaritmo neperiano de máxima verosimilitud y Delta K .....37

Figura 10. Gráficos del programa *Structure* .....38

Figura 11. Distribución espacial de los componentes genéticos por individuo y por país .....39

Figura 12. *Structure* sólo para las muestras de Uruguay .....40

Figura 13. Análisis Factorial de Correspondencia .....41

Figura 14. Ubicación espacial de los migrantes de primera generación .....44

Figura 15. Test de Mantel del análisis de Aislamiento por Distancia .....45

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Loci de microsatélites utilizados .....19

Tabla 2. Caracterización de loci de microsatélites .....33

Tabla 3. Valores de Fis y Fst por rangos temporales .....35

Tabla 4. Test de chi-cuadrado por locus entre rangos temporales .....36

Tabla 5. Test de chi-cuadrado global entre rangos temporales .....36

Tabla 6. Caracterización de loci de microsatélites en el grupo Uruguay-Brasil .....42

Tabla 7. Caracterización de loci de microsatélites en el grupo Argentina .....43

Tabla 8. Estadísticos F .....43

Tabla 9. Migrantes de primera generación .....44

**RESUMEN**

El gato montés es endémico de Sudamérica y uno de los félidos más abundantes en la mayor parte de su rango de distribución. Sin embargo los estudios sobre la dinámica poblacional y conectividad de la especie son escasos. El objetivo de esta tesis fue evaluar el grado de estructuración genética del gato montés *Leopardus geoffroyi* dentro de Uruguay y en relación a las regiones limítrofes de Brasil y Argentina. Para ello seestablecieron diversas colaboraciones que permitieron reunir muestras de museo, zoológicos, animales atropellados o cazados y fecas. Se diseñaron sondas TaqMan para verificar la identidad taxonómica de las muestras a partir del polimorfismo detectado en la región *COII del ADN mitocondrial*. Se determinó el sexo mediante corrida en microcapilar en base a una deleción que presentan los félidos en el cromosoma Y de la región que codifica para dedos de zinc. La estructuración fue evaluada a partir de un set de 11 loci de microsatélites analizados con el programa *Structure*. Se calculó además el índice de fijación entre los grupos encontrados, se analizó la existencia de migrantes y de aislamiento por distancia. Se analizó un total de 70 ejemplares (Uruguay: 49, Provincias Buenos Aires y Entre Ríos: 12, Rio Grande do Sul: 9). La proporción de sexos macho/hembra encontrada fue 2:1. Los microsatélites utilizados resultaron polimórficos y adecuados para estudios de estructuración genética del gato montés en la región. Los resultados indican que el gato montés tiene alta conectividad y no se detectan cambios significativos en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo. En la dimensión espacial los individuos de Uruguay y Brasil pueden ser considerados una única población, levemente diferenciados de los de Argentina. El Río Uruguay permite un moderado flujo génico entre ambas poblaciones de aproximadamente 2 migrantes por generación. El flujo es mayormente unidireccional desde Argentina hacia los otros países. Puede existir además cierta diferenciación dentro del grupo Uruguay-Brasil que deberá ser estudiado en mayor profundidad. Si bien no se diferencian unidades de manejo de acuerdo a los criterios genéticos básicos, la variabilidad encontrada debe ser considerada durante el desarrollo de políticas de manejo. Este es el primer trabajo genético y poblacional del gato montés en el extremo Este de su rango de distribución. Contribuye a comprender su dinámica poblacional, a evaluar su estatus de conservación y establece una base contra la cual contrastar estudios poblacionales futuros. Se propone complementar los resultados con una aproximación de conectividad del paisaje y ampliar la ventana regional de análisis, para poder comprender mejor los procesos subyacentes que dan origen a la estructuración observada.

## INTRODUCCIÓN

### El gato montés

El gato montés *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) es un pequeño felino endémico del sur de Sudamérica. Se encuentra en el sur de Bolivia, oeste de Paraguay, sur de Brasil, Argentina (excepto en las Provincias de Misiones y Tierra del Fuego), sur de Chile y Uruguay (González & Martínez-Lanfranco, 2010; Macdonald & Loveridge, 2010; Pereira & Aprile, 2012). El presente trabajo se desarrolla en el extremo Este de su rango de distribución (Figura 1A).En Bolivia, Paraguay y Chile se lo cataloga localmente con cierto grado de vulnerabilidad, Bolivia: casi amenazado (Tarifa & Aguirre, 2009), Paraguay: especie en peligro aunque no amenazada (SEAM, 2011a,b), Chile: rara y en Peligro, se considera cambiar su categoría nacional para Cercana a la Amenaza (Iriarte et al., 2013). En Brasil - Rio Grande do Sul se cataloga como Vulnerable (Almeida et al., 2013),mientras en Argentina cambió de Cercano a la Amenaza a Preocupación Menor (Aprile et al., 2012). En Uruguay se considera Prioritaria para Conservación por los criterios de especie singular (emblemática, carismática, paraguas o valorada culturalmente), especie recurso (con potencial uso sustentable) y por pertenecer a CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (González et al., 2013). A nivel internacional estuvo catalogado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como “casi amenazado” hasta principios del 2015 cuando cambió a “preocupación menor”, debido a su amplia distribución y por ser considerado uno de los félidos más abundantes en la mayor parte de su rango de distribución (Pereira et al., 2015).

Este felino tiene un largo total de entre 80 y 100 cm, y de 20 a 30 cm de alzada, su peso oscila entre 2,5 y 8 kg, siendo en el Sur más corpulentos que en el Norte (González & Martínez-Lanfranco, 2010; Pereira & Aprile, 2012). Presenta un pelaje bayo, variable a lo largo de su distribución entre gris ahumado y amarillo ocráceo, sobre el cual se distribuyen numerosas pintas negras de entre 15 y 20 mm de diámetro (Ximenez, 1975; Pereira & Aprile, 2012) (Figura 1B). El color de base se intensifica en el dorso y se aclara a un color entre blanco y cremoso en el vientre, las manchas tienden a agruparse en las partes centrales del dorso (Ximenez, 1975). Las patas presentan bandas negras transversales y la cola anillos y bandas estrechas muy variables en su distribución (Ximenez, 1975). Los individuos melánicos son comunes, condición debida a un gen autosómico dominante (Sunquist & Sunquist, 2002). La piel del gato montés fue la más frecuentemente comercializada en el mercado peletero internacional, luego de la del lince de Norteamérica *Lynx rufus* (Sunquist & Sunquist, 2002). Un gran número de pieles fueron exportadas desde Sudamérica entre 1960s y 1980s, sólo Argentina llegó a exportar 350

mil pieles entre 1976 y 1979. Sin embargo, su comercio se redujo significativamente luego de 1988, y en 1992 la especie fue ascendida al apéndice I de CITES (Pereira & Aprile, 2012; Pereira et al., 2015; CITES, 2013), lo que determinó el fin de la comercialización legal de sus pieles.

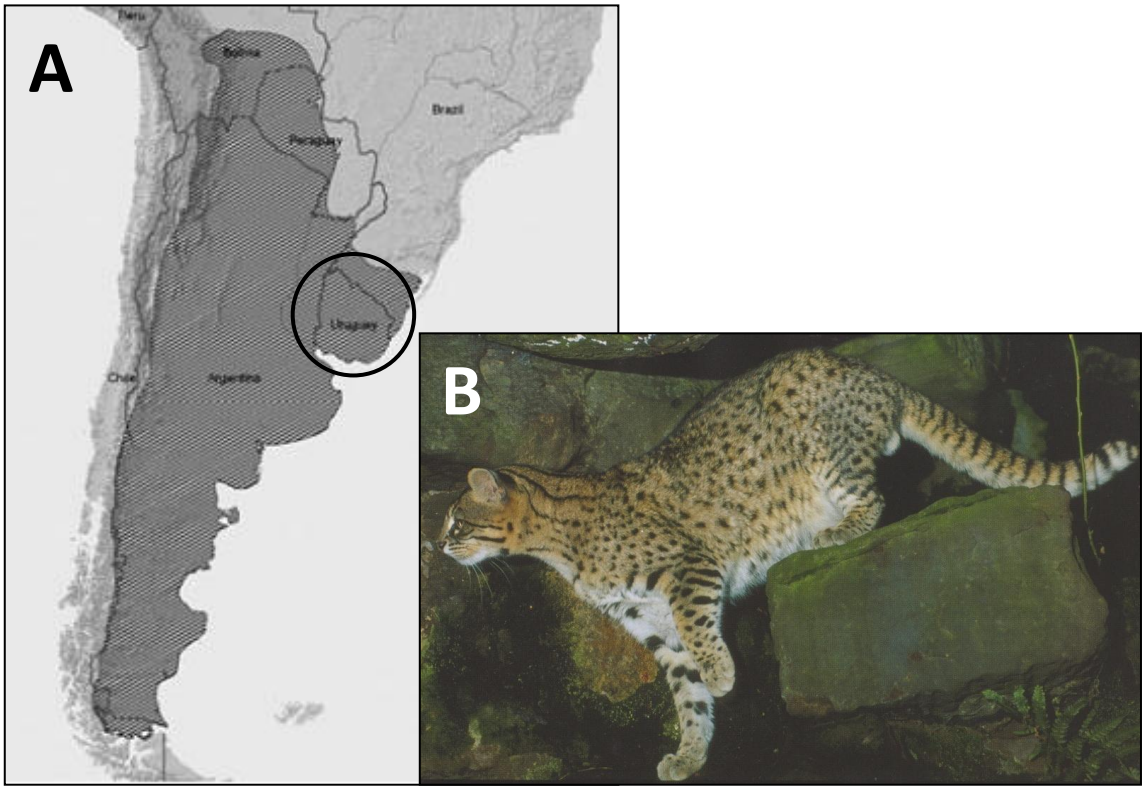


Figura 1. A. Rango de distribución del gato montés *Leopardus geoffroyi*, extraído de Macdonald & Loveridge (2010), el círculo negro identifica el área de estudio de la presente tesis, que comprende el extremo Este de su distribución. B. Imagen del gato montés con pelaje pintado, extraído de Sunquist & Sunquist (2002)

El gato montés es un carnívoro estricto, sin embargo su dieta abarca una amplia variedad de presas de acuerdo a la disponibilidad existente en las distintas localidades y períodos (Johnson & Franklin, 1991; Manfredi et al., 2004). Predominan los pequeños mamíferos, principalmente liebres y roedores, secundariamente aves (Johnson & Franklin, 1991; Sunquist & Sunquist, 2002; Manfredi et al., 2004; Bisceglia et al.,2008; Guidobono et al., 2016). También se ha registrado el consumo de peces, anfibios, reptiles, insectos y hasta carroña de animales domésticos (Ximenez, 1982; Pereira & Aprile, 2012). Puede depredar además animales de corral, gallinas y conejos, lo que genera un conflicto con la población rural (González & Martínez-Lanfranco, 2010). De hábitos predominantemente nocturnos (Johnson & Franklin, 1991; Pereira et al., 2011), caza y se refugia tanto en el suelo como en los árboles (González &

Martínez-Lanfranco, 2010; Sunquist & Sunquist, 2002; Macdonald & Loveridge, 2010). Es además un buen nadador que gustosamente entra al agua, con reportes de animales cruzando a nado en repetidas ocasiones un río de 30 m de ancho y rápida corriente (Johnson & Franklin, 1991).

La especie se caracteriza por individuos solitarios, excepto durante la época de celo o en el caso de hembras con cachorros (González & Martínez-Lanfranco, 2010). Alcanzan la madurez sexual entre los 18 y 24 meses y sólo se reproducen una vez que han adquirido un territorio estable (Pereira & Aprile, 2012). Según datos de cautiverio el celo dura doce días y la gestación entre 66 y 78, los cachorros abren los ojos a los 13 días y a los 30 ya deambulan libremente, a los 50 se inicia el destete (Pereira & Aprile, 2012). Dan a luz una vez al año, generalmente entre Diciembre y Mayo, tienen entre una y cuatro crías por camada, pero lo habitual son dos o tres cachorros (González & Martínez-Lanfranco, 2010; Pereira & Aprile, 2012). Se ha reportado la ausencia de actividad reproductiva bajo estrés nutricional por disminución de presas (Pereira et al., 2006). En cautiverio pueden llegar a vivir hasta los 14 años (González & Martínez-Lanfranco, 2010; Pereira & Aprile, 2012).

Las áreas de actividad y densidades poblacionales de este félido son variables. Las áreas de actividad o *home range* oscilan entre 2 y 12,4 $km^2$ para machos y entre 0,2 y 6 $km^2$ para hembras aproximadamente (Pereira et al., 2015). En los pastizales húmedos de Argentina se estimó un tamaño de área de actividad promedio de 2,5-3,4 $km^2$,siendo el de los machos un 25% mayor que el de las hembras (Manfredi et al., 2006). En un bosque de hayas en el parque nacional Chileno Torres del Paine, se reportaron áreas de actividad de 3,9-12,4 $km^2$ para cinco machos y 2,3-6,5 $km^2$ para dos hembras (Johnson & Franklin, 1991). En el parque nacional Lihue Calel en Argentina los machos ocuparon entre 0,6 y 4 $km^2$ (promedio 2 $km^2$) mientras las hembras ocuparon áreas de 0.2-0.6 $km^2$ (promedio 0,4$km^2$), sin embargo en zonas cercanas a establecimientos ganaderos ascendieron a un promedio de 3 $km^2$ para ambos sexos (Pereira et al., 2012). Parecen tolerar el solapamiento de los territorios, en especial entre hembras o entre macho/hembra aunque también se han registrado solapamientos entre machos (Johnson & Franklin, 1991; Pereira et al., 2006; Pereira et al., 2012). Este es un fenómeno variable, que parece estar relacionado con la disponibilidad de presas, aunque aún no está del todo comprendido. Se ha reportado solapamiento entre hembras provocado por situaciones de estrés ambiental que los llevan a aumentar su radio de acción (Pereira et al., 2006) y también disminución del solapamiento entre machos en áreas con menor disponibilidad de recursos alimenticios, con la posible interpretación de machos incrementando su nivel de exclusión territorial en respuesta a la disminución del recurso (Pereira et al., 2012). Las densidades estimadas varían de 7-12/100 $km^2$ en Chile Torres del Paine (Nowell & Jackson, 1996), 9-

40/100 km² en el chaco Boliviano (Cuellar et al., 2006), 27/100km$^2$ para la región sur de Rio Grande do Sul (Almeida et al., 2013), 45/100 km² en el espinal Argentino (Caruso et al., 2012), hasta más de 190-220/100 km² en Lihuél Calel Argentina (Pereira et al., 2011). Su potencial de dispersión es alto, registrándose eventos de entre 8,7 y 128 km, con una media de 30 km (Pereira & Novaro, 2014). La proporción de sexos, de acuerdo al trabajo de Pereira et al. (2011), tiende a ser sesgado hacia las hembras en ambientes naturales y sesgado hacia los machos en ambientes perturbados con una alta tasa de recolonización, aunque se requieren más estudios para confirmar estas tendencias.

Esta especie habita en una amplia variedad de ambientes incluyendo pastizales, matorrales, bosques y humedales: pre-delta del Paraná (Pereira et al., 2005),bosque seco del chaco Boliviano (Cuéllar et al., 2006), relictos de los pastizales pampeanos (Manfredi et al., 2006), matorrales del centro argentino (Pereira et al., 2011), espinal argentino (Caruso et al., 2012),pastizales del sur de Brasil (Trigo et al., 2013). Utiliza ambientes tanto abiertos como cerrados, pero parece estar más asociada con áreas de cobertura densa en zonas predominantemente abiertas. Evita selvas o bosques muy cerrados y no ocurre en alturas mayores a los 3.740 m.s.n.m. (Cuyckens et al., 2016). Tolera cierto grado de alteración de hábitat producido por el manejo ganadero, si bien existen marcadas diferencias en su dinámica poblacional y mortalidad (Pereira et al., 2011); y existen registros en áreas periurbanas de grandes ciudades como Montevideo y también en áreas cultivadas (González & Martínez-Lanfranco, 2010; Guidobono et al., 2016).

A pesar de su gran plasticidad se considera que la principal amenaza del gato montés es la fragmentación y degradación de hábitat (Pereira et al., 2015). Otras amenazas son la caza control o de represalia por conflictos con productores, el atropellamiento en carreteras, muerte por perros, transmisión de enfermedades de carnívoros domésticos y cambio climático debido a la posibilidad de generar períodos de inundación o sequia, viéndose el gato montés negativamente afectado en ambos escenarios (Pereira et al., 2015; González & Martínez-Lanfranco, 2010). El grupo de especialistas en felinos de la UICN plantea que se conoce muy poco acerca de sus requerimientos ecológicos, por lo que al presente es imposible juzgar el verdadero impacto que las distintas amenazas tienen sobre sus poblaciones (Catsg, 2016).

**Antecedentes genéticos del gato montés**

El primer carnívoro "tipo felino" apareció hace aproximadamente 35 millones de años (MA) en el Oligoceno y la subfamilia Felinae (especies actuales) en el Mioceno tardío (< 11 MA), sufriendo una radiación rápida y reciente que dificulta la comprensión de su historia evolutiva (Pecon-Slattery & O'Brien, 1998; Johnson et al., 2006). Los análisis filogenéticos han podido dilucidar ocho linajes (Pecon-Slattery & O'Brien, 1998; Johnson et al., 2006), el gato montés pertenece al linaje del ocelote, junto a otros seis pequeños félidos neotropicales del género *Leopardus*, cuya divergencia esta datada entre 8 y 2,9 MA (Johnson et al., 2006). La posterior diversificación de este linaje posiblemente estuvo facilitada por el istmo de Panamá (2,8 MA) y el intercambio de fauna entre Norteamérica y Sudamérica (Johnson et al., 2006). El gato montés, previamente denominado *Oncifelis geoffroyi*, fue incluido en el género *Leopardus* por Johnson et al. (2006) en base a su linaje filogenético. Dentro del linaje del ocelote se diferencia un clado conteniendo a *Leopardus tigrinus*, *Leopardus guigna* y *L. geoffroyi*, separándose primeramente *L. tigrinus* hace 3,7 MA (Johnson et al., 1999). El linaje actual de *L. geoffroyi* habría divergido hace alrededor de 2 MA, siendo su especie hermana el gato guiña *L. guigna* (Johnson et al., 1999; Napolitano, 2011). Johnson et al. (1999) desarrollan un análisis filogenético con tres marcadores mitocondriales y 20 microsatélites en el cual obtienen un clado monofilético del gato montés pero sin soporte de división subespecífica. Los autores proponen entonces que *L. geoffroyi* ha mantenido una gran población panmíctica sin barreras significativas del flujo génico desde la divergencia con el ancestro común entre éste y *L. guigna* (Johnson et al., 1999). Desde otra aproximación genética se encontró evidencia de hibridación entre *L. geoffroyi* y *L. tigrinus* en una zona de simpatría en el sur de Brasil, en base a secuencias mitocondriales y nueve loci de microsatélites (Trigo et al., 2008). Posteriormente se determinó la existencia de una especie críptica en *L. tigrinus*, dividiendo a esta en dos especies válidas: *L. tigrinus* en el noreste de Brasil y *L. gutulus* en el sur y sureste, siendo esta última quien hibridizaría con *L. geoffroyi* (Trigo et al., 2013). Se determinó que existe un alto grado de hibridación concentrado en la zona de contacto (sur de Brasil donde se interceptan los biomas de Selva Atlántica y Pampas), sin embargo en regiones alejadas los individuos son genéticamente puros (Trigo et al., 2014).

Dentro del rango de distribución de *L. geoffroyi* han sido reconocidas cuatro o cinco subespecies, principalmente en base a la coloración del pelaje: *L. g. geoffroyi*, *L. g. paraguae*, *L. g. euxanthus*, *L. g. salinarum* y *L. g. leucobaptus* (Ximenez, 1975; Wozencraft, 2005; Nascimento, 2014). Corresponde a Uruguay y Brasil *L. g. paraguae*. En la zona centro-Este de Argentina que limita con Uruguay podrían encontrarse hasta dos subespecies, *L. g. paraguae* y *L. g. geoffroyi* (Figura 2). Sin embargo estudios genéticos y morfológicos recientes concluyen

que es una especie con gran variabilidad general sin reconocerse subespecies válidas (Johnson et al., 1999; Nascimento, 2014).

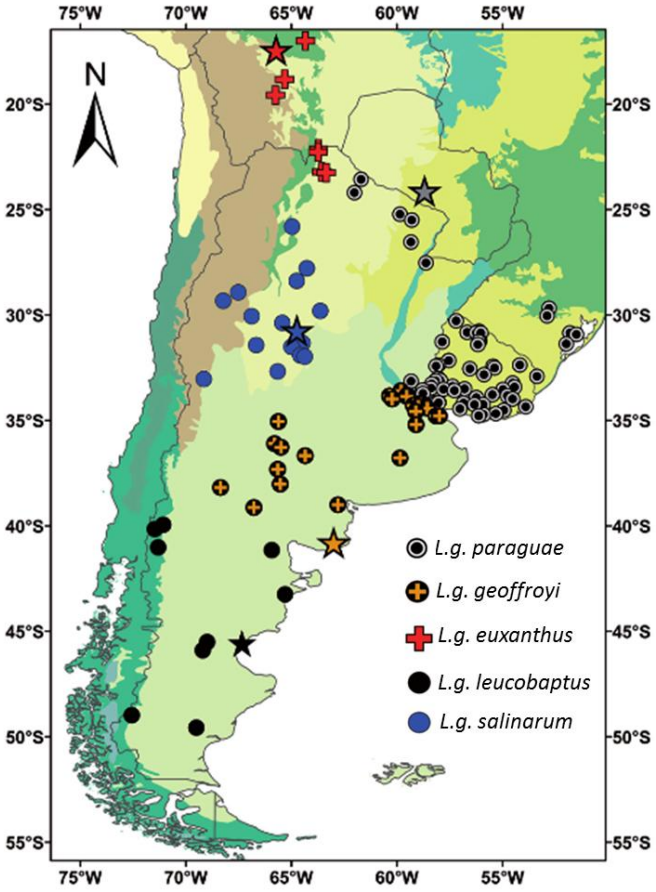


Figura 2. Subespecies de *L. geoffroyi*. Modificado de Nascimento (2014), las estrellas representan la localidad tipo de cada subespecie.

**Flujo génico entre poblaciones y estructuración genética**

Las poblaciones naturales difícilmente conforman un continuo homogéneo a lo largo de todo el territorio, por el contrario las poblaciones de la mayoría de las especies muestran algún nivel de estructuración genética (Beebee & Rowe, 2008; Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Esto implica que existirán diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos o subpoblaciones, y por tanto los individuos de un grupo serán más parecidos genéticamente entre sí que con los individuos de otros grupos (Beebee & Rowe, 2008). El grado de diferenciación entre subpoblaciones estará determinado por el tamaño y el nivel de flujo génico entre las mismas. El flujo génico refiere esencialmente al movimiento de genes, mediados por los organismos o sus gametos, entre las poblaciones (Aguirre, 2007). El nivel de flujo estará determinado en gran medida por la capacidad de dispersión de los organismos en el paisaje y la probabilidad de reproducción efectiva en las poblaciones de destino. El intercambio de genes entre poblaciones homogeniza las frecuencias alélicas y determina el efecto que tendrán la selección y la deriva genética (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Si el intercambio es alto la variación tenderá a homogeneizarse y las poblaciones involucradas alcanzarán eventualmente frecuencias alélicas idénticas (Beebee & Rowe, 2008). Un alto flujo génico se opone a la adaptación local (esto es la fijación de alelos, que son favorecidos bajo condiciones locales)y por tanto, también dificultan el proceso de especiación (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Barton & Hewitt, 1985). Por otro lado el flujo génico propicia que lleguen nuevos polimorfismos a las poblaciones desde subpoblaciones cercanas generando nuevas combinaciones de genes sobre los que la selección natural puede potencialmente actuar (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Si el flujo génico es bajo, las fuerzas evolutivas (selección natural, deriva génica, mutación) irán incrementando la diferenciación genética, que a la larga puede conducir a eventos de especiación, es decir surgimiento de nuevas especies (Beebee & Rowe, 2008).

La estructuración genética puede deberse a una variedad de factores no mutuamente excluyentes. Características ambientales que impliquen distintas presiones de selección, de la historia de vida (ej. sistemas de apareamiento) y procesos demográficos históricos, pueden todos en algún grado modelar la estructura genética de las poblaciones (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).De forma natural el ambiente heterogéneo determinará que unos elementos restrinjan y otros favorezcan la conectividad, dependiendo de las características particulares de cada especie. Los distintos tipos de coberturas del suelo generan diferentes grados de aislamiento, unos inhiben la dispersión más que otros, y las especies difieren en su capacidad de cruzar los variados parches que conforman la matriz ambiental (Ricketts, 2001).Además, como la distribución geográfica de las especies es típicamente más amplia que la capacidad de

dispersión de los individuos, las poblaciones están a menudo genéticamente diferenciadas a través del aislamiento por distancia, esto es, poblaciones próximas serán genéticamente más similares que poblaciones más distantes(Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Otro factor que influye en la estructuración es el desarrollo de las actividades antrópicas. Estas generan modificaciones en la matriz ambiental que pueden alterar el grado de conexión de las poblaciones, intensificar el aislamiento o aumentar su dispersión. La generación de discontinuidades en la distribución de recursos o condiciones ambientales pueden producir subdivisión y aislamiento en las poblaciones silvestres, lo cual resulta en un aumento de la probabilidad de extinciones locales a lo largo del paisaje (Segelbacher et al., 2010). Posibles consecuencias genéticas en poblaciones pequeñas y aisladas incluyen pérdida de diversidad genética, depresión por endogamia debido a la disminución o interrupción del flujo génico (Reed, 2005; Vilas et al., 2006; Keyghobadi, 2007). En general, las especies más sensibles a esta fragmentación del paisaje serán aquellas de gran tamaño corporal, con poblaciones naturalmente poco abundantes, requerimientos de grandes ámbitos de hogar, altamente territoriales o especialistas de recursos (Crooks, 2002; Swihart et al., 2003; Henle et al., 2004). Otras especies por el contrario sacan provecho de este ambiente heterogéneo aumentando su número y distribución. Incluso en determinadas circunstancias, la diversidad total de especies puede incrementarse cuando nuevos parches de hábitat son creados en medio de un continuo, ya que otras especies pueden colonizar estos parches, a pesar de que sean constructos humanos (Andrén, 1994). Sin embargo este desbalance altera los eslabones de la cadena trófica y roles ecosistémicos, pudiendo provocar efectos indeseados difíciles de controlar; por ejemplo la pérdida de los predadores tope y aumento de los mesocarnívoros. Otros posibles efectos son el favorecimiento de las especies exóticas, una mayor interacción entre la fauna silvestre, los animales domésticos y el ser humano, con el consecuente incremento en la depredación de animales de corral, las agresiones y transmisión de patógenos interespecíficas, y zoonosis (Prugh et al., 2009; Riley et al., 2004; Troyer et al., 2005).

La alteración del hábitat es actualmente la principal amenaza que enfrenta la biodiversidad terrestre a nivel global. El proceso de modificación de hábitat se ha intensificado debido al cambio de uso y cobertura del suelo que en Sudamérica esta principalmente ligado al crecimiento de monocultivos como soja y forestación (Brazeiro et al., 2008). Se espera que este proceso de fragmentación continúe y se intensifique en los próximos años, por lo que el desafío actual para el desarrollo de estrategias de conservación será proporcionar soluciones para los conflictos y la supervivencia de las especies en los paisajes contemporáneos (Sala et al., 2000; Lee & Jeetz, 2008).

Conocer el grado de flujo génico entre poblaciones es importante también para la identificación de unidades de manejo. Las unidades de manejo (MU, Moritz, 1994) representan poblaciones demográficamente independientes, cuya dinámica obedece en primer lugar a las tasas de nacimiento y mortalidad locales, más que a la migración (Moritz, 1994; Palsböl et al., 2006). Refiere por tanto a un grupo de individuos de una misma especie en determinada área geográfica, con intercambio de individuos restringido entre áreas adyacentes. El grado de conectividad debe ser lo suficientemente bajo como para asumir que cada población debe ser monitoreada y manejada por separado (Taylor & Dizon, 1999; Palsböl et al., 2006).

Entender cómo se estructura la variación genética entre las poblaciones silvestres, así como el grado de flujo génico y conectividad funcional de las especies en el paisaje, es entonces central para muchos campos de investigación incluyendo biología evolutiva, ecología, genética de poblaciones, biología de la conservación y epidemiología; y puede ofrecer pautas valiosas para el desarrollo de estrategias de manejo y conservación.

**Microsatélites y su uso en genética de poblaciones**

Los microsatélites son marcadores nucleares codominantes de locus simple, que consisten en secuencias repetidas en tándem de entre dos y seis pares de bases (Selkoe & Toonen, 2006). Son altamente polimórficos, con una tasa de mutación de $10^{-2}/10^{-6}$ eventos por locus por generación (Schlötterer, 2000). Éstos evolucionan más rápidamente que el ADN mitocondrial, presentan herencia biparental y se espera que sean evolutivamente neutros (Zane et al., 2002), a menos que se ubiquen próximos a un locus bajo selección. Los distintos alelos están dados por el largo del fragmento, es decir el número de veces que se presenta el repetido, y no por diferencias en la composición de la secuencia como en otros marcadores. La explicación más probable para el origen de este fenómeno de ganancia y pérdida de unidades de repetición es el deslizamiento (*slippage*) de la polimerasa durante la replicación (Schlötterer & Tautz, 1992). Si bien existe una maquinaria de control y reparación de errores en la secuencia, algunos escapan, en especial en las regiones no codificantes donde el mecanismo de control es más laxo. Estos repetidos representarían el balance entre la tasa de error y la corrección de los mismos que ocurren durante la replicación (Li et al., 2002). Sin embargo el modelo de mutación y evolución de los microsatélites aún no está claro, habiéndose desarrollado diferentes propuestas (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Una es el modelo de alelos infinitos (IAM; Kimura & Crown, 1964), en el cual cada mutación genera un nuevo alelo a una velocidad dada, cuyo tamaño es independiente del alelo del progenitor. Este modelo no permite la homoplasia, alelos idénticos comparten el mismo progenitor y son idénticos por descendencia. En oposición al IAM, el modelo de mutación paso a paso (SMM; Kimura & Otha, 1978) propone

que cada mutación genera un alelo nuevo agregando o eliminando una sola unidad repetida, con igual probabilidad hacia ambos lados, siendo por tanto el tamaño del alelo nuevo dependiente del alelo progenitor. En consecuencia, los alelos de tamaños muy diferentes estarán menos relacionados que los de tamaños similares. Una tercera propuesta es el modelo de dos fases (TPM; Valdes et al., 1993) que es un derivado del SMM desarrollado para incluir eventos de mutación mayor, que impliquen la ganancia o pérdida de más de una unidad repetida. Las características que rigen la regulación entre la generación y expansión de arreglos de repetido, así como el mecanismo evolutivo *per se* de estos marcadores aún se encuentra en debate (Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006). A pesar de ello los microsatélites son marcadores muy utilizados en genética de poblaciones, ya que pueden abordar una amplia gama de objetivos. Permiten determinar el grado de variabilidad genética, flujo génico y conectividad dentro y entre las poblaciones, así como estimar niveles de endogamia (Maudet et al., 2002; Selkoe & Toonen, 2006; Hall & Beissinger, 2014). La alta tasa de mutación y el ser selectivamente neutros, los vuelve particularmente útiles para estudiar la rápida respuesta en la variación genética a los efectos del paisaje, respondiendo preguntas sobre la dinámica y estructura poblacional a escala espacial (regional) y temporal (entre 15 y 100 generaciones) reducida (Balkenhol et al., 2009; Landguth et al., 2010; Hall & Beissinger, 2014).

**Uruguay y la región**

La República Oriental del Uruguay se sitúa en el Sureste de América del Sur (30º - 35º S, 53º – 58º W) dentro de la región templada (Achkar & Domínguez, 2000). Abarca 176.215 km² de superficie continental, con aproximadamente 582 km en su eje Norte-Sur y 500 km en su mayor eje Este-Oeste afinándose hacia el Norte. La temperatura media anual es de 18º C y las precipitaciones se distribuyen uniformemente a lo largo del año, con una media de entre 1.100 y 1.200 mm/año (Achkar & Domínguez, 2000). Su orografía se compone de suaves colinas y dos cadenas de serranías, la Cuchilla Grande y la Cuchilla de Haedo, cuya altura máxima alcanza los 514 m.s.n.m. en el Cerro Catedral. Esta nutrido por una densa red hidrográfica en la cual destaca el Río Negro por ser de gran cauce y dividir el país en su eje Este-Oeste, y el río Uruguay que es el límite con la República Argentina (Figura 3A) (Achkar & Domínguez, 2000). Pueden distinguirse dos grandes tipos de paisajes, uno con menor y otro con mayor intervención humana (Figura 3B) (Evia & Gudynas, 2000). El ambiente predominante es la pradera donde tradicionalmente se explota la ganadería extensiva, pero además en Uruguay se combinan varios tipos de bosques (ribereño o de galería, de parque, de quebrada, serrano, costero y palmares), sabanas arboladas e importantes áreas de humedales (Cantón et al., 2010). El paisaje con menor modificación abarca fundamentalmente el centro, norte y este del país, mientras la zona de mayor modificación antrópica conforma una franja de ancho variable sobre el litoral del río Uruguay y departamentos del sur (Evia & Gudynas, 2000; Brazeiro et al., 2008). A partir del 2000 Uruguay experimentó un gran crecimiento del área de cultivos de soja y forestación, y se prevé el mantenimiento de estas tendencias en el futuro (Brazeiro et al., 2008). En el 2007 el 26,4% de hábitats naturales ya habían sido sustituidos por cultivos (principalmente soja) y forestación, y de continuarse con la tendencia actual el impacto potencial de este cambio en el uso del suelo podría alcanzar la pérdida del 41,7% de las áreas naturales (Brazeiro et al., 2008). A nivel global se espera que Uruguay sea uno de los 20 países más afectados por los cambios de uso y cobertura del suelo, de acuerdo a modelos de simulación realizados hasta el año 2100 (Lee & Jeetz, 2008). Por otro lado en el año 2000 se aprueba la ley No. 17234 que declara de interés general la creación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), reglamentada en el año 2005 por decreto presidencial (Bartesaghi et al., 2015). Al momento cuenta con 13 áreas ingresadas al sistema, que en conjunto cubren menos del 0,6 % de la superficie terrestre y marina del país, a pesar de lo cual el porcentaje de ecosistemas y especies prioritarias representados es alto, superando el 40 y 30 % respectivamente (Bartesaghi et al., 2015). Sin embargo, para especies con grandes ámbitos de hogar, cómo los félidos, estas áreas serían insuficientes para garantizar su conservación y

supervivencia a largo plazo, volviéndose clave el desempeño que tenga la especie en el territorio por fuera del sistema (Bou, 2013).

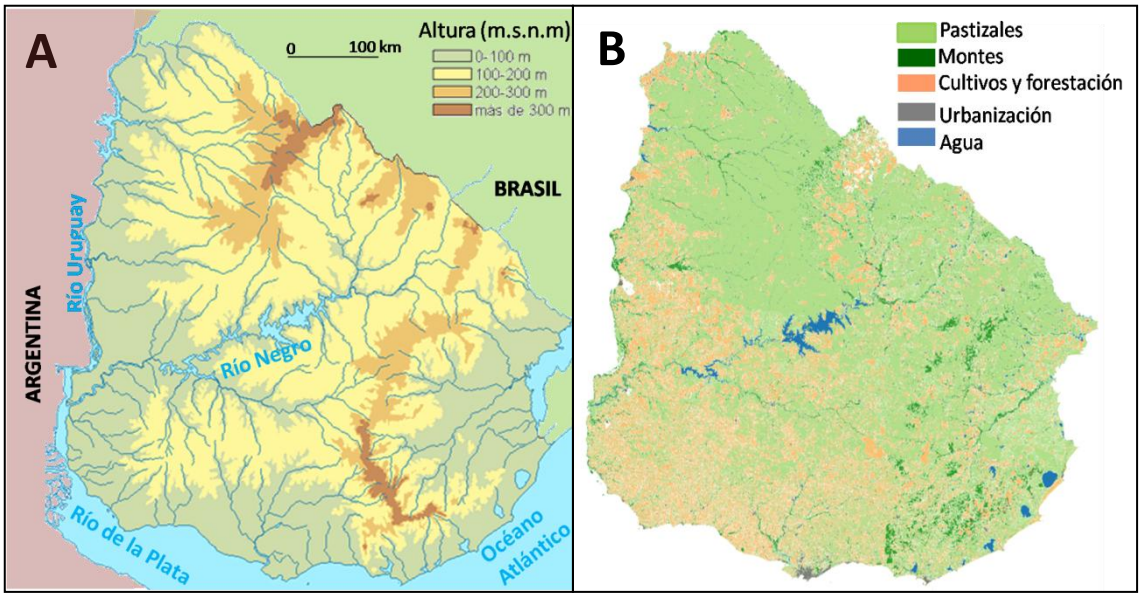


Figura 3. República Oriental del Uruguay. A. Mapa físico. B. Principales ambientes del Uruguay dónde se observa que en el Sur-Oeste es dónde se da la mayor conversión de ambientes naturales a cultivos y forestación (Capa de Cobertura del Suelo de Uruguay Land Cover Classification System 2007-2010).

El gato montés es el felino más común de Uruguay, a pesar de lo cual casi no existen datos para la especie generados a nivel local. La especie tiene registros en todos los departamentos y desde el punto de vista climático, topográfico (Bou, 2013) y de cobertura del suelo (Cuyckens et al., 2016) todo el territorio tendría una alta idoneidad para la especie, por lo que se asume que se encuentra en todo el país, si bien no existen estudios a microescala. La distribución de este félido responde principalmente a factores de cobertura del suelo más que a variables ambientales (Cuyckens et al., 2016). Los accidentes geográficos y ambientes del país no parecerían, a priori, ser barreras importantes o hábitats inadecuados dadas las características ecológicas de la especie.

En relación a los vínculos regionales es esperable que la población uruguaya de gato montés presente un flujo migratorio con las poblaciones de los países vecinos. Existe una frontera seca con Brasil en el este, mientras que la frontera con Argentina está constituida por el Río Uruguay. Se esperaría entonces un mayor intercambio de fauna terrestre del país con Rio Grande do Sul que con las provincias Argentinas adyacentes.

## HIPÓTESIS

### Hipótesis nula

Los ejemplares de gato montés (*L. geoffroyi*) analizados se comportan como una única población panmíctica.

### Hipótesis alternativa 1

Existe un patrón de aislamiento por distancia entre los individuos de la población de gato montés analizada.

### Hipótesis alternativa 2

Distintas unidades paisajísticas y cursos de agua establecen una conectividad diferencial entre los individuos de gato montés (*L. geoffroyi*) determinando procesos de estructuración genética.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar el grado de estructuración genética del gato montés *Leopardus geoffroyi* en el extremo Este de su rango de distribución.

### Específicos

- Estimar el grado de conectividad del gato montés dentro de Uruguay.
- Estimar el grado de conectividad de la población de gato montés de Uruguay en un contexto regional mayor, que abarque también localidades de Brasil y Argentina.
- Evaluar la existencia de distintas unidades de manejo y definir sus límites geográficos para el gato montés en el área de estudio

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de muestras

Se reunieron muestras de Uruguay, Argentina y Brasil. Las muestras de Uruguay fueron obtenidas del banco de tejidos y ADN del departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), de la colección biológica del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN) y de nuevas muestras colectadas para este estudio. Se buscó colaboración de la población mediante redes sociales (Facebook), se contactó a distintas instituciones públicas y privadas (Sistema Nacional de Áreas Protegidas, zoológicos) y a organizaciones no gubernamentales. Además se realizaron campañas de muestreo personales. Las muestras de Brasil y Argentina se obtuvieron a partir de colaboraciones con investigadores de la región (Anexo I).

Los tejidos fueron conservados en alcohol 75% y almacenados a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN, las fecas se conservaron refrigeradas en seco hasta su extracción. Las nuevas muestras conseguidas a lo largo de este estudio fueron ingresadas a la colección de tejidos y ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE.

**Procedimiento de laboratorio**

*Extracción de ADN*

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de González et al. (2015) para tejidos. En el caso de fecas se utilizó un kit comercial, QIAamp DNA Stool Mini Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad (ng/ul) y pureza (relación de absorbancia a 260nm y 280nm) del ADN aislado fue cuantificado en un espectrofotómetro UV-VIS *Nano Drop* TM ND-1000.

*Determinación de la especie- Sondas TaqMan®*

En numerosas ocasiones existe error en la identificación de los ejemplares a partir de muestras colectadas por métodos no invasivos (Piggott & Taylor, 2003). Para corroborar la identidad taxonómica de las muestras se desarrolló un método molecular basado en sondas TaqMan®™. La técnica de identificación de especies mediante sondas TaqMan® consiste en realizar una amplificación en PCR en tiempo real, donde además de los cebadores se incluye una sonda de unión al ADN. La sonda consiste en un oligonucleótido, de entre 18-30pb,que debe ser diseñado de forma complementaria a una región del fragmento de ADN amplificado. El éxito de esta técnica consiste en que dicha región sea única y conservada en la especie de interés, pero a la vez diferente en individuos de especies emparentadas, la unión de la sonda es entonces especie específica. La sonda tiene un fluorocromo de alta energía llamado "reportero" en su extremo 5', y otro fluorocromo de baja energía llamado "quencher" o "secuestrador de fluorescencia" en su extremo 3' (Livak et al., 1995; Heid et al., 1996; Sánchez-Díaz, 2012). Mientras los fluorocromos de ambos extremos se encuentren próximos, esto es mientras la sonda se mantiene íntegra, el quencher secuestra la fluorescencia del reportero evitando la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR la sonda hibrida con su ADN blanco, y durante la fase de elongación la Taq ADN polimerasa se encontrará con la sonda produciendo su hidrólisis gracias a la actividad exonucleasa de la polimerasa, para luego continuar con la amplificación (Holland et al., 1991; Sánchez-Díaz, 2012). Dicha hidrólisis genera la separación de ambos extremos de la sonda y el fluorocromo reportero de alta energía se encontrara libre para emitir su fluorescencia. Por lo tanto a medida que va aumentando la cantidad de moléculas de ADN amplificadas también se incrementa de forma proporcional la fluorescencia, que se registra en el sistema de detección del equipo de PCR a tiempo real (Sánchez-Díaz, 2012). Como la sonda sólo se hidroliza si previamente se ha unido a la secuencia diana, la fluorescencia registrada procede únicamente de la amplificación específica del producto de interés (Sánchez-Díaz, 2012). La especificidad de unión entre la sonda y la secuencia blanco es cercana al 100% (si existen uno o dos pares de base de

diferencia ya no logrará hibridar) por tanto es una técnica precisa y eficiente para la determinación taxonómica.

Esta técnica permite incluir en un mismo ensayo distintas sondas con fluorocromos "reporteros" que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda, logrando así detectar dos o más secuencias blanco (especies) distintas en una misma reacción de PCR (Sánchez-Díaz, 2012).

En el Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE se desarrollaron los cebadores y sondas para diferenciar especies de félidos a partir una fragmento del gen mitocondrial *citocromo oxidasa II* (COII), en una región polimórfica ya utilizada para diferenciar especies de cánidos (Grattarola, 2015). Debido a que no existían secuencias de COII de los félidos silvestres de Uruguay en repositorios públicos de secuencias genéticas (GenBank), se generó una base de datos mediante amplificación en PCR en tiempo final y posterior secuenciación y análisis. Para ello se utilizaron los cebadores FOX154 F *forward* (Grattarola, 2015) y FCE COII F *reverse* (CAGTCTTTAACTTAAAAGGTTAATGCT) diseñado en el laboratorio en base a las secuencias de diversos carnívoros (Cosse datos no publicados). Con ellos se amplificó un fragmento de 203 pb en 6 ejemplares de gato montés (*L. geoffroyi*), 6 de margay (*L. wiedii*), 2 de gato de pajonal (*L. braccatus*) y 1 puma (*Puma concolor*). Además se bajaron del GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), EEUU) dos genomas mitocondriales de gato doméstico (*Felis catus,* NC001700.1 y U20753.1). A partir del alineamiento de estas secuencias se identificó una región de 156 pb con extremos 5' y 3' conservados entre las distintas especies y un polimorfismo interno específico para cada una. Esta región fue utilizada para el diseño de los cebadores y sondas TaqMan®.

Se realizó la puesta a punto del protocolo de amplificación a tiempo real (RTPCR) para cada sonda por separado y para la amplificación de dos o tres sondas en un mismo ensayo. Dichas amplificaciones consistieron en un volumen final de 20 µl, conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN, 0,2 µl de cada sonda, 0,4 µl de cebador, 0,5x de Sensi FAST Probe y agua hasta completar el volumen. El protocolo de ciclos consistió en un paso inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 10 segundos y 62°C por 60 segundos. La adquisición de fluorescencia se realizó durante la etapa de extensión en tres canales para distintas longitudes de onda: *L. geoffroyi* canal verde (470-510nm), *L. wiedii* canal amarillo (530-555nm), *F. catus* canal rojo (625-660nm). El análisis de las curvas de amplificación se realizó con el Rotor Gene™ 6000 v.1.7 software y el algoritmo proporcionado por el mismo.

*Sexaje*

El sexaje de las muestras se realizó a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica para dedos de zinc, el cual presenta una copia en cada cromosoma sexual (Zfx y Zfy). En los felinos la copia en el cromosoma sexual Y presenta una deleción de 3 pb y por lo tanto es de menor tamaño que la copia en el cromosoma X (Pilgrim et al., 2005). De esta manera, los machos serán heterocigotas con dos tamaños de fragmentos (uno de mayor tamaño: el X, y otro de menor: el Y) mientras las hembras serán homocigotas con un único tamaño de fragmento.

Se utilizaron los cebadores ZFKF 230L y ZFKF 195H descritos por Ortega et al. (2004). Al cebador forward se le agregó un fluorocromo (FAM) para poder determinar las diferencias de tres pares de bases entre los fragmentos del cromosoma X e Y mediante corrida en microcapilar. Este par de cebadores se adicionó a cualquiera de los PCR multiplex descriptos en la siguiente sección, sin cambio en las condiciones de la reacción. La asignación de sexos se realiza mediante el genotipado con el programa *GeneMarker*V2.4.0 *(SoftGenetics LLC®*).

*Selección y amplificación de loci de microsatélites*

Se seleccionaron 13 loci de microsatélites (Tabla 1) desarrollados para gato doméstico (Menotti-Raymond et al., 1999; Menotti-Raymond et al., 2012), algunos de los cuales ya habían sido caracterizados para gato montés (Johnson et al., 1999; Trigo et al., 2008). Los loci fueron elegidos buscando que estuvieran en diferentes cromosomas, que los repetidos fueran de di o tetranucleótidos, polimórficos, que los cebadores tuviesen temperaturas de unión al ADN molde (Temperatura de anidamiento o *annealing*, Ta) similares y que no presentaran en los antecedentes apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se testeó la amplificación de cada locus por separado y luego se diseñaron reacciones de tipo multiplex (amplificación de varios loci en la misma reacción), en base a las temperaturas de anidamiento (Ta), el tipo de fluorocromo de los cebadores y el tamaño del fragmento a amplificar (Tabla 1).

Las reacciones de PCR consistieron en un volumen final de reacción de 10 µl, conteniendo aproximadamente 60 ng de ADN, 0,2 µl de cada cebador, 2,5x de PCR Platinum Master Mix y agua hasta completar el volumen. Las condiciones de termociclado fueron 95$^{o}$C durante 2 minutos, seguido de ciclos de: 95$^{o}$C por 30 segundos (desnaturalización), 58$^{o}$C o 60$^{o}$C por 90 segundos dependiendo del multiplex (Tabla 1, Ta), 72$^{o}$C por 50 segundos (extensión); y una extensión final de 30 minutos a 60$^{o}$C. Para confirmar que la amplificación fuese exitosa se realizó la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, utilizando el agente

intercalante GoodView™ (SbS). Las corridas electroforéticas fueron efectuadas con 4 µl del producto y de un marcador de peso molecular, a 100 V y 50 mA. Los productos de PCR que amplificaron correctamente se enviaron al servicio de Análisis de Fragmentos para corridas en microcapilar del Instituto Pasteur de Montevideo o a MACROGEN (Korea). Para corroborar que el tamaño de los fragmentos determinado en ambos laboratorios fuera el mismo se enviaron tres ejemplares de cada multiplex ya genotipados como control positivo.

Tabla 1. Loci de microsatélites utilizados y multiplex diseñados para la amplificación por PCR. Se indica cuáles fueron caracterizados para gato montés (Johnson et al., 1999; Trigo et al., 2008), en que cromosoma del gato doméstico se ubican, el tipo de repetido, tamaño esperado del fragmento amplificado en pares de bases (pb), secuencia del cebador y fluorocromo con que se encuentra marcado, temperatura de anidamiento utilizada para el multiplex en °C (Ta) y multiplex correspondiente.

| Locus | Cromosoma en el gato | Tipo de repetido | Tamaño esperado (pb) | Secuencia del cebador 5'- 3' | Fluorocromo | Ta (°C) | Multiplex |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FCA 304[1,A] | A1 | di | 99–119 | F - CATTGGCTACCACAAAGTAGG | VIC | 58 | A |
| | | | | R - CTGCATGCCATTGGGTAAC | | | |
| FCA 742[2] | D4 | tetra | 123-175 | F - TCAATGTCTTGACAACGCATAA | FAM | | |
| | | | | R- AGGATTGCATGACCAGGAAC | | | |
| FCA 096[1,A] | A2 | di | 195–227 | F - CACGCCAAACTCTATGCTGA | NED | | |
| | | | | R - CAATGTGCCGTCCAAGAAC | | | |
| F 124[1,B] | E1 | tetra | 160-216 | F - TGCTGGGTATGAAGCCTACT | FAM | 60 | B |
| | | | | R - ATTGCCTCAACTACCTAGGC | | | |
| F 42[1,B] | A1 | tetra | 219–259 | F - CCCACGTGGACTAATCAAAT | NED | | |
| | | | | R - CACTGCACAAATTAAGAGGC | | | |
| FCA 391[1,A,B] | B3 | tetra | 235–255 | F - GCCTTCTAACTTCCTTGCAGA | PET | | |
| | | | | R - TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA | | | |
| FCA 126[1,A] | B1 | di | 121–135 | F - GCCCCTGATACCCTGAATG | VIC | 60 | C |
| | | | | R - CTATCCTTGCTGGCTGAAGG | | | |
| FCA 146[1] | A1 | di | 121-127 | F - TATTTAGAAAGCTTGCAGAGGC | FAM | | |
| | | | | R - GACAGTGAAAACCTCCCTATGG | | | |
| FCA 424[1,A,B] | C2 | tetra | 175–189 | F - TGGAAAAATGTGGAATACTGAA | NED | | |
| | | | | R - CCAATTTGTAGTGACATCCCC | | | |
| FCA 043[1,A] | C3 | di | 111–131 | F - GAGCCACCCTAGCACATATACC | VIC | 58 | D |
| | | | | R - AGACGGGATTGCATGAAAAG | | | |
| FCA 187[1,A] | B4 | di | 165–175 | F - CCAACTGAACCACCCAGG | FAM | | |
| | | | | R - TGGATGGTTGTATTCTTCCTCA | | | |
| FCA 080[1,A] | A3 | di | 224–236 | F - AAGCTCTCTGCATGTTTCTGC | NED | | |
| | | | | R - TGTAAGGCCCAAAAATCTGC | | | |
| FCA 249[1,A] | D3 | di | 101–119 | F - CCAGAAAGCTATGATTTGGAGA | VIC | | |
| | | | | R - ATCAATACCATTCTTTGCCCC | | | |

[1] Descripción original Menotti-Raymond et al. (1999); [2] Descripción original Menotti-Raymond et al. (2012). Descripción para gato montés: [A]Johnson et al. (1999); [B] Trigo et al. (2008).

**Caracterización de loci de microsatélites**

Los individuos fueron genotipados con el programa *GeneMarker*V2.4.0 *(SoftGenetics LLC®*). La matriz generada fue testeada para equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), desequilibrio de ligamiento y errores de genotipado. También se calculó el contenido de información polimórfica (PIC).

*Test de equilibrio de Hardy-Weinberg*

El equilibrio de HW establece que en una población, donde no existen fuerzas evolutivas actuando, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantendrán constantes de generación en generación. Este principio se basa en los supuestos de: herencia mendeliana, apareamiento al azar (panmixia) dentro de la población, efectos no significativos de migración (la población es un sistema "cerrado"), deriva (la población es infinitamente grande), o selección natural (Beebee & Rowe, 2008). Un apartamiento del equilibrio de HW indica que se están violando uno o más de estos supuestos. El análisis del equilibrio de HW sirve entonces como hipótesis nula, para la comprensión de los procesos que afectan a una población real sometida a diferentes fuerzas evolutivas (Cosse, 2010). La estructuración poblacional se traduce en un apartamiento del equilibrio de HW. La estructuración de interés para este trabajo es la debida a factores demográficos (apareamiento no al azar, deriva y migración) y no a la selección natural. Por ello hay que testear que los loci utilizados sean selectivamente neutros y que no estén ligados a genes sujetos a presión de selección, y por tanto se encuentren en equilibrio de HW.

Para evaluar si los diferentes loci cumplen con el equilibro de HW se utilizó el programa *GenePop* (Raymond & Rousset, 1995) el cual emplea algoritmos de Cadenas de Markov de Monte Carlo mediante el método descrito por Guo y Thomson (1992). En los casos con apartamiento del equilibrio se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

*Test de desequilibrio de ligamiento*

Las combinaciones alélicas encontradas pueden ser debidas al azar, si cada locus segrega de forma independiente, o pueden estar determinadas por patrones de ligamiento entre loci, en cuyo caso nos estarían brindando información redundante. Para que cada locus incluido en el análisis aporte información nueva debemos confirmar que no existe desequilibrio de ligamiento, o sea que la presencia de determinado alelo en un locus es independiente de cualquier alelo en otro locus (Rousset, 2008). El coeficiente de desequilibrio de ligamiento (D)

es una medida de asociación entre dos alelos de dos loci, si el resultado es significativo entonces existe desequilibrio de ligamiento y por tanto no segregan de forma independiente.
La existencia de desequilibrio de ligamiento fue testeada con el programa *GenePop* (Raymond & Rousset, 1995) mediante un test de $X^2$ entre pares de loci.

*Errores de genotipado*

Durante el genotipado pueden generarse errores en la asignación de genotipos por tartamudeo, pérdida de alelos y presencia de alelos nulos. El tartamudeo o *stuttering* refiere al deslizamiento de la ADN polimerasa durante la amplificación, un error que se vincula con la presencia de repetidos en tándem. Esto genera productos de amplificación que difieren del molde original por múltiplos de la longitud de unidad de repetición. Este proceso es más común en repetidos dinucleótidos y produce errores en la discriminación entre homo y heterocigotas por inclusión u omisión de alelos que difieren en una unidad repetida (Oosterhout et al., 2004). La pérdida de alelos (*allelic dropout*) puede deberse a un reducido número de copias del ADN molde, produciendo una amplificación de copias de baja calidad. En este escenario la amplificación de un alelo puede fallar de forma azarosa, y en general se pierde el alelo de mayor tamaño debido a la mayor eficiencia en la amplificación de alelos pequeños. Puede causar la asignación incorrecta de homocigotas, subestimando la heterocigosidad observada (Wang et al., 2012). Los alelos nulos se producen a partir de mutaciones en el sitio de unión del cebador, de manera que ciertos alelos tienen baja o nula eficiencia en la amplificación, generando falsos homocigotas y deficiencia en la frecuencia de determinados alelos (Selkoe & Toonen, 2006).
Tales errores de genotipado fueron evaluados con el programa *Micro-Checker* 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004).

*Contenido de información polimórfica (PIC)*

El contenido de información polimórfica (PIC) es una medida del grado de polimorfismo o información que nos brinda un locus o el conjunto de loci. Este índice se relaciona tanto con la cantidad de alelos, como con la distribución de frecuencias que éstos presentan para un locus en una población determinada. Valores superiores a 0,5 son considerados muy informativos, valores entre 0,5 y 0,25 medianamente informativos y valores inferiores a 0,25 poco informativos (Botstein et al., 1980).
Se estimaron los valores de PIC con el programa *Cervus* 3.0.3 (Marshall et al., 1998) para cada locus y el valor promedio para el conjunto de loci.

**Análisis de estructuración poblacional**

*Validación de la matriz de datos*

Las muestras utilizadas abarcan un amplio rango de años, incluyendo varias generaciones. El problema que puede generar la mezcla de generaciones es que las frecuencias alélicas varían no sólo en el espacio sino también en el tiempo (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Esto se vuelve especialmente problemático en poblaciones chicas o con altas tasas de recambio dadas por tiempos de vida cortos, o en casos donde han ocurrido episodios de evento fundador o cuellos de botella (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Sin embargo si se demuestra que la distribución de las frecuencias alélicas no han variado significativamente a lo largo del tiempo, estableciendo que no existen diferencias en este sentido entre los grupos muestrales, es viable utilizar las muestras en conjunto (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Cegelski et al., 2003).

Para testear que no hayan ocurrido variaciones en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo las muestras se agruparon en rangos temporales, considerando cantidad de años y número de individuos en cada rango. Para cada conjunto se compararon las frecuencias alélicas para cada locus de forma pareada entre conjuntos de años mediante un test de chi-cuadrado ($X^2$). También se calcularon las diferencias totales entre conjuntos. Esto se realizó con el programa *GenePop* (Raymond & Rousset, 1995) tratando cada conjunto como una población.

Además se calcularon los valores de Fis y Fst para cada conjunto con el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002), como otra forma de analizar si existen diferencias entre estos.

*Estructuración poblacional*

La matriz de datos de genotipos obtenidos para los distintos loci de microsatélites fue analizada con el programa *Structure* 2.3.2 (Pritchard et al., 2000), el cual no requiere la definición de grupos a priori. Este programa asume un modelo con K *clusters* o poblaciones, donde el valor de K puede ser desconocido. Cada *cluster* se caracteriza por un conjunto de frecuencias de alelos en cada locus, los individuos en la muestra serán asignados, con una probabilidad dada, a estos *clusters* o poblaciones. La asignación de los individuos a las poblaciones se basa en la premisa que dentro de las poblaciones los genotipos se encontrarán en equilibrio de HW y en equilibrio de ligamiento (Pritchard et al., 2000). Es decir que ajusta el modelo para un número de poblaciones (K) dado, cada una conteniendo un conjunto de individuos de forma tal que presenten el mínimo desequilibrio en relación a HW y ligamiento, el K seleccionado será aquel que minimice estos valores, entonces son los propios datos los que determinan el grado de estructuración. También permite la asignación conjunta de un individuo a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que existe mezcla. Utiliza un modelo de asignación Bayesiano basado en Cadenas de Monte Carlo-Markov (MCMC). Los

principales parámetros a definir para la simulación se describen a continuación: i) *Burn-in length,* número de simulaciones que serán descartadas antes de comenzar a recoger datos para minimizar el efecto de la configuración de partida. Se busca así garantizar que los valores finales sean independientes de los iniciales. ii) Número de MCMC, se establecen las simulaciones que serán efectuadas para la estimación de los parámetros, esto influirá en la precisión de dicha estimación. iii) K o número de *clusters* o poblaciones a ser testeados. iv) Número de iteraciones (réplicas) efectuadas para cada valor de K (Pritchard et al., 2010). La determinación del K más probable no siempre es claro u obvio, en especial en muestras con bajo grado de diferenciación. Se utilizaron las aproximaciones implementadas en el programa *Harvester Structure* (Earl & vonHoldt, 2012), donde el K más probable será aquel que presente el mayor valor de máxima verosimilitud con menor desvío estándar (Pritchard et al., 2000) y mayor delta K (ΔK, Evanno et al., 2005). Se tuvo en cuenta además la existencia de una interpretación biológica y espacial que soporte dichos agrupamientos (Pritchard et al., 2010).

Con la matriz de loci de microsatélites se efectuaron dos simulaciones configuradas con los siguientes parámetros:

(1) burn-inperiod: 10.000, réplicas MCMC: 20.000, K: 1 a 8, réplicas: 10.

(2) burn-inperiod: 100.000, réplicas MCMC: 200.000, K: 1 a 6, réplicas: 10

En ambos casos se utilizó la opción por defecto de modelo con "admixture", que admite la existencia de mezcla entre grupos (Pitchard et al., 2000).

Los resultados obtenidos del STRUCTURE fueron mapeados en un SIG, programa QGIS 2.16 (QGIS Development Team, 2016), representando la probabilidad de pertenecer a cada uno de los K testeados para cada individuo y cada localidad.

*Análisis factorial de correspondencia*

El análisis factorial de correspondencia (AFC) descompone la varianza en un espacio multidimensional e identifica los factores que más aportan a la misma (Navarro, 1983). Los individuos son vistos como una nube de puntos en un hiperespacio multi-dimensional, con los ejes que más aportan a la estructuración de los datos. Tiene por objeto extraer los principales factores de un gran conjunto de datos de difícil lectura, sin efectuar la formulación de un modelo causal que condicionaría la interpretación de los resultados (Navarro, 1983). Este es un análisis exploratorio que se encuadra en la estadística descriptiva multidimensional.

Este análisis fue efectuado con el programa GENETIX 4.05 (Belkhir et al., 2004) por individuos y por poblaciones en tres dimensiones a partir de la matriz de genotipos de microsatélites. En el análisis por individuos se espera visualizar que tan similares son los ejemplares pertenecientes

a los grupos previamente definidos. El análisis por poblaciones maximiza las diferencias calculando el valor promedio dentro de cada grupo definido como una población.

*Estadísticos F*

Se conocen como estadísticos F a los estimadores Fis, Fst y Fit, que en conjunto permiten interpretar cómo está distribuida la variación genética dentro y entre grupos (poblaciones y subpoblaciones), e inferir la existencia de estructuración poblacional (Wright, 1943; Wright, 1951;Beebee & Rowe, 2008). El Fis, también conocido como coeficiente de endogamia, evalúa el grado de endogamia de los individuos dentro de su subpoblación, esto es que exista un exceso de homocigotas en relación a lo esperado para el equilibrio de HW. Toma valores entre 1 (endogamia total) y -1 (exogamia), valores de cero indican panmixia o apareamiento al azar. El Fst o índice de fijación estima la divergencia en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones, varía entre 0 (no hay estructuración, son la misma población) y 1 (poblaciones totalmente separadas). Valores de Fst > 0,2 se considera que reflejan una fuerte estructuración, aunque valores inferiores también pueden ser significativamente distintos de cero (Beebee & Rowe, 2008). Fit evalúa cuánto se aleja una población global (integrada por múltiples subpoblaciones) del equilibrio de HW (Beebee & Rowe, 2008). Si bien estos estimadores fueron definidos para loci bialélicos su uso fue extendido para loci con múltiples alelos mediante los parámetros Gis, Gst y Git (Nei, 1977). En la actualidad los términos G y F son intercambiables (Allendorf & Luikart, 2007).

Se calcularon los estadísticos Fis y Fst con su significancia estadística con el programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002), y Fit con *GenePop* (Raymond & Rousset, 1995). Se calculan estos estadísticos tanto para cada localidad (Uruguay, Argentina y Brasil) como para los grupos genéticos detectados con *Structure*.

*Número de migrantes*

El número de migrantes (Nm) fue estimado a través de la proporción de alelos privados (Barton & Slatkin, 1986) efectuada con el programa *GenePop* (Raymond & Rousset, 1995). Se entiende por alelo privado aquel que se encuentra únicamente en una población.

Además se detectaron los migrantes de primera generación mediante el programa *GeneClass2* (Piry et al., 2004). Se utilizó el cálculo de probabilidad L = L_home/L_max que representa la relación entre la probabilidad de pertenecer a la población de donde proviene el individuo (L-home), sobre el valor de probabilidad más alta entre todas las muestras de poblaciones incluyendo aquella de dónde proviene el individuo (L-max) (Paetkau et al., 2004). Los recursos computacionales utilizados para el cálculo de probabilidad y para establecer que un individuo

fuera considerado residente o migrante siguen a Rennala & Mountain (1997), con 100.000 iteraciones.

*Aislamiento por distancia*

Para evaluar si existe aislamiento por distancia se realizó un test de Mantel (1967) entre matrices de distancia genética y de distancia geográfica para cada par de individuos. Con dicho test se evalúa si existe una correlación estadísticamente significativa ($p<0,05$) entre ambas matrices.

La distancia genética utilizada fue la estándar de Nei (1972, Ds), ya que es una de las distancias genéticas más utilizadas, ha demostrado ser adecuada para el análisis con microsatélites y no presenta un desempeño significativamente diferente al de otras distancias de amplio uso (Kalinowski, 2002; Takezaki & Nei, 2008; Chakraborty, 2010). La Ds tiene por objetivo medir el número de mutaciones por locus que han ocurrido después de la divergencia de las dos poblaciones en estudio (Nei, 1987). La distancia geográfica utilizada fue la distancia euclidiana que estima el recorrido más corto entre dos puntos.

La matriz de distancia genética fue calculada con el programa *Population* 1.2.32 (Langella, 1999). La matriz de distancia geográfica y test de Mantel se calcularon con el programa GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006, 2012).

## RESULTADOS

### Obtención de muestras y procedimientos de laboratorio

*Muestras, extracción y amplificación*

Se reunió un total de 172 muestras: 38 provenientes de la colección de tejidos y ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE, 61 muestras de tejido del MNHN, otras 34 muestras fueron incorporadas durante este proyecto, y 30 muestras de gato montés de Argentina y 9 de Brasil gracias a colaboraciones.

Las 34 muestras incorporadas durante este proyecto incluyen animales atropellados proporcionados por diversos colaboradores independientes, muestras enviadas por el cuerpo de guardaparques de Cabo Polonio, por los zoológicos Parque Lecocq y M'Bopicuá, y a colectas personales. Los encargados de los zoológicos aportaron muestras de sangre y/o pelos de animales nacidos en la naturaleza con localidad de procedencia conocida. Se contó además con muestras de animales atropellados proporcionadas por el proyecto "Impacto de rutas sobre la fauna de Uruguay" desarrollado por la ONG ECOBIO (http://impactorutasecobiouy.blogspot.com.uy) a partir del 2015. Este proyecto aportó 7 muestras de posibles gatos. Por técnicas moleculares se determinó que 3 correspondían a gato montés (incorporadas al set de datos), 2 a margay, 1 a gato doméstico y 1 no amplificó (posiblemente no se tratase de un felino). También se utilizaron dos fecas de gato montés del proyecto Juntos dejamos Huella realizado en colaboración con la ONG Vida Silvestre y con la Reserva Natural Salus.

Las 38 muestras del IIBCE más las 34 muestras adquiridas durante el transcurso de este proyecto incluyen cuero, pelos, sangre y fecas. El éxito de amplificación fue cercano al 50% para tejidos y menor al 30% para fecas. De estas 72 muestras, 33 presentaron una amplificación exitosa para la mayoría de los microsatélites, 15 corresponden a la colección anterior a este proyecto y 18 a las muestras adquiridas en su transcurso.

De la colección del MNHN, en una prueba piloto, no se lograron extracciones de ADN exitosas a partir de cráneos (huesos turbinales), por lo que la toma de muestras se concentró en las pieles (trozo de cuero o almohadilla plantar). Se realizaron aproximadamente 61 extracciones de pieles de las cuales sólo 16 pudieron ser incorporadas al set de muestras. El éxito de amplificación en este caso fue de 26%.

Las muestras de Argentina (provincias de Entre Ríos y Buenos Aires) provienen de colaboraciones con los Doctores Mariano Merino y Javier Pereira. Se contó con un total de 30 muestras de las cuales 12 amplificaron de forma exitosa.

De Brasil, Rio Grande do Sul, se obtuvieron 9 muestras de gato montés (ejemplares que no presentaban hibridación con *L. guttulus*) a través de una colaboración con las Doctoras Tatiane Trigo y Caroline Espinosa, todas amplificaron de forma exitosa.

Luego de realizar la confirmación de la especie y de obtener una amplificación positiva para la mayoría de los loci de microsatélites (sólo se mantuvieron en la matriz los individuos con más del 80% de loci genotipados), la matriz quedó conformada por 70 ejemplares: 49 de Uruguay, 12 de Argentina (provincias de Entre Ríos y Buenos Aires) y 9 de Brasil (Rio Grande do Sul). El conjunto abarca un amplio rango temporal, con muestras fechadas entre 1956 y el presente (2016) (Figura 4). Se cuenta con una buena cobertura del país, con muestras para todos los departamentos de Uruguay excepto Rivera, Tacuarembó y Río Negro (Figuras 8 y 11). Los datos de las muestras utilizadas se detallan en el Anexo I.

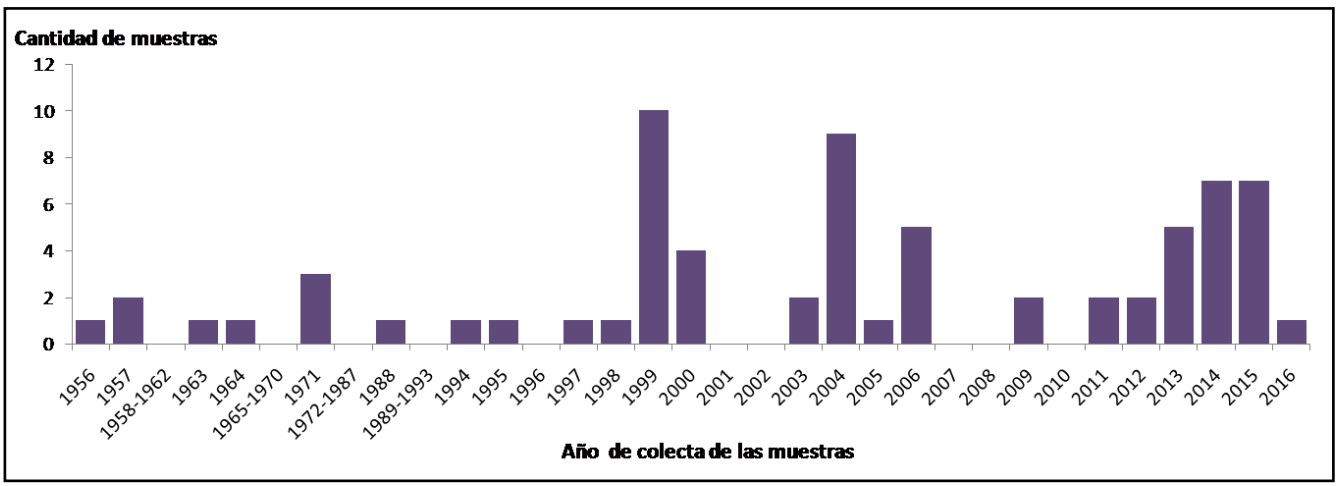


Figura 4. Cantidad de muestras por año de colecta que componen la matriz de datos utilizada para este trabajo.

*Determinación de la especie: Sonda TaqMan®*

Los cebadores diseñados para la amplificación de las sondas fueron los CAT156 F (5'-CCAGGACGACTAAAYCAAAC-3') y CAT 156 R (5'-CAGTATAGATGCAGATCATTTTTCA-3'), que amplifican un fragmento de 156 pb de la región de COII. Las sondas fueron:

- L.GEO_COII_PROBE (5'-CTCAAACCATAGCTTCATGCCCATTGT-3') con fluorocromo FAM para lectura en el canal verde, hibrida con secuencia blanco de gato montés *L. geoffroyi*;
- L.WII_COII_PROBE (5'-CTCAAACCACAGCTTCATGCCTATTGT-3') con fluorocromo HEX para lectura en canal amarillo, hibrida con secuencia blanco de margay *L. wiedii*; y
- F.CAT_COII_PROBE (5'-CTCAAACCATAGCTTCATACCCATTGTTCT-3') con fluorocromo CY5 para lectura en canal rojo, hibrida con secuencia blanco de gato doméstico *F. catus*.

Las sondas de gato montés y margay tienen 27 pb con dos diferencias: posición 10 y 22, con sustituciones T-C entre ambas especies; la de gato doméstico tiene 30 pb con polimorfismos en las posiciones 19 y 28 respecto a las otras especies, siendo en las posiciones 10 y 22 idéntico al gato montés (Figura 4). En relación a los polimorfismos observados en esta región en las otras especies de felinos presentes en el país, el gato de pajonal (*Leopardus braccatus*) presenta un haplotipo muy similar al del margay con una única diferencia en la posición siete (T en lugar de C), mientras el puma (*Puma concolor*) presenta un haplotipo bien diferenciado (Figura 5).

La especificidad de las sondas y el protocolo de amplificación fue puesto a punto con cuatro ejemplares de gato montés (*L. geoffroyi*), cuatro de margay (*L. wiedii*) y uno de gato doméstico (*F. catus*) (Figura 6). Posteriormente se realizó la asignación de 55 ejemplares de museo (45 Lg y 10Lw) con datos de especie conocidos. Cuatro no amplificaron, las restantes fueron todas correctamente asignadas aunque con variaciones en la eficacia de la amplificación, atribuidas a diferentes calidades de ADN. Pudieron clasificarse otras 30 muestras con información de origen dudosa de la especie. Se detectó un caso de una muestra con identificación de origen como gato de pajonal que resultó ser gato montés, dos originalmente identificadas como gato montés resultaron ser margay y gato doméstico respectivamente, y seis sin especie asignada pudieron ser determinadas como: gato montés (3), margay (2) y gato doméstico (1). En todos los casos la amplificación de la sonda de gato doméstico resultó menos eficiente.

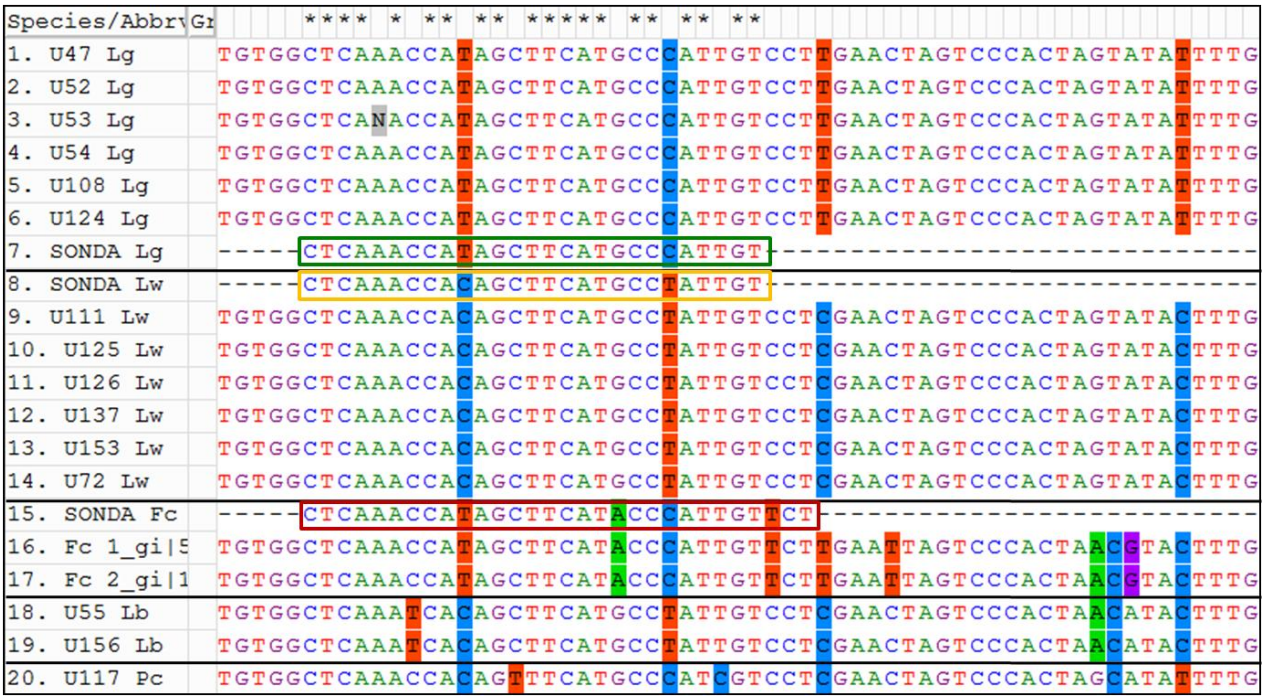


Figura 5. Alineamiento de secuencias de COII y sondas diseñadas. Lg: *Leopardus geoffroyi*, Lw: *Leopardus wiedii*, FC 1: gato doméstico *Felis catus* obtenido del GenBank NC_001700.1, FC 2: gato doméstico *Felis catus* obtenido del GenBank U20753.1, Pc: *Puma concolor*. Se marcan los polimorfismos que diferencian las especies y las sondas.

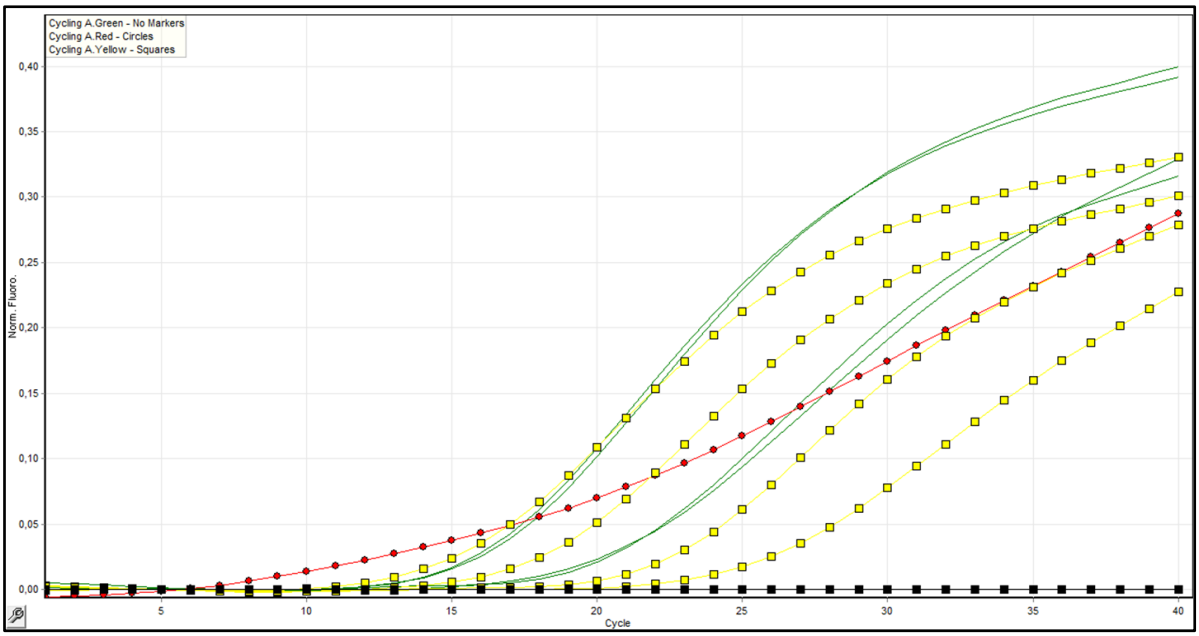


Figura 6. Curvas de amplificación en RTPCR con sondas TaqMan. El eje X muestra el número de ciclos y el eje Y la normalización en la ganancia de fluorescencia. Cada curva representa un individuo. El tipo de línea representa el canal en el cual se mide la ganancia de fluorescencia: línea sin marcador canal verde, cuatro ejemplares de gato montés; línea con cuadrados canal amarillo, cuatro ejemplares de margay; línea con círculos canal rojo, un ejemplar de gato doméstico. El color negro representa el control negativo.

*Sexaje*

La técnica de sexaje fue puesta a punto con cuatro individuos de sexo conocido, dos machos y dos hembras. Los machos de *L. geoffroyi* presentaron fragmentos de 192/195 pb y las hembras fueron homocigotas 195/195 pb (Figura 7, a-d). Se observó que el fragmento amplificado del cromosoma X presenta un éxito de amplificación mayor que el del cromosoma Y, en ocasiones siendo muy marcada la diferencia (Figura 7, e).

De los 70 ejemplares, en 62 se logró la amplificación y asignación del sexo. De estos 62 individuos sexados, 17 contaban con el sexo como dato de origen y fueron utilizados para evaluar el éxito de la técnica. Dos casos presentaron resultados contradictorios, de acuerdo al sexaje molecular fueron catalogados como hembras, siendo en realidad machos de acuerdo a los datos de origen. Ambas eran muestras de museo en las cuales probablemente ocurrió un fallo en la amplificación del alelo del cromosoma Y, ya que en muchas ocasiones el ADN de este tipo de muestras esta degradado o contiene productos utilizados durante la curaduría del ejemplar que pueden actuar como atenuantes o inhibidores en la reacción de PCR. Una de estas muestras pudo ser reamplificada y en este caso si dio un genotipo de macho, de la segunda muestra se había agotado el ADN por lo que no pudo ser reaplificada. Siete de los ocho ejemplares en los que no se logró amplificación tenían el sexo en sus datos de origen, por lo que sólo un ejemplar quedó sin esta información (Anexo I). La proporción de sexos macho/hembra obtenida fue de 2:1 (47 machos, 22 hembras y uno no asignado). La distribución espacial de las muestras por género se presenta en la figura 8.

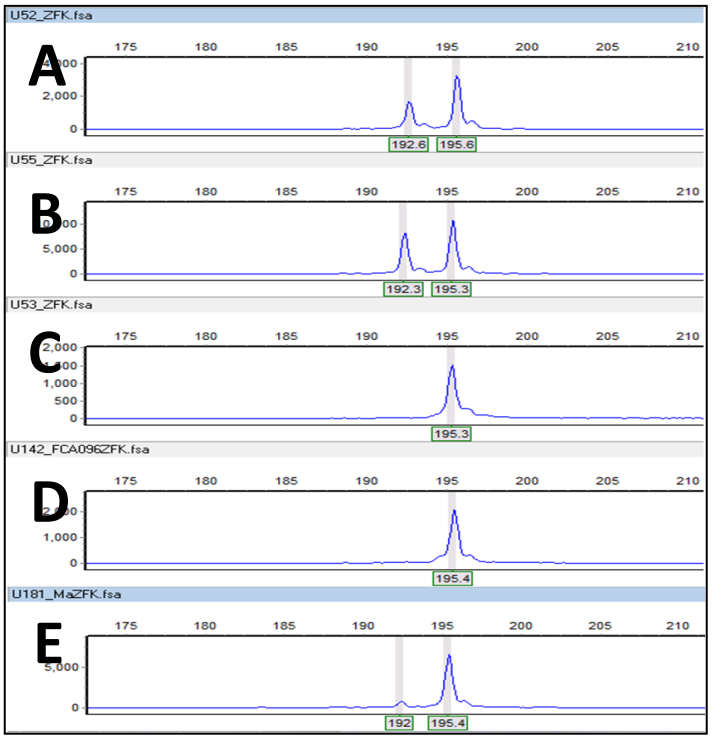


Figura 7. Análisis de fragmentos del gen que codifica para dedos de zinc en los cromosomas sexuales. (A, B) machos heterocigotas con fragmentos de 192/195pb; (C, D) hembras homocigotas 195/195pb; (E) macho con notoria reducción del éxito de amplificación del fragmento Y.

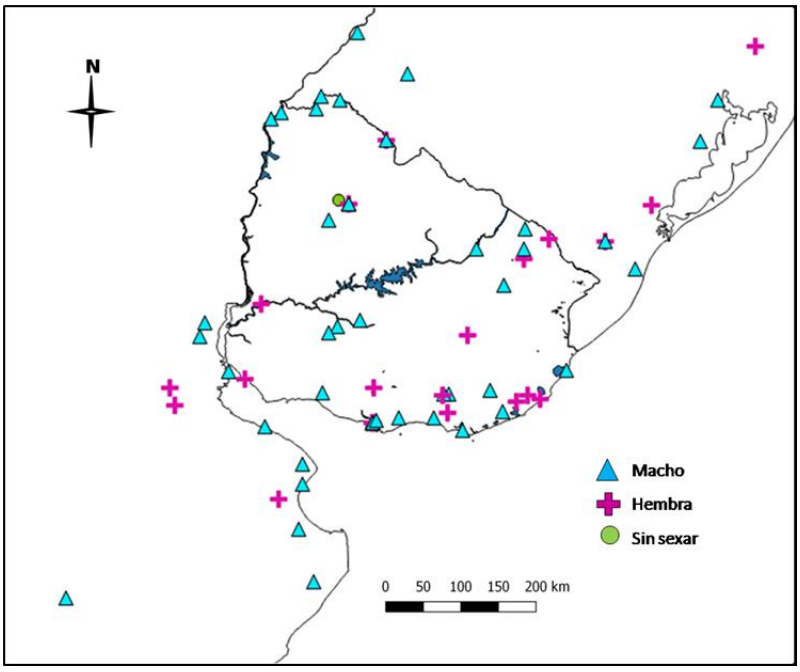


Figura 8. Distribución espacial de las muestras de gato montés *L. geoffroyi* discriminadas por género.

**Caracterización de loci de microsatélites**

De los 13 microsatélites testeados se utilizaron finalmente 11 loci. El locus FCA249 nunca presentó un buen patrón de amplificación, fue descartado al inicio sin llegar a integrar un multiplex. El locus FCA080 mostró un bajo éxito de amplificación (30% de las muestras) y presentó además escaso polimorfismo (4 alelos) por lo que fue excluido del análisis. Los genotipos por individuo para cada locus se detallan en el Anexo II. Un 15% de los genotipos homocigotas fueron reamplificados para testear si existió pérdida de alelos, en todos los casos el genotipo homocigota fue corroborado.

Evaluando el conjunto de muestras (70 ejemplares), cinco loci (FCA304, FCA096, FCA126, FCA124 y FCA424) se encontraron fuera del equilibrio de HW (p-valor<0,05) aún después de la corrección de Bonferroni (Tabla 2). La población también se encontró significativamente fuera del equilibrio. Se detectaron tres ligamientos pero sólo uno de ellos fue significativo después de la corrección de Bonferroni (FCA742/FCA043, 55 comparaciones, p<0,00091). El análisis de errores de genotipado indicó deficiencia de heterocigotos por posibles alelos nulos en tres loci (FCA304, FCA096 y FCA124), no hay evidencia de otros tipos de errores. Se calculó además el valor de Fis en cada locus, encontrándose que los valores más altos (entre 0,2 y 0,3) pertenecen a los últimos tres loci mencionados reflejando nuevamente este exceso de homocigotas o deficiencia de heterocigotas (Tabla 2). El Fis global fue de 0,093 indicando un leve apartamiento del apareamiento al azar. La heterocigosidad global esperada y observada fue 0,771 y 0,70 respectivamente (Tabla 2). Esta baja heterocigosidad observada respecto a la esperada concuerda con la deficiencia de heterocigotas encontrada en ciertos loci. Estos apartamientos del equilibrio de HW, deficiencia de heterocigotas y apartamiento del apareamiento al azar sugieren que la muestra puede estar compuesta por una mezcala de poblaciones (efecto Wahlund).

La media del Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue de 0,742, hallándose entre 6 y 22 alelos por locus, con un promedio de 11,18 (Tabla 2). Estos valores indican que el conjunto de microsatélites escogido tiene un grado de polimorfismo adecuado para realizar estudios de estructuración poblacional en gato montés.

Tabla 2. Resultados por locus del test de equilibrio de HW (P-val), cantidad de alelos por locus (k), número de muestras analizadas (N), tamaño de productos de PCR, heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), contenido de información polimórfica (PIC) y coeficiente de endogamia (Fis). Para los loci fuera del equilibrio de HW se presenta el P-valor corregido por Bonferroni, se resaltan en amarillo los loci que permanecen fuera del equilibrio y en gris los que originalmente estaban fuera de equilibrio pero dejaron de estarlo luego de la corrección. Finalmente de detalla el valor promedio para la heterocigosidad observada y esperada, PIC y Fis.

| Locus | P-val | k | N | Tamaño | Hobs | Hesp | PIC | Fis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FCA304 | 0 | 13 | 65 | 102-138 | 0,631 | 0,807 | 0,773 | 0,219 |
| FCA742 | 0,4282 | 15 | 69 | 099-155 | 0,797 | 0,859 | 0,836 | 0,072 |
| FCA096 | 0 | 22 | 54 | 178-228 | 0,648 | 0,928 | 0,914 | 0,304 |
| FCA124 | 0,02 | 8 | 70 | 171-201 | 0,614 | 0,756 | 0,715 | 0,188 |
| F42 | 0,0916 | 16 | 70 | 216-250 | 0,900 | 0,891 | 0,874 | -0,01 |
| FCA391 | 0,1767 | 10 | 68 | 201-239 | 0,662 | 0,760 | 0,724 | 0,13 |
| FCA126 | 0 | 8 | 70 | 118-132 | 0,743 | 0,791 | 0,764 | 0,061 |
| FCA424 | 0,02 | 6 | 70 | 168-182 | 0,343 | 0,373 | 0,355 | 0,081 |
| FCA146 | 0,3208 | 8 | 68 | 118-138 | 0,662 | 0,747 | 0,712 | 0,115 |
| FCA043 | 0,11 | 10 | 70 | 111-131 | 0,914 | 0,829 | 0,802 | -0,104 |
| FCA 187 | 0,8108 | 7 | 70 | 163-175 | 0,786 | 0,738 | 0,694 | -0,065 |
| Promedio | | | | | 0,700 | 0,771 | 0,742 | 0,093 |

**Análisis de la estructuración poblacional**

*Validación de la matriz de datos*

Se establecieron tres rangos temporales, dos en dónde se concentran el mayor número de muestras con una diferencia temporal menor a 10 años, y un tercer grupo conformado por muestras más antiguas y dispares. Los conjuntos temporales son: 2009 al 2016 (26 muestras), 1999 al 2006 (31 muestras) y 1956 a 1998 (13 muestras).

Los valores de Fis se apartan levemente de cero y son muy similares entre los grupos (~0,1), se observa un ligero aumento con el correr del tiempo, es decir un sutil aumento en la endogamia (Tabla 3). Los valores de Fst no muestran diferencias significativas en ninguno de los casos por lo que no hay señal de estructuración temporal en la muestra (Tabla 3).

El test de chi-cuadrado ($X^2$) por locus muestra que para la mayoría no hay diferencias significativas y sólo dos loci muestran diferencias en sus frecuencias alélicas entre períodos (Tabla 4). El locus FCA126 muestra diferencia significativa del conjunto 2009-2016 respecto a los otros dos períodos y FCA424 muestra diferencia significativa entre 1956-1998 y 1999-2006. Para los loci con diferencias significativas se aplicó la corrección de Bonferroni: 0,05/nro de comparaciones (Rice, 1989), en este caso el número de comparaciones coincide con el número de alelos que tiene cada locus, 6 y 8 respectivamente por lo que el nuevo alfa es ~0,01 para ambos. Luego de la corrección sólo las frecuencias de FCA126 entre 1956-1998 y 2009-2016 muestran una diferencia estadísticamente significativa.

La comparación global entre conjuntos no muestra diferencia significativa en ningún caso, aunque la comparación entre 1956-1998 y 2009-2016, es decir el rango temporal más antiguo contra el más actual, esta apenas por arriba del límite de significancia estadística (Tabla 5). Este resultado junto con el leve aumento en el valor de Fis sugieren que podría estar dándose alguna variación a lo largo del tiempo pero esta no es significativa aún.

El resultado general del test de $X^2$ está en línea con los resultados del Fst, sugiriendo que no existe variación en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo siendo válido utilizar este set de datos en su conjunto.

Tabla 3. Valores de Fis y Fst por rangos temporales. La segunda sección de la tabla muestra el valor de Fst en la mitad superior de la diagonal y su significancia estadística P-valor en la mitad inferior.

| | 1956-1998 | 1999-2006 | 2009-2016 |
|---|---|---|---|
| Fis | 0,083 | 0,093 | 0,099 |

| P-valor\Fst | 1956-1998 | 1999-2006 | 2009-2016 |
|---|---|---|---|
| 1956-1998 | 0 | -0,0056 | 0,0004 |
| 1999-2006 | 0,64 | 0 | -0,0009 |
| 2009-2016 | 0,11 | 0,51 | 0 |

Tabla 4. Test de chi-cuadrado de las frecuencias alélicas entre rangos temporales por locus. Para cada locus se presentan los grupos comparados y el p-valor resultante. Se resaltan en gris los casos con diferencias significativas antes de la corrección de Bonferroni y sin diferencias luego de la misma, y en amarillo casos que permanecen con diferencias significativas aún luego de la corrección.

| Locus | Grupos comparados | P-valor |
|---|---|---|
| FCA304 | 1999-2006/1956-1998 | 0,63017 |
| FCA304 | 2009-2016/1956-1998 | 0,22486 |
| FCA304 | 2009-2016/1999-2006 | 0,44850 |
| FCA742 | 1999-2006/1956-1998 | 0,12250 |
| FCA742 | 2009-2016/1956-1998 | 0,79535 |
| FCA742 | 2009-2016/1999-2006 | 0,53139 |
| FCA096 | 1999-2006/1956-1998 | 0,29250 |
| FCA096 | 2009-2016/1956-1998 | 0,25525 |
| FCA096 | 2009-2016/1999-2006 | 0,19639 |
| FCA124 | 1999-2006/1956-1998 | 0,64774 |
| FCA124 | 2009-2016/1956-1998 | 0,86849 |
| FCA124 | 2009-2016/1999-2006 | 0,31445 |
| F42 | 1999-2006/1956-1998 | 0,33368 |
| F42 | 2009-2016/1956-1998 | 0,57816 |
| F42 | 2009-2016/1999-2006 | 0,88925 |
| FCA391 | 1999-2006/1956-1998 | 0,34895 |
| FCA391 | 2009-2016/1956-1998 | 0,22887 |
| FCA391 | 2009-2016/1999-2006 | 0,50717 |
| FCA126 | 1999-2006/1956-1998 | 0,36769 |
| FCA126 | 2009-2016/1956-1998 | 0,00196 |
| FCA126 | 2009-2016/1999-2006 | 0,01077 |
| FCA424 | 1999-2006/1956-1998 | 0,03809 |
| FCA424 | 2009-2016/1956-1998 | 0,06798 |
| FCA424 | 2009-2016/1999-2006 | 0,33895 |
| FCA146 | 1999-2006/1956-1998 | 0,80686 |
| FCA146 | 2009-2016/1956-1998 | 0,15881 |
| FCA146 | 2009-2016/1999-2006 | 0,44944 |
| FCA043 | 1999-2006/1956-1998 | 0,81994 |
| FCA043 | 2009-2016/1956-1998 | 0,51249 |
| FCA043 | 2009-2016/1999-2006 | 0,23333 |
| FCA187 | 1999-2006/1956-1998 | 0,88445 |
| FCA187 | 2009-2016/1956-1998 | 0,82315 |
| FCA187 | 2009-2016/1999-2006 | 0,87902 |

Tabla 5. Test de chi-cuadrado global de las frecuencias alélicas entre rangos temporales. Se muestran los grupos comparados, el valor del test ($X^2$), los grados de libertad (g) y el p-valor.

| Comparación de grupos | $X^2$ | g | P-valor |
|---|---|---|---|
| 1956-1998/1999-2006 | 22,35921 | 22 | 0,438632 |
| 1956-1998/2009-2016 | 33,75352 | 22 | 0,052032 |
| 1999-2006/2009-2016 | 26,02374 | 22 | 0,250664 |

*Estructuración poblacional*

Se analizaron los valores de máxima verosimilitud y delta K implementados en el programa *Harvester Structure*. El K más probable será aquel que presente el mayor valor de máxima verosimilitud con menor desvío estándar, y mayor ΔK. De acuerdo a estos índices el número de grupos más probable es K=3 para la primera simulación y K=2 para la segunda (Figura 9).

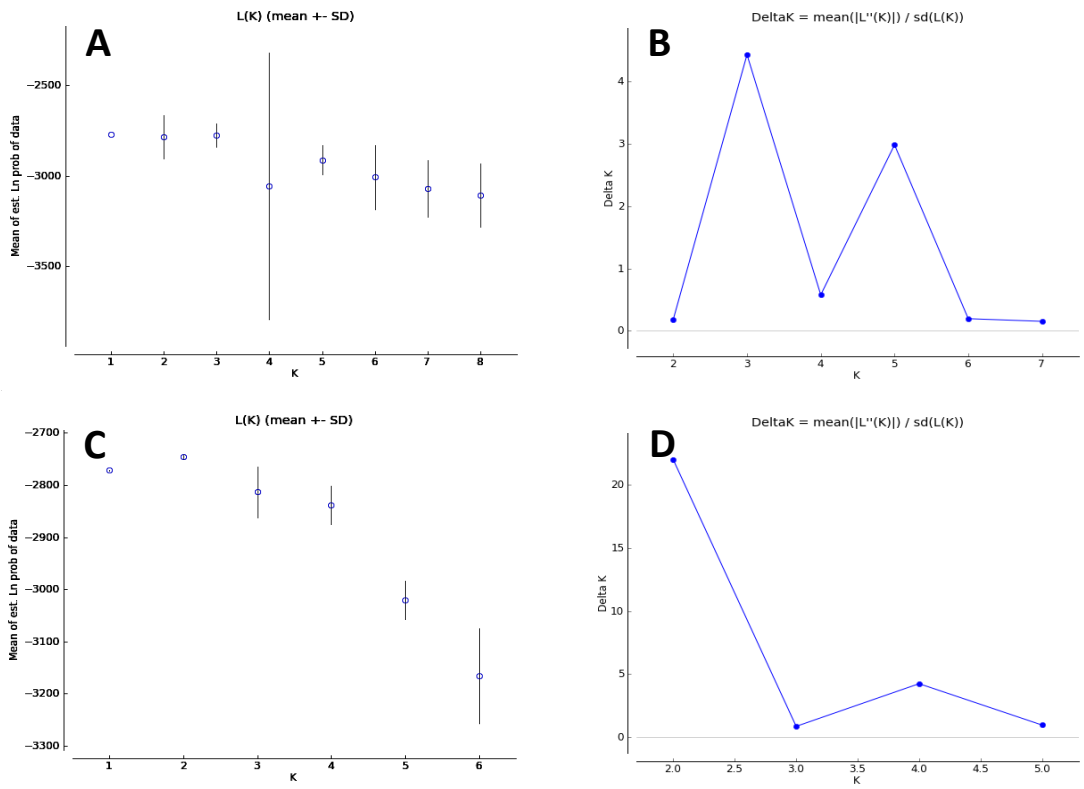


Figura 9. Gráficos del Logaritmo neperiano de máxima verosimilitud con su desvío estándar (L(K)(mean+-SD) para cada uno de los K grupos: A. simulación uno, C. simulación dos. Gráficos de Delta k: B. simulación uno, D. simulación dos.

Para ambas simulaciones, más allá de los índices de máxima verosimilitud y delta K que fueron distintos, se obtuvieron resultados similares en relación a la probabilidad de cada individuo de pertenecer a los distintos grupos detectados tanto para K=2 como para K=3 (Figura 10). Estos resultados fueron incorporados a un SIG y mapeados en el territorio (Figura 11).En el escenario de dos grupos se observa una correspondencia geográfica clara, donde las muestras de Argentina conforman un grupo genético (en adelante Ar) representado por el color verde, mientras las muestras de Uruguay y Brasil serían otro grupo (en adelante UyBr) representado por el color rojo, con mucha mezcla con el componente genético representado por el color

verde. Para K=3 lo que se ve es un nuevo grupo genético en el conjunto Uruguay-Brasil, pero en este caso no se observa una correspondencia geográfica clara. En los gráficos de tortas por localidad de colecta se aprecia como las muestras de Argentina tienen una identidad genética diferenciada, conformada en su mayoría por el componente genético representado por el color verde, mientras que en las de Uruguay y Brasil existe mezcla de dos o tres componentes genéticos.

En una perspectiva más conservadora se repitieron las simulaciones sólo con las muestras de 1999 al 2016 (se excluyen las 13 muestras del grupo 1956-1998) obteniéndose los mismos resultados.

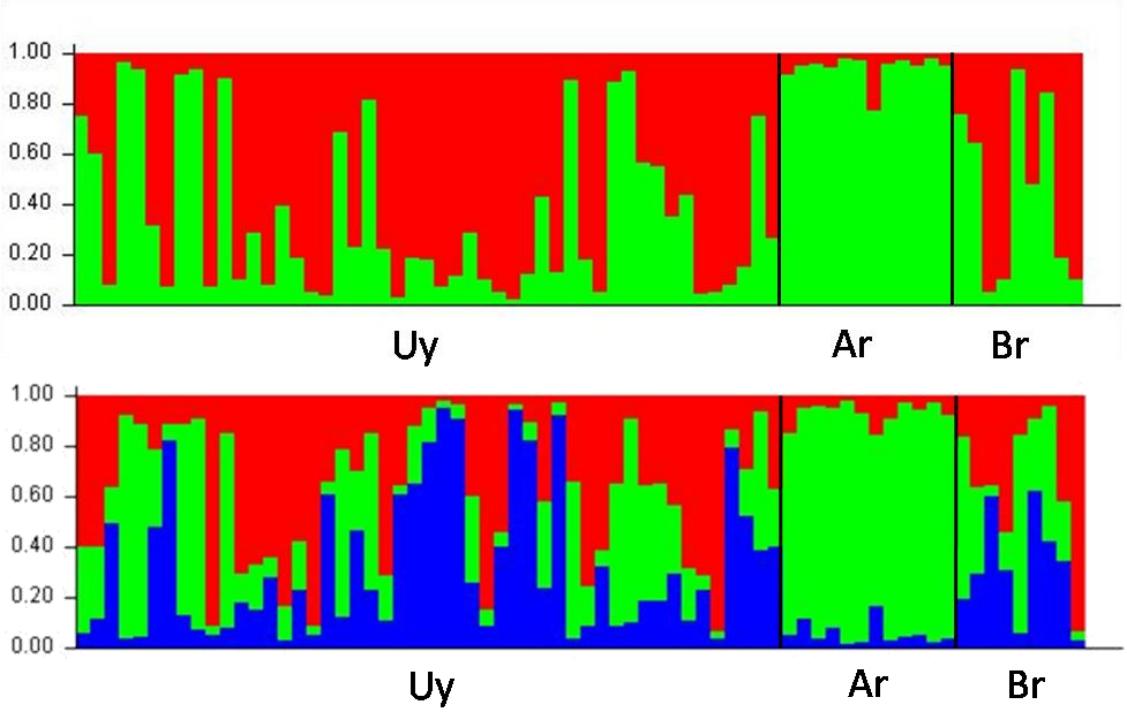


Figura 10. Gráficos obtenidos con el programa *Structure* para K=2 (superior) y K=3 (inferior). Cada individuo está representado por una barra. Los colores que componen cada barra representan la probabilidad de que ese individuo pertenezca a cada uno de los *cluster* (verde, rojo, azul) considerado. Con líneas negras se separan las localidades: 49 individuos de Uruguay (Uy), 12 de Argentina (Ar) y 9 de Brasil (Br).

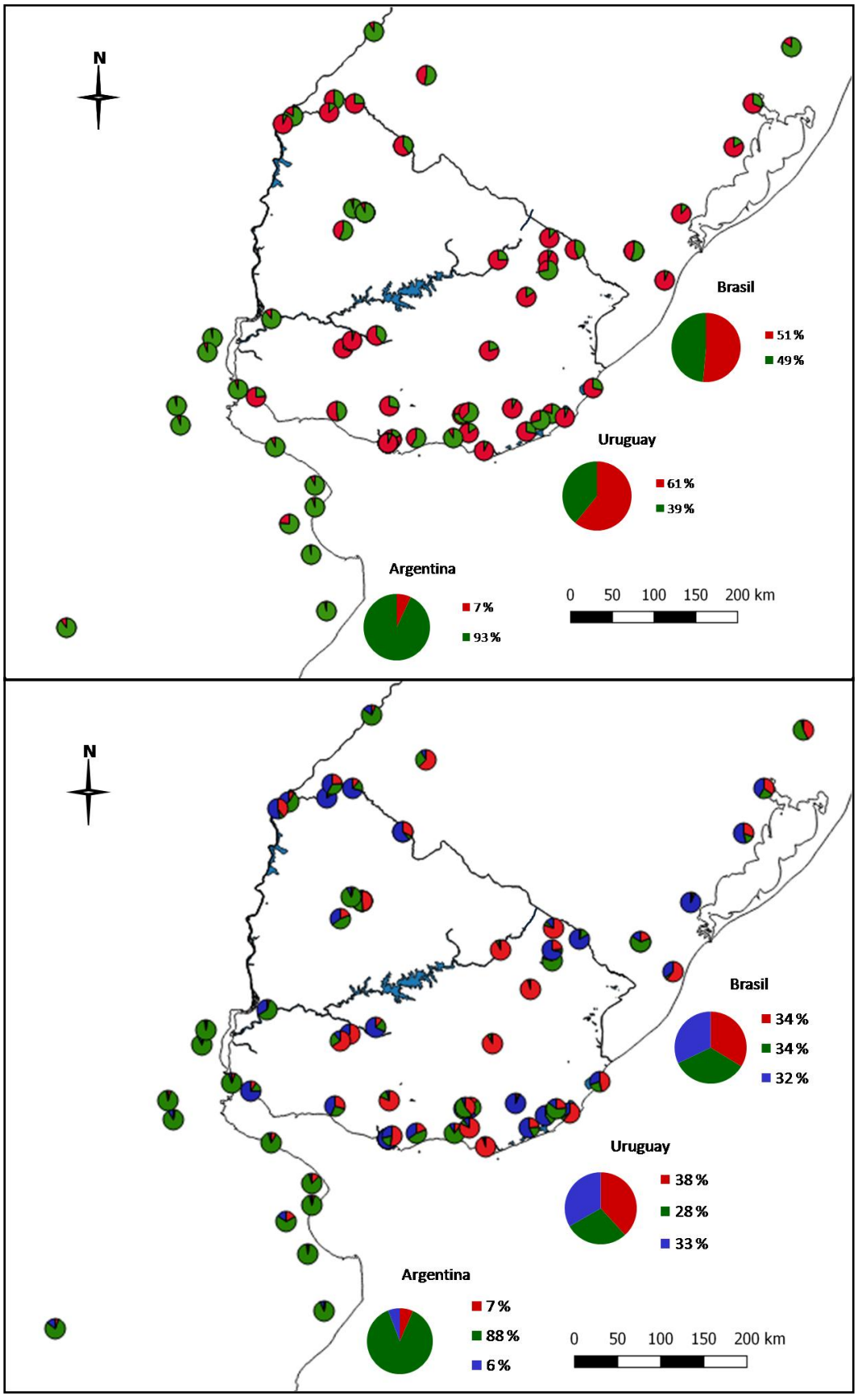


Figura 11. Proporción de los componentes genéticos identificados con el programa *Structure* para cada individuo de la muestra y por país. K=2 (superior), K=3 (inferior).

Por otro lado se realizaron simulaciones considerando únicamente las muestras de Uruguay. En este caso no se encontró estructuración, el K más probable es 1. En la Figura 12 se muestra un ejemplo del análisis de esta población considerando la existencia de K=2. En este caso todos los individuos tienen igual probabilidad de pertenecer a uno u otro *cluster*. En el gráfico de máxima verosimilitud el valor con menor desvío estándar es 1. Mientras que el gráfico de delta k no admite cálculos para k<2.

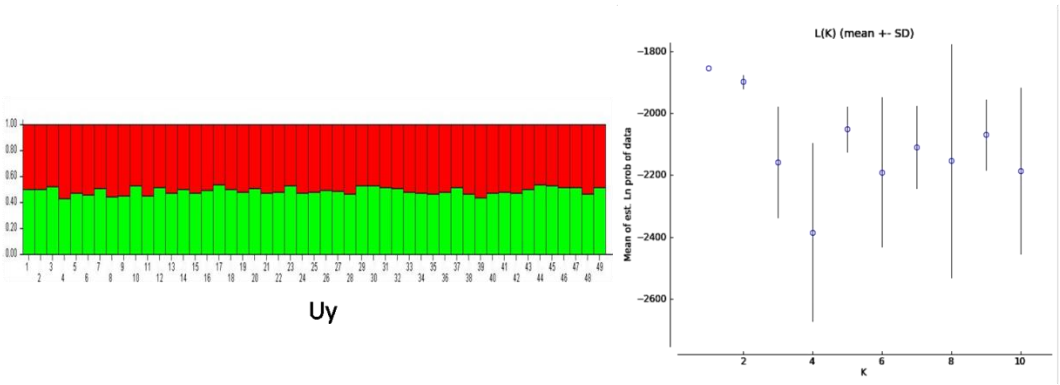


Figura 12. Simulación con el programa *Structure* sólo para las muestras de Uruguay. Gráfico para K=2 (izquierda) y gráficos del logaritmo neperiano de máxima verosimilitud con su desvío estándar (L(K)(mean+-SD) para cada uno de los k grupos (derecha).

*Análisis factorial de correspondencia (AFC)*

En el AFC realizado con los individuos se observa como las muestras de Uruguay y Brasil se encuentran en una única nube de puntos, mientras que los de Argentina aparecen levemente diferenciados (Figura 13A). El primer, segundo y tercer eje contribuyen a la varianza total en un 4,63%, 4,11% y 3,84% respectivamente. En el AFC por poblaciones el eje uno explica el 65,48% de la varianza y separa la población Argentina de las de Uruguay y Brasil, mientras el segundo eje explica el restante 34,52% de la varianza y separa las dos últimas (Figura 13B).

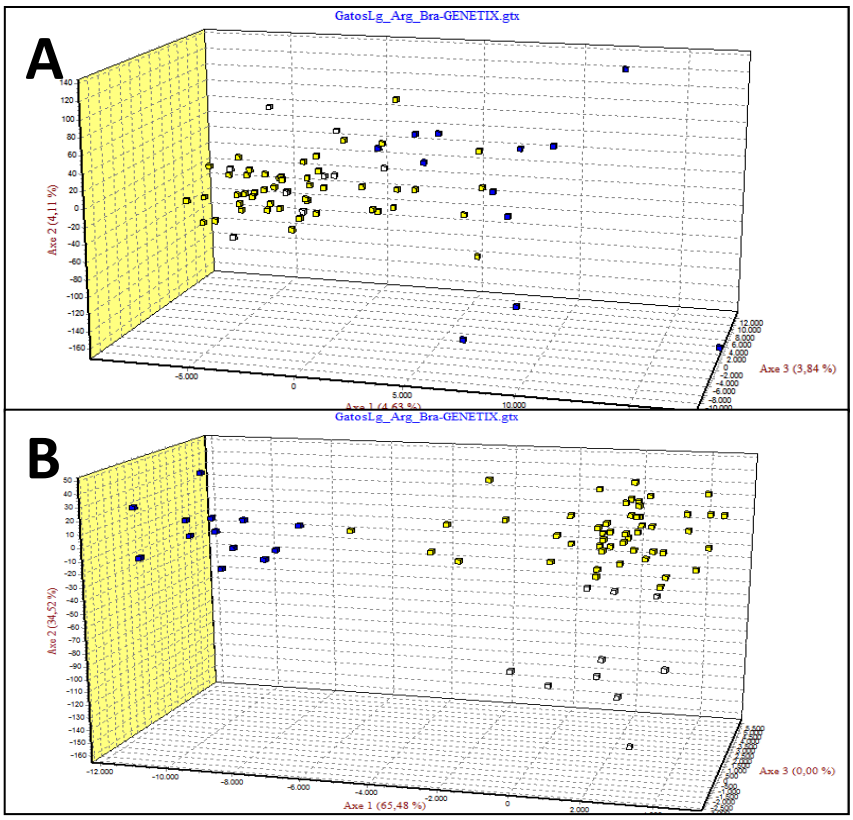


Figura 13. Gráfico en tres dimensiones del análisis factorial de correspondencia (AFC). A. Por individuos. B. Por poblaciones. Símbolos amarillos=Uruguay, símbolos azules=Argentina y símbolos blancos=Brasil.

*Caracterización de loci de microsatélites en cada grupo*

Se caracterizan los loci de microsatélites esta vez para cada uno de los grupos establecidos con el método Bayesiano *Structure* para K=2 (UyBr, Ar).

En el grupo UyBr (Tabla 6) cinco loci se encontraban fuera del equilibrio de HW, pero sólo tres permanecen luego de la corrección de Bonferroni (FCA304, FCA096, FCA126). La población también se encontró fuera del equilibrio. Se detectó un desequilibrio de ligamiento significativo aún después de la corrección de Bonferroni, de los loci F42/FCA043. Se detectó deficiencia de heterocigotas por posibles alelos nulos en tres loci (FCA304, FCA096, FCA124). El número promedio de alelos por locus fue 9,91 en un rango de 6 a 21 alelos. El PIC global fue 0,728 y la heterocigosidad promedio observada y esperada fue 0,697-0,759 respectivamente. Los valores de Fis van de 0,005 a 0,324. Este grupo está conformado por 58 muestras.

El grupo Ar (Tabla 7), con sólo 12 ejemplares, no presentó loci fuera del equilibrio de HW luego de la corrección de Bonferroni, ni loci en desequilibrio de ligamiento. La población también se encontró en equilibrio. Se detectó un locus con probabilidad de alelos nulos (FCA391). El número promedio de alelos por locus fue de 7, con un mínimo de 2 y máximo de 12 alelos. El valor de PIC y la heterocigosidad promedio observada y esperada fueron de: 0,7, 0,71 y 0,77 respectivamente. Los valores de Fis oscilan entre cero y 0,46.

Tabla 6. Grupo UyBr. Para cada locus se detalla la probabilidad (P-val) para el test de equilibrio de HW; para los loci fuera de equilibrio se presenta el valor corregido por Bonferroni. Se resaltan en amarillo los loci que permanecen fuera del equilibrio y en gris los que originalmente estaban fuera de equilibrio pero dejaron de estarlo luego de la corrección. Se muestran también la cantidad de alelos por locus (k), número de muestras analizadas (N), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), contenido de información polimórfica (PIC) y coeficiente de endogamia (Fis).

| | UyBr | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | P-val | k | N | Hobs | Hesp | PIC | Fis |
| FCA304 | 0,0001 | 11 | 53 | 0,604 | 0,8 | 0,765 | 0,247 |
| FCA742 | 0,2954 | 11 | 57 | 0,772 | 0,843 | 0,815 | 0,085 |
| FCA096 | 0,0002 | 21 | 45 | 0,622 | 0,917 | 0,9 | 0,324 |
| FCA124 | 0,1975 | 6 | 58 | 0,586 | 0,711 | 0,665 | 0,177 |
| F42 | 0,6724 | 12 | 58 | 0,914 | 0,878 | 0,857 | -0,041 |
| FCA391 | 0,4313 | 10 | 56 | 0,732 | 0,785 | 0,749 | 0,068 |
| FCA126 | 0,0385 | 8 | 58 | 0,741 | 0,745 | 0,715 | 0,005 |
| FCA424 | 0,0568 | 6 | 58 | 0,328 | 0,374 | 0,353 | 0,124 |
| FCA146 | 0,2939 | 8 | 56 | 0,679 | 0,741 | 0,705 | 0,085 |
| FCA043 | 0,0578 | 9 | 58 | 0,914 | 0,818 | 0,789 | -0,118 |
| FCA187 | 0,8998 | 7 | 58 | 0,776 | 0,743 | 0,699 | -0,044 |

Tabla 7. Grupo Ar. Para cada locus se detalla la probabilidad (P-val) para el test de equilibrio de HW, para los loci fuera de equilibrio se presenta el valor corregido por Bonferroni. Se resaltan en gris un locus que originalmente estaba fuera de equilibrio pero dejó de estarlo luego de la corrección. Se muestran también la cantidad de alelos por locus (k), número de muestras analizadas (N), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), contenido de información polimórfica (PIC) y coeficiente de endogamia (Fis).

| | Ar | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | P-val | k | N | Hobs | Hesp | PIC | Fis |
| FCA304 | 0,6566 | 8 | 12 | 0,75 | 0,786 | 0,718 | 0,048 |
| FCA742 | 0,9061 | 12 | 12 | 0,917 | 0,917 | 0,868 | 0 |
| FCA096 | 0,3048 | 10 | 9 | 0,778 | 0,922 | 0,857 | 0,164 |
| FCA124 | 0,2630 | 7 | 12 | 0,75 | 0,819 | 0,755 | 0,088 |
| F42 | 0,0899 | 11 | 12 | 0,833 | 0,888 | 0,836 | 0,064 |
| FCA391 | 0,0800 | 4 | 12 | 0,333 | 0,605 | 0,523 | 0,46 |
| FCA126 | 0,1162 | 7 | 12 | 0,75 | 0,841 | 0,779 | 0,112 |
| FCA424 | 10000 | 2 | 12 | 0,417 | 0,344 | 0,275 | -0,222 |
| FCA146 | 0,4275 | 4 | 12 | 0,583 | 0,757 | 0,677 | 0,238 |
| FCA043 | 0,0795 | 7 | 12 | 0,917 | 0,815 | 0,751 | -0,131 |
| FCA187 | 0,4680 | 5 | 12 | 0,833 | 0,739 | 0,661 | -0,134 |

*Estadísticos F*

Se calculan estos estadísticos tanto para cada localidad (Uruguay, Argentina y Brasil) como para los grupos genéticos detectados con *Structure* (Tabla 8). Los valores de Fis para las tres localidades fueron ~0,1. Los valores de Fst para Ur/Ar y Br/Ar fueron 0,0447 y 0,0342 respectivamente, con p-valor<0,01, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones. El Fst entre Uy/Br=0,0079 con p-valor=0,2, por tanto no existe diferencia significativa entre estas poblaciones. El índice de endogamia global fue Fit=0,1002. El valor de Fst para los dos grupos genéticos definidos con *Structure* fue $Fst_{UyBr/Ar}$=0,042 con p-valor=0,001, y el Fis para el grupo UyBr fue 0,083.

Tabla 8. Valores de los estadísticos F. Coeficiente de endogamia (Fis) por localidad. Índice de fijación (Fst) en la sección superior de la diagonal y significancia estadística P-valor en la sección inferior. Coeficiente de endogamia global (Fit).

| | Uy | Ar | Br |
|---|---|---|---|
| **Fis** | 0,081 | 0,071 | 0,081 |
| **P-valor\Fst** | Uy | Ar | Br |
| Uy | 0 | 0,0447 | 0,0079 |
| Ar | 0,00333 | 0 | 0,0342 |
| Br | 0,20667 | 0,00333 | 0 |
| **Fit** | | 0,1002 | |

*Número de migrantes*

El número de migrantes por generación (Nm) entre los grupos definidos para K=2 fue de $Nm_{UyBr/Ar} = 1,83$.

Se identificaron cuatro migrantes de primera generación, todos del grupo Ar al grupo UyBr: U47, U48, U142, U152 (Tabla 9). Dos son machos, una hembra y el restante no tiene información del sexo. Los años de colecta de estos migrantes son variables, con al menos un representante de cada rango temporal. La ubicación espacial de los migrantes se presenta en la figura 14.

Tabla 9. Migrantes de primera generación identificados con el programa *GeneClass2*. Para cada individuo identificado como migrante se detalla la probabilidad de ser residente (<0,05 no es residente=migrante), la localidad a la cual pertenece la muestra (Hogar), la localidad más probable de la cual proviene ese migrante (Población de origen), el sexo del especímen (M=macho, H=hembra) y el año de colecta de la muestra.

| Migrantes | Probabilidad | Hogar | Población de origen | Sexo | Año |
|---|---|---|---|---|---|
| U47 | 0,00900 | UyBr | Ar | Sin sexar | 2004 |
| U48 | 0,00000 | UyBr | Ar | M | 2004 |
| U142 | 0,00270 | UyBr | Ar | H | 1971 |
| U152 | 0,00860 | UyBr | Ar | M | 2013 |

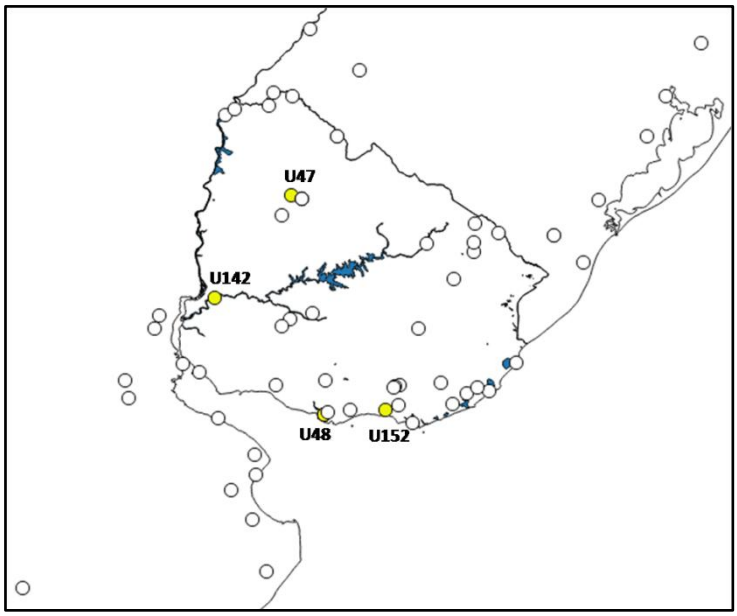


Figura 14. Ubicación espacial de los migrantes de primera generación.

*Aislamiento por distancia*

El Test de Mantel entre la matriz de distancia genética estándar (Ds) y la matriz de distancia geográfica euclidiana se realizó para el conjunto (muestras de Uruguay, Argentina y Brasil), para los dos grupos identificados con *Structure* (UyBr y Arg) y para las muestras de Uruguay y Brasil por separado.

Para el conjunto de datos se observó una leve relación positiva estadísticamente significativa (p=0,012, r=0,109) (Figura 15A). Para el grupo UyBr y cuando se analizan sólo las muestras de Uruguay no se detecta una señal significativa de aislamiento por distancia (p>0,05) (Figura 15 B y D). Al analizar las muestras de Argentina y Brasil por separado sí se obtiene una relación positiva estadísticamente significativa (p<0,05; r ~0,4) (Figura 15C y E).

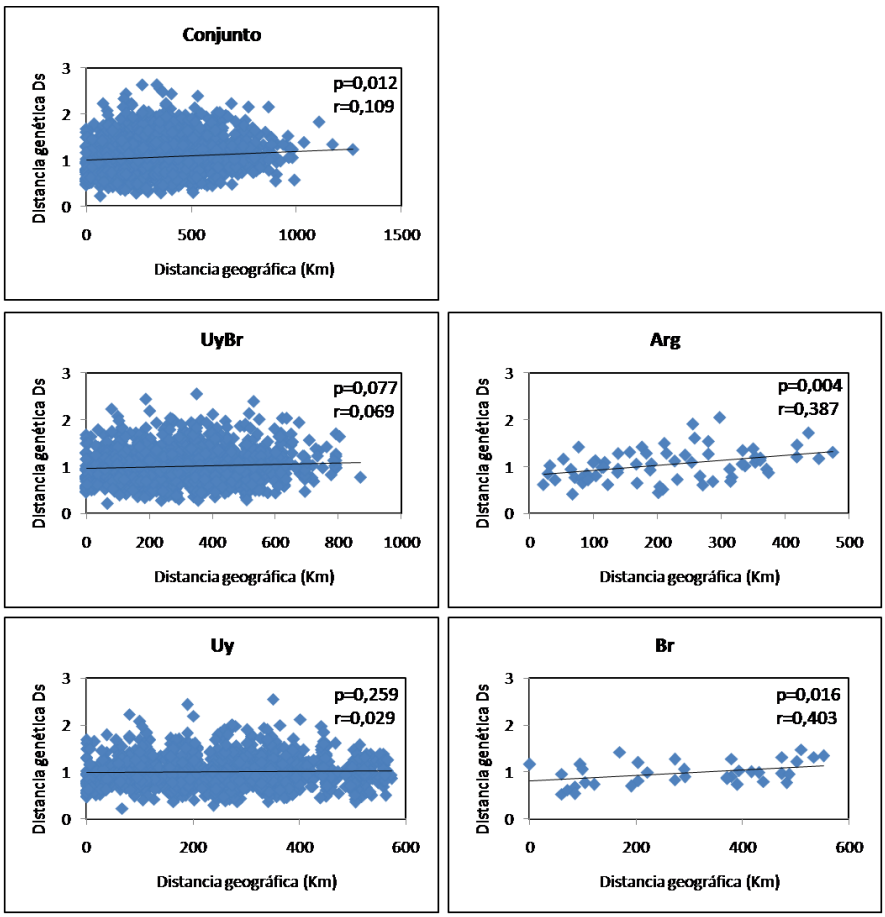


Figura 15. Diagrama de dispersión del test de Mantel efectuado entre la matriz de distancia genética estándar (Ds) y la matriz de distancia geográfica euclidiana, realizado para: A. el conjunto de datos. B. grupo Uruguay-Brasil (UyBr). C. grupo Argentina (Arg). D. sólo muestras de Uruguay (Uy). E. sólo muestras de Brasil (Br).

## DISCUSIÓN

### Muestras

La obtención de muestras para análisis genéticos puede ser un desafío, en especial en especies como los carnívoros debido a sus características ecológicas y conductuales: bajas densidades poblacionales, extensos ámbitos de hogar, comportamiento territorial, hábitos esquivos, tiempos de vida largos y solapamiento generacional (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Sunquist & Sunquist, 2002; Schewart & McKelvey, 2009). En este caso, luego de más de dos años de muestreo se logró reunir alrededor de 150 muestras. El éxito promedio de extracción de ADN y amplificación de los marcadores genéticos fue cercano al 50%, trabajando finalmente con una matriz de 70 muestras de gato montés. La distribución espacial dentro de Uruguay está un tanto sesgada al sur del país. Esto puede ser explicado por el tipo de muestreo llevado a cabo. Los registros oportunistas (animales atropellados, llevados a zoológicos o cazados) dependen de eventos de interacción entre la especie y el humano, y al ser el Sur del país el área con mayor densidad de población es esperable que la mayoría de las muestras provengan de allí. Las muestras más antiguas son las del Norte del país (Artigas) debido a que no se consiguieron registros nuevos por lo que hubo que recurrir enteramente a las colecciones biológicas del MNHN. No se consiguió ningún registro para los departamentos de Rivera, Paysandú y Río Negro, y este vacío se extiende a los países vecinos dónde el Noroeste y Noreste son áreas carentes de muestras. Respecto al rango temporal, abarcan una distribución discontinua entre 1956 y el 2016, con tres períodos destacados: 1999 conformado principalmente por muestras de Argentina, 2004 y 2014-2015 principalmente con muestras de Uruguay (Figura 4). El set de datos abarca un período de 60 años considerando de 1956 al 2016 y de 17 si tomamos en cuenta sólo de 1999 en adelante. Existen antecedentes de trabajos en carnívoros que utilizan muestras colectadas a lo largo de 11 y 22 años (Cegelski et al., 2003; Mannise, 2013). A pesar de ser un rango temporal muy amplio no se detectaron cambios significativos en las frecuencias alélicas, ni para la mayoría de loci (Tabla 4) ni entre grupos por años (Tabla 5), tampoco hay diferencias de acuerdo a los valores de Fst (Tablas 3). Un locus presenta diferencia significativa en las frecuencias alélicas entre los grupos más distantes (1956-1998/2009-2016) y la comparación global entre estos grupos se encuentra al límite de significancia estadística, además de observarse un leve aumento en el valor de Fis desde el grupo más antiguo al más actual. Estos son indicios de que posiblemente exista algo de variación a lo largo del tiempo, pero gradual y muy leve. Por ello se considera que a pesar del amplio rango temporal, es adecuado utilizar este set de datos para análisis de estructura poblacional.

La dificultad en la obtención de muestras es una problemática recurrente en el país que pone de manifiesto dos aspectos importantes: (1) La necesidad de establecer una red de colaboradores descentralizada en la toma de muestras, intercambio de información y colaboración con proyectos de investigación, con participación activa de instituciones relacionadas a la fauna o medio ambiente (SNAP, Zoológicos, Dependencias de la Universidad) y de la población en general; (2) el valor que representan las colecciones biológicas para el país y el desarrollo de investigación a nivel nacional e internacional, así como la relevancia de mantenerlas en buen estado y actualizadas.

Durante el transcurso de la tesis se desarrollaron dos nuevas herramientas para el trabajo genético con muestras de felinos. Sondas TaqMan® para una rápida y precisa identificación de dos especies de felinos silvestres neotropicales: gato montés (*L. geoffroyi*) y margay (*L. wiedii*). Se generó además la sonda para gato doméstico (*F. catus*) y de forma teórica una sonda para gato de pajonal (*L. braccatus*) que aún no fue testeada. La segunda es una técnica de sexaje, que se basa en la adición de un fluorocromo al cebador *forward* y corrida en microcapilar. Esta última puede tener un cierto margen de error ya que el fragmento del cromosoma X tiene un éxito de amplificación mayor que el del Y, por lo que podría conducir a la asignación de hembras cuando en realidad son machos. El cebador ZFK195H tiene una base degenerada para hibridar con una base G en el fragmento del cromosoma X y con una base C en el del Y, la disparidad en la amplificación podría deberse a que hibrida con mayor eficiencia con la G que con la C. En el futuro se espera corregir este sesgo mediante el diseño de otro cebador *reverse* que hibride con igual eficiencia en ambos alelos.

**Marcadores**

En conjunto los once microsatélites analizados tienen un alto contenido de información polimórfica (0,7), adecuado para estudios de estructuración genética poblacional (Botstein et al., 1980). Los tamaños de producto de PCR obtenidos son en su mayoría similares a los reportados previamente para la especie (comparación de tamaños en Tablas 1 y 2). Sólo FCA304 presentó un rango de tamaño mayor al encontrado por Johnson et al. (1999). Los loci utilizados por primera vez en gato montés (FCA742, FCA146) mostraron un polimorfismo de medio a alto, 15 y 8 alelos respectivamente y se encontraron en equilibrio de HW. El rango de tamaños muestra diferencias respecto a los reportados para gato doméstico, siendo en el primer caso de un rango menor y en el segundo más amplio para gato montés que para gato doméstico (comparación de tamaños en Tablas 1 y 2). Estos loci, caracterizados por primera vez para gato montés, resultaron adecuados para estudios poblacionales de la especie y pueden ser incorporados al set de microsatélites disponibles. La heterocigosidad promedio observada fue muy similar a la esperada y el Fis global cercano a 0,1, indicando un leve apartamiento del apareamiento al azar.

Se encontraron varios loci fuera del equilibrio de HW y con deficiencia de heterocigotas. Esto puede deberse a errores de genotipado-alelos nulos, a la influencia de la selección natural, o también a un efecto Wahlund (Freeland, 2005). Los microsatélites son loci neutrales y sólo estarán influenciados por la selección natural si se encuentran ligados a un gen codificante sobre el cual exista presión selectiva. Esto no es común pero de ocurrir es esperable que el patrón se repita en todas las poblaciones o grupos analizados y estos loci ya han sido utilizados por otros autores, tanto en gato montés como en otras especies de pequeños félidos neotropicales, sin encontrarse fuera del equilibrio o bajo presión de selección (Johnson et al., 1999; Trigo et al., 2008; Cossíos et al., 2012; Napolitano et al., 2014). Por lo tanto es más probable que exista otro factor diferente a la selección que explique este patrón. El efecto Wahlund describe un proceso donde dos o más poblaciones (con diferentes frecuencias alélicas) son combinadas. En este caso, la proporción de homocigotas será mayor en la muestra global de lo que se espera en cada población por separado, lo que podría llevar a concluir que una muestra representa a una población que no está en equilibrio de HW, cuando en realidad se trataría de más de una población, cada una de ellas en equilibrio (Freeland, 2005). Si bien es difícil lograr diferenciar si se trata de uno u otro caso, en general se considera que si afecta a loci particulares debe tratarse de alelos nulos o selección, en cambio si existe un patrón que se repite en todos o en una buena proporción de los loci entonces es probable que se trate de un efecto Wahlund (Freeland, 2005). En la muestra global 5 loci de 11 se

encontraron fuera del equilibrio y tres con deficiencia de heterocigotos. Esta alta proporción apunta al efecto Wahlund, es decir mezcla de poblaciones. Esto se vio respaldado por la detección de dos o tres *clusters* o grupos poblacionales en el análisis bayesiano realizado con el *software Structure*.

La caracterización de microsatélites dentro de los *clusters* identificados (UyBr y Ar) mostró una marcada disminución de los loci con problemas. En el grupo Ar no se encontró ningún locus fuera del equilibrio y sólo en uno se detectó deficiencia de heterocigotas debida a la posible presencia de alelos nulos (FCA391). Un alelo nulo implica una mutación en el sitio de unión del cebador, por lo que la misma señal de deficiencia de heterocigotas para este locus debería ser registrada en todas las poblaciones. Sin embargo en el único caso donde este locus presentó deficiencia de heterocigotas fue en el grupo de muestras de Argentina, por lo que es probable que en realidad se deba a un efecto del bajo número de muestras. Es posible que no se haya logrado representar toda la variación de tamaños de alelos de este locus. El grupo UyBr aún presentó tres loci fuera del equilibrio (FCA304, FCA096, FCA124) y tres con deficiencia de heterocigotas (FCA304, FCA096, FCA126), siendo dos coincidentes. Es poco probable que estén fuera del equilibrio debido a presión selectiva, por las mismas razones antes mencionadas. Podía tratarse de errores de genotipado, otra posibilidad es que aún exista subestructuración dentro de la muestra, lo cual está en línea con los resultados del *Structure* dónde en este grupo existiría mezcla de dos o tres componentes genéticos.

El análisis de desequilibrio de ligamiento identificó un caso en la muestra global (FCA742/FCA043) y otro en el grupo UyBr (F42/FCA043), que no son los mismos ligamientos aunque se repite el locus FCA043. Dichos loci se encuentran en distintos cromosomas del genoma del gato doméstico *Felis catus* (D4, C3 y A1 respectivamente, Menotti-Raymond et al. 1999; Menotti-Raymond et al., 2012). El género *Leopardus* presenta una reducción cromosómica (2N=36) respecto al resto de los félidos incluido el gato doméstico (2N=38) (Ximenez, 1975; Oliveira, 1998; Menotti-Raymond et al., 1999), por lo que la ubicación de los loci podría ser diferente. No existen estudios previos en el género *Leopardus* que utilicen esta combinación de microsatélites. Sin embargo el patrón de ligamiento encontrado parece ser inconsistente entre grupos muestrales. No se registra ninguno de estos ligamientos en el grupo de Argentina y si tomamos en consideración sólo las muestras de Uruguay aparecen otras combinaciones de ligamientos pero ninguno significativo luego de la corrección de Bonferroni (FCA742/FCA424, FCA424/FCA043, FCA124/FCA187). Por lo que es más probable que se trate de un efecto de la muestra a un ligamiento real, aunque se necesitaría aumentar el número de muestras y repetir el análisis. Otra posible causa del desequilibrio de ligamiento es nuevamente la presencia de subdivisión poblacional en la muestra, ya que si las frecuencias

alélicas entre subpoblaciones difieren, pueden generarse asociaciones no aleatorias entre alelos de distintos loci (Allendorf & Luikart, 2007).

**Proporción de sexos**

La proporción de sexos en la matriz global tiene una mayor proporción de machos (2:1). Esto podría representar la proporción de sexos real de la población, o podría tener un sesgo debido a una mayor dispersión de los machos, y consecuentemente mayor mortalidad en carreteras o por interacciones con actividades antrópicas (Kamler & Gipson, 2000; Haines et al., 2005; Pereira & Novaro, 2014). Esta vagilidad y mortalidad diferencial conduciría a una mayor representación de este sexo en una muestra oportunista como la del presente trabajo. Como regla general se asume que la dispersión suele ser sesgada hacia uno de los sexos, los machos en mamíferos (MBD, *male-biased dispersal*) y hacia las hembras en aves (Greengood, 1980; Dobson, 2013). En la realidad este es un patrón complejo, difícil de probar y para el cual existen confirmadas excepciones (Lowson & Perrin, 2007). Puede ser un parámetro variable incluso entre especies relacionadas, como el lince rojo o bobcat *Lynx rufus* que presenta MBD (Janecka et al., 2007; Croteau et al., 2010) mientras el lince de Canadá *Lynx canadensis* no (Campbell & Strobeck, 2006; Row et al., 2012). En el caso del gato montés no está comprobado que exista MBD, aunque algunas características observadas en otros trabajos, como el área de actividad usualmente mayor en machos que hembras y menor solapamiento entre machos (Johnson & Franklin, 1991; Manfredi et al., 2006; Pereira et al., 2015), la mayor proporción de machos en áreas modificadas posiblemente por eventos de recolonización (Pereira et al., 2011) y el movimiento hacia nuevas áreas muchas veces en abandono de su ámbito de hogar más común en machos (Johnson & Franklin, 1991), apuntan en esta dirección. Para Uruguay aún debe ser confirmado si el exceso de machos en la muestra representa la proporción de sexos real en la región o es generada por MBD.

El set de microsatélites utilizado en este trabajo puede ser adecuado para dilucidar si existe dispersión diferencial de los sexos, pero con otro tipo de muestreo. Se requiere un mayor número de individuos en pocas poblaciones en lugar de pocos individuos muy distribuidos, y rango generacional acotado (Goudet et al., 2002; Pugnolle & Meeus, 2002).

**Estructuración genética**

El análisis con *Structure* identifica dos o tres grupos genéticos. La simulación con mayor número de iteraciones/réplicas se espera que refleje procesos de estructuración más profundos, este es el caso de la segunda simulación que devuelve el resultado de dos grupos genéticos. El tercer grupo genético que se obtiene en la primer simulación, con parámetros menos exigentes, puede estar mostrando un proceso más actual o con una señal genética menos clara en el conjunto de muestras analizado.

Para el caso de dos grupos se ve una correlación espacial clara, donde las muestras de Argentina corresponden a un grupo genético representado mayoritariamente por el color verde, mientras las muestras de Uruguay y Brasil conforman otro grupo representado por el color rojo con mucha mezcla con el componente genético representado por el color verde (Figuras 10 y 11 superior). En los gráficos de tortas por países se aprecia cómo el grupo de muestras de Argentina se compone en más de un 80% de un componente genético (componente verde, Figura 11 superior), en cambio tanto el conjunto de muestras de Uruguay como las de Brasil están divididos cercano al 50-50% de cada componente genético. Esto marca como el conjunto de muestras de Uruguay y Brasil a nivel biológico conforman una misma unidad genética, en tanto las muestras de Argentina constituyen una unidad genética diferente. Estos resultados se ven respaldados por los valores obtenidos en el índice de fijación. Los valores de Fst por países muestran que Uruguay y Brasil se comportarían como una única población (valores de Fst cercanos a cero sin significancia estadística), pero ambos tienen diferencia estadísticamente significativa con Argentina. El índice de fijación entre los grupos Uruguay-Brasil vs Argentina sugiere que la diferencia es de baja a moderada ($Fst<0,05$), considerando que una fuerte estructuración ocurre a partir de valores de $Fst=0,2$ (Beebee & Rowe, 2008), pero estadísticamente significativa ($p<0,005$). Este valor está acorde con la amplia mezcla genética observada en el gráfico de *Structure*. Los valores de Fis y Fit dieron cercanos a 0,1, esto indica un leve apartamiento de la panmixia y un leve apartamiento del equilibrio de HW en la población global, posiblemente debida en ambos casos a la estructuración observada.

En la exploración visual del AFC se observa una nube de puntos con todos los individuos de Uruguay y Brasil más algunos de Argentina, y otros de Argentina distanciados de la nube. Si bien no se discriminan claramente los grupos, la tendencia concuerda con la leve diferenciación del grupo de Argentina y la alta mezcla encontrada. La varianza explicada por estos factores es baja, por lo que ningún factor resulta clave para la discriminación de los

grupos sino que la varianza está repartida entre todos los componentes. El AFC por poblaciones maximiza las diferencias por lo que no hay que tomarlo como indicador de grupos, pero vuelve a reflejar que el grupo de Argentina es el más diferente ya que lo separa en su eje primario.

Mediante la identificación de individuos migrantes con *Geneclass2* se vio que la dirección del flujo parece ser predominantemente unidireccional de Argentina hacia el este. Este flujo unidireccional ya había sido visualizado con el gráfico de *Structure*, sin embargo este resultado debe ser verificado con un número más equitativo de muestras en ambos *clusters* genéticos. El número de migrantes por generación entre UyBr y Arg es cercano a dos. Cierto nivel de conectividad entre subpoblaciones es esencial para mantener la variabilidad genética, adaptación local y prevenir la endogamia, considerándose como valores adecuados entre uno y diez migrantes por generación (Mills & Allendorf, 1996; Wang, 2004; Beebee & Rowe, 2008). Un migrante por generación corresponde al límite inferior de la cantidad de flujo génico deseable, es considerado el umbral crítico por encima del cual las poblaciones no divergirán genéticamente a causa de la deriva genética (Wang, 2004). Las poblaciones o subpoblaciones de las tres localidades de colecta (Argentina, Uruguay y Brasil) estarían por lo tanto adecuadamente conectados.

En el escenario resultante del análisis con el programa *Structure* de tres grupos genéticos las muestras argentinas se mantienen diferenciadas del resto y aparece un nuevo *cluster* dentro del conjunto UyBr. En este caso no se observa una correspondencia geográfica clara que explique los grupos genéticos representados por los colores rojo y azul (Figuras 10 y 11 inferior). Es necesario contrastar estos datos genéticos con unidades paisajísticas finas para analizar si existe alguna asociación que pueda estar explicando este patrón, como podría ser la existencia de corredores biológicos. Otras factores que podrían estar influyendo son factores etológicos como el apareamiento entre vecinos, o preferencias individuales por ciertos tipos de hábitats relacionados con el lugar de nacimiento (Sacks et al., 2004).

Además, hay que tener en cuenta que en este análisis se está visualizando lo que pasa en un sector espacial bastante acotado, limitado al extremo Este del rango de distribución de la especie. Se necesita un mapa más completo para poder entender mejor los procesos poblacionales. Quizás con mayor número de muestras de los sectores faltantes y un rango geográfico más amplio se encuentre otro componente genético generando introgresión en UyBr, o algún otro proceso poblacional que clarifique el patrón observado. De hecho cuando sólo se utilizan las muestras de Uruguay se reconoce un único grupo, una única población

panmíctica, sin diferenciación en *clusters* genéticos (Figura 12). Esto probablemente se deba a la falta de genotipos más extremos como referencia, que faciliten la estimación de las frecuencias alélicas de uno y otro grupo dentro de la muestra con mezcla genética (Pritchard et al., 2000). Sólo cuando se analizan las muestras de Uruguay en conjunto con las de los países vecinos se observa que dentro de la población uruguaya existe mezcla de varios componentes genéticos y se puede visualizar este patrón. Cabe destacar entonces la importancia de generar colaboraciones con especialistas de distintos países, en especial al trabajar con especies de distribución amplia.

Se encontró aislamiento por distancia significativo para el conjunto pero al descomponerlo el mismo fue significativo para Argentina y Brasil por separado, pero no para Uruguay. Por tanto la señal de aislamiento por distancia que se obtiene en el conjunto refleja la señal de las muestras de Argentina y Brasil pero no representa la explicación para los grupos genéticos definidos con *Structure*, posiblemente exista algún otro factor restringiendo el flujo con Argentina además del aislamiento por distancia. Se puede pensar en la barrera o restricción al movimiento que implica el Río Uruguay. Si bien se mencionó en la introducción que el gato montés es considerado un buen nadador y hay reportes de animales cruzando a nado ríos de 30 metros de ancho (Johnson & Franklin, 1991), el Río Uruguay tiene en promedio entre 1-2 km de ancho y alrededor de 10 km en los últimos 100 km hasta su desembocadura. No es esperable entonces que el Río Uruguay sea fácilmente sorteado por este felino. El aislamiento por distancia, aislamiento por barreras o aislamiento por resistencia al paisaje pueden dar señales muy similares en el test de Mantel (Cushman & Landguth, 2010). Por tanto es necesario explorar estas otras opciones mediante matrices de resistencia o de grafos, y con un número de muestras equitativo a ambos lados del elemento a testear, en este caso el río (Cushman et al., 2006; Cushman & Landguth, 2010). Hacia el lado de Brasil la distribución del gato montés se extiende hasta el entorno del paralelo 30$^{o}$S en Río Grande do Sul (Trigo et al., 2014), esto no es mucho más al Norte de las localidades donde se tomaron muestras, por lo que se podría predecir que no existirán diferencias genéticas debidas al aislamiento por distancia entre los individuos de gato montés de Uruguay y Brasil. La señal de aislamiento por distancia obtenida para las muestras de Argentina y Brasil refleja que hay otros procesos actuando. El aislamiento por distancia es un subproducto común de una variedad de procesos del flujo génico, por lo que si bien puede existir un efecto de la distancia pueden haber a la vez otros factores influyendo en igual o mayor medida (Murphy et al., 2008; Cushman et al., 2006).

Respecto a las hipótesis, si consideramos sólo la muestra de Uruguay se acepta la hipótesis nula, el gato montés tiene alta conectividad, sin distinguirse en Uruguay subgrupos o

aislamiento por distancia, es decir que se comporta como una única población panmíctica. Cuando analizamos todas las muestras incluyendo las localidades regionales se rechaza la hipótesis nula. El aislamiento por distancia no parece ser una explicación suficiente ni para la diferenciación con Argentina ni para la diferenciación dentro del conjunto UyBr observado en el escenario de tres *clusters*. Por tanto también se rechaza la hipótesis alternativa uno, manteniendo la hipótesis alternativa dos, considerando que elementos del paisaje establecen una conectividad diferencial que ocasiona la estructuración observada. Esto debe ser corroborado desde una perspectiva de genética del paisaje. Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado en base a las características de la especie y área de estudio. Una baja diferenciación genética es lo esperado para una especie generalista, con amplia vagilidad y tolerancia a ambientes antropizados. La falta de estructuración y aislamiento por distancia ya ha sido reportada dentro del territorio para otra especie de similares características, el zorro de monte *Cerdocyon thous* (Grattarola, 2015). Hacen falta igualmente estudios a micro escala para comprender si hay zonas de preferencia por dónde está ocurriendo el flujo. La conexión entre Uruguay y Río Grande do Sul ya ha sido sugerida por González & Martínez-Lanfranco (2000) para la mastofauna uruguaya, y resultados genéticos en especies de mamíferos como el aguará guazú *Chrysoccyon brachyurus* apuntan en la misma dirección (Mannise, 2013).

No se detectaron cambios significativos en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo, lo cual implica que no han existido hasta el momento marcados procesos poblacionales como ser cuellos de botella o expansión poblacional que afectaran significativamente a la población. Idealmente este resultado debería acompañarse por un estudio demográfico que constituyera una segunda fuente de información, pero no existen en Uruguay datos que permitan hacerlo. Podría explorarse sin embargo la historia demográfica a partir de los mismos datos genéticos mediante un método coalescente (Wu & Drummond, 2011; Nikolic & Chevalet, 2014), aunque esto no constiruye una fuente de información independiente. La UICN plantea que el gato montés tiene una tendencia poblacional estable, lo cual concuerda con lo propuesto en este trabajo. Por otro lado los efectos derivados del cambio de uso y cobertura de la tierra ocurridos en el país comenzaron en el 2000 y se profundizaron a partir de la zafra 2002-2003 (MVOTMA/DINAMA, 2013), por lo que su señal genética podría no haberse plasmado aún en la población. Existe un lapso de tiempo a considerar entre la ocurrencia de los procesos que generan la estructuración genética y que la señal genética en respuesta a dichos procesos sea detectable, en particular cuando el tamaño poblacional efectivo es grande o la dispersión baja (Anderson, 2010; Landguth et al., 2010). Para organismos con capacidad de dispersión relativamente alta (>20Km) como es el caso del gato montés (Johnson & Franklin, 1991; Cuellar

et al., 2006; Pereira & Novaro, 2014) se requieren alrededor de cinco generaciones para detectar la aparición de una barrera y alrededor de 15 generaciones para que desaparezca la señal de una barrera que dejó de existir (Murphy et al., 2008; Landguth et al., 2010). Considerando un tiempo generacional de entre 2 y 4 años (Nowell & Jackson, 1996; Foreman, 1997; Pereira & Aprile, 2012), la aparición de una barrera sería detectada en un plazo de 10-20 años y la desaparición en uno de 30-60 años. Los tiempos de generación manejados sugieren que la ventana temporal que estamos observando corresponde a acontecimientos ocurridos hasta el 2000. El impacto de la alteración de hábitat sobre la especie ocurrido en la última década deberá ser estudiado en futuras generaciones. A pesar de que el gato montés es considerado una especie común, los estudios sobre su dinámica poblacional y conectividad en el territorio son escasos. Este es el primer esfuerzo realizado en este sentido en el extremo Este de su rango de distribución. Actualmente se está desarrollando un proyecto en la temática liderado por el Dr. Javier Pereira en Argentina (http://museoscasso.com.ar/2016/06/22/proyecto-gato-montes-nuevos-materiales/), con el cual será interesante contrastar los resultados obtenidos.

**Unidades de manejo e implicancias para la conservación**

Si bien no existe un marco general para determinar a qué tasa de dispersión las poblaciones están demográficamente correlacionadas, algunos estimadores genéticos básicos pueden proporcionar un primer acercamiento. Wang (2004) propone usar la regla de "un migrante efectivo por generación" ($N_em=1$) como una pauta mínima para determinar que dos poblaciones pertenecen a unidades de manejo distintas. Por otro lado Waples & Gaggiotti (2006) proponen un criterio menos estricto considerando un valor de $F_{ST}> 0,05$, lo cual implica un umbral de menos de cinco migrantes efectivos por generación ($N_em< 5$). Por otro lado Palsböl et al. (2006) argumentan que estos son criterios simplistas y en cierta medida bastante arbitrarios, por lo que en realidad se requieren estudios más profundos, que atiendan a la relación entre las características demográficas y la dinámica poblacional genética específica de la especie en estudio. También otros autores plantean que se debe atender además a los aspectos ecológicos, evolutivos y de amenazas que hacen al carácter distintivo de las poblaciones (Moritz, 1994; Crandall et al., 2000; Napolitano et al. 2014).

De acuerdo a los criterios genéticos básicos calculados en este trabajo, no puede considerarse que el conjunto Uruguay-Brasil sea una unidad de manejo diferente a la de Argentina ($Nm_{UyBr/Ar}=1,83$; $Fst_{UyBr/Ar}=0,042$). Sin embargo el número de migrantes y Fst están cerca de los límites establecidos y la diferenciación genética encontrada es significativa. Los grupos identificados además coinciden en cierta medida con los límites geográficos de las subespecies *L. g. paraguae* (Uruguay-Brasil) y *L. g. geoffroyi* (Centro-Este y Sur de Argentina) propuestas por Ximenez (1975) y Wozencraft (2005). Estas clasificaciones se basan principalmente en medidas morfológicas y patrón del pelaje. Si bien en estudios posteriores las divisiones propuestas no son validadas a nivel de subespecies (Johnson et al., 1999; Nascimento, 2014), sí parece existir una división a nivel de poblaciones que se refleja tanto en la variabilidad genética como en aspectos morfológicos. Por lo tanto habría que considerar esta variabilidad encontrada a la hora de desarrollar políticas de manejo y conservación para la especie. La determinación de si constituyen o no dos unidades de manejo diferentes requiere un análisis más completo y profundo, que integre información proveniente de distintas aproximaciones y campos de la biología.

Los resultados de este trabajo también destacan que mantener los puntos de conexión con los países vecinos es fundamental para la dinámica y conservación de la especie en Uruguay, así como la importancia de desarrollar políticas de conservación e investigación conjuntas. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de establecer estrategias de manejo para la especie.

**CONCLUSIONES**

Este trabajo pone de manifiesto la necesidad de aumentar el esfuerzo de muestreo en mamíferos medianos y establecer colaboraciones, que contribuyan a actualizar las colecciones y generar información de las especies a nivel país.

Durante este trabajo se desarrollaron técnicas para una rápida identificación de la especie y asignación del género en muestras de felinos, que gracias a su precisión y bajo costo son incorporaciones de gran valor al conjunto de herramientas moleculares para el estudio de félidos neotropicales.

La población de gato montés *Leopardus geoffroyi* de Uruguay es una población bien conectada en todo el territorio, que mantiene altos niveles de variabilidad genética y bajo grado de endogamia, con intercambio genético tanto con individuos de Brasil como de Argentina.

No se detectan cambios significativos en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo, esto sugiere que la especie no ha sufrido hasta el momento procesos poblacionales profundos en la región de estudio, o estos no han generado una señal genética aún.

Los individuos de Uruguay y Brasil pueden ser considerados una única población, levemente diferenciados de los de Argentina. Esto concuerda con lo esperado en base a la continuidad ecológica que existe a través de la frontera seca entre Uruguay y Brasil. El Río Uruguay permite un moderado flujo génico entre las poblaciones, estimado en dos migrantes por generación, sin representar una gran barrera para la especie. Se identificó el aislamiento por distancia como uno de los factores que están generando la estructuración pero otros factores de resistencia al movimiento deben ser explorados.

El componente genético que predomina en Argentina aparece también en alto porcentaje en las muestras de Uruguay y Brasil por lo que se entiende que el flujo es mayormente unidireccional de Argentina hacia el Este. Esto debe verificarse con mayor número de muestras de Argentina.

Si bien no se diferencian unidades de manejo de acuerdo a los criterios genéticos básicos, la diferenciación encontrada amerita profundizar el análisis e integrar información proveniente de distintos campos de la biología. La población de gato montés uruguaya debe manejarse mediante políticas de conservación conjuntas a nivel regional teniendo en cuenta la variación genética encontrada.

Los resultados reafirman lo que se conoce hasta el momento sobre las características de la especie que lo presentan como un animal adaptable con gran capacidad de dispersión, no encontrando grandes barreras en esta zona de su área de distribución.

Este es el primer trabajo genético y poblacional del gato montés en el extremo Este de su rango de distribución. Proporciona una foto de la realidad, una imágen de la situación de la especie en un espacio y tiempo acotados, que contribuye a entender su dinámica poblacional y a evaluar su estatus de conservación. Además establece una base contra la cual contrastar estudios futuros. Constituye un insumo para conocer más acerca de su ecología y evaluar el estado de amenaza de la especie a nivel internacional y para Uruguay.

**PERSPECTIVAS**

Aumentar el número de muestras y la extensión regional de análisis.

Implementar un análisis demográfico a partir de los datos moleculares mediante un método coalescente.

Estudiar la existencia de dispersión ligada al sexo mediante una aproximación molecular con el set de loci de microsatélites caracterizado. Para ello será necesario intensificar el esfuerzo de muestreo en localidades acotadas.

Contrastar matrices de distancia genética con unidades ambientales y matrices de costo ecológico para incorporar el nexo genética-paisaje.

Analizar el grado de restricción al movimiento que representa el Río Uruguay para este y otros mamíferos terrestres a partir de un muestreo equitativo a ambos lados del río, e indagar de qué manera ocurre el flujo a través del Río Uruguay y cuáles son los ambientes que actúan como principales conectores con Brasil.

Profundizar en la determinación de si Uruguay-Brasil y Argentina corresponden a distintas unidades de manejo. Repetir el análisis con mayor número de muestras de Argentina e incorporar datos demográficos, ecológicos, evolutivos y de amenazas que caracterizan a cada uno de los grupos.

Repetir el análisis con mayor número de muestras colectadas de aquí a cinco o diez años. Esto asegurará trabajar con una ventana generacional acotada en la cual visualizar los cambios en el uso del suelo ocurridos en la última década.

Complementar el análisis genético mediante la incorporación de un marcador mitocondrial, como la región control (*D-loop*). Esto aportará una aproximación filogeográfica que puede complementar la historia a partir de señales de procesos más antiguos.

En referencia a las técnicas moleculares se espera continuar con el desarrollo, testeo y puesta a punto de la sonda para gato de pajonal (*Leopardus braccatus*), lo cual tendrá una aplicabilidad inmediata en la investigación de los félidos de Uruguay. También se podría indagar en el diseño de una sonda para puma (*Puma concolor*), y a la luz de los nuevos registro del país para yaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Grattarola et al., 2016), aunque la aplicabilidad en este caso sería más limitada. Mejorar el desempeño de la técnica de sexaje mediante el diseño de un cebador *reverse* que hibride con igual eficiencia en los fragmentos X e Y.

**BIBLIOGRAFÍA**


Achkar, M. & Domínguez, A. 2000. El sistema ambiental uruguayo. pp. 17 – 27. En: Domínguez, A. & Prieto, R. G. (eds.) Perfil Ambiental del Uruguay. Editorial Nordan-Comunidad del Sur, Montevideo. 260 pp.

Aguirre E. 2007. Capítulo 2. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. Pp: 49-61 En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (Eds.). Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 594 pp.

Almeida LB, Queirolo D, Oliveira TG & Beisiegel BM. 2013. Avaliação do risco de extinção do gato-do-mato *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) no Brasil. Biodiversidade Brasileira. 3(1): 84-90.

Allendorf FW & Luikart G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Pub. USA-UK-Australia. 642 pp.

Anderson CD, Epperson BK, Fortin MJ, Holderegger R, James PMA, Rosenberg MS, Scribner KT & Spear S. 2010. Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. Molecular Ecology. 19: 3565-3575.

Andrén H. 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. Oikos 71:355-363.

Aprile G, Cuyckens E, De Angelo C, Di Bitetti M, Lucherini M, Muzzachiodi N, et al. 2012. Familia: Felidae. P: 93. En: Ojera RA, Chillo V & Diaz Isenrath GB (Eds.). Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM), Argentina. 257 pp.

Balloux F & Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology. 11:155-65

Balkenhol N, Gugerli F, Cushman SA, Waits LP, Coulon A, Arntzen JW, et al. 2009. Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here? Landscape Ecology 24:455-63

Bartesaghi L, Salazar A, Ávila S, Troncoso A, Mejía P, Mello AL, et al. 2015. Plan Estratégico 2015 – 2020 Sistema Nacional De Áreas Protegidas de Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, Montevideo. 66 pp.

Barton NH & Hewitt GM. 1985. Analysis of hybrid zones. Annual Review of Ecology and Systematics. 16: 113-148.

Barton NH & 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. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press. Oxford. 400 pp.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bisceglia SBC, Pereira JA, Teta P & Quintana RD. 2008. Food habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in the central Monte desert of Argentina. Journal of Arid Environments. 72: 1120–1126.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics. 32: 314-331.

Brazeiro A, Achkar M, Toranza C, Barthesagui L. 2008. Potenciales impactos del cambio de uso del suelo sobre la biodiversidad terrestre de Uruguay. Pp: 1-22. En: Volpedo AV & Reyes LF (Eds.). Efecto de los cambios globales sobre la biodiversidad. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Red 406RT0285 CYTED

Bou N. 2013. Distribución potencial de tres especies de *Leopardus* (Carnivora: Felidae) para Uruguay. Tesina de Licenciatura. Universidad de la República, Montevideo. 55 pp.

Campbell V & Strobeck C. 2006. Fine-scale genetic structure and dispersal in Canada lynx (*Lynx canadensis*) within Alberta, Canada. Canada Journal of Zoology. 84:1112-1119.

Cantón V, Aguerre A, Batallés M, Aber A, Dalgalarrondo E, Andrés E. & Urruti P. 2010. IV informe nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo. 119 pp.

Caruso N, Manfredi C, Luengos-Vidal EM, Casanave E & Lucherini M. 2012. First density estimation of two sympatric small cats, *Leopardus colocolo* and *Leopardus geoffroyi*, in a shrubland area of central Argentina. Annales Zoologici Fennici 49: 181-191.

Catsg. 2016. Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi*. En: <http://www.catsg.org/index.php?id=90> [Acceso Setiembre 2016].

Cegelski CC, Waits LP & Anderson NJ. 2003. Assessing population structure and gene flow in Montana wolverines (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. Molecular Ecology. 12: 2907–2918.

Chakraborty S. 2010. Comparative Study of Various Genetic Distance Measures between Populations for the ABO Gene. Noulaet Scientria Biologicae. 2 (4): 12-17.

CITES. 2013. Apéndices I, II and III. En: <www.cites.org/esp/app/index.shtml> [Acceso Junio 2016].

Cosse M. 2010. Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*: Pautas para su conservación. Ph.D. dissertation. Universidad de la República, Montevideo. 203 pp.

Cossíos ED, Walker RS, Lucherini M, Ruiz-García M & Angers B. 2012. Population structure and conservation of a high-altitude specialist, the Andean cat *Leopardus jacobita*. Endangered Species Research. 16: 283-294.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM & Wayne RK. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. TREE. 15: 290-295

Crooks KR. 2002. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. Conservation Biology. 16:488-502.

Croteau EK, Heist EJ & Nielsen CK. 2010. Fine-scale population structure and sex-biased dispersal in bobcats (*Lynx rufus*) from southern Illinois. Canadian Journal of Zoology. 88:536-545.

Cuellar E, Maffei L, Arispe R & Noss A. 2006. Geoffroy's cats at the northern limit of their range: activity patterns and density estimates from camera trapping in Bolivian dry forests. Studies on Neotropical Fauna and Environment. 41(3): 169–177.

Cushman SA & Landguth EL. 2010. Spurious correlations and inference in landscape genetics. Molecular Ecology. 19:3592-3602.

Cushman SA, McKelvey KS, Hayden J & Schwaetz MK. 2006. Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with casual modeling. The American Naturalist. 168 (4): 486-499.

Cuyckens GAE, Pereira JA, Trigo TC, Da Silva M, Goncalves L, Huaranca JC, et al. 2016. Refined assessment of the geographic distribution of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) (Mammalia: Felidae) in the Neotropics. Journal of Zoology. 298(4): 285–292.

Dobson FS. 2013. The enduring question of sex-biased dispersal: Paul J. Greenwood's (1980) seminal contribution. Animal Behaviour. 85: 299-304.

Earl DA & vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetic Resource. 4: 359–361.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics. 5: 435–445.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology. 14: 2611–2620.

Evia G & Gudynas E. 2000. Ecología del paisaje en Uruguay. Aportes para la conservación de la diversidad biológica. DINAMA & Junta de Andalucía, Sevilla. 173 pp.

Foreman GE. 1997. Breeding and maternal behaviour in Geoffroy's cats *Oncifelis geoffroyi*. International Zoo Yearbook. 35: 104–115.

Freeland JR. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd. England. 402 pp.

González EM, Martínez-Lanfranco JA, Soutullo A, Juri E, Rodales AL & Botto G. 2013. Mamíferos. Pp. 175-207. En: Soutullo A, Clavijo C & Martínez-Lanfranco JA (Eds.). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo. 222 pp.

González S, Mannise N, Repetto L & Maldonado J. 2015. Sex determination of three Neotropical canids by high resolution melting analysis. Conservation Genetic Resourses. 7(3): 643-645.

González EM & Martínez-Lanfranco JA. 2010. Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Banda Oriental, Montevideo. 462 pp.

González EM & Martínez-Lanfranco JA. 2000. Lista sistemática, afinidades biogeográficas, hábitos y hábitats de los mamíferos terrestres autóctonos de Uruguay (Mammalia): una introducción. Jornadas sobre animales silvestres, desarrollo sustentable y medio ambiente. Montevideo. 57-73 pp.

Goudet J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2).

Goudet J, Perrin N & Waser P. 2002. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. Molecular Ecology. 11: 1103–1114.

Grattarola. 2015. Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos en Uruguay. Tesis de maestría. Universidad de la República, Montevideo. 102 pp.

Grattarola F, Hernández D, Duarte A, Gaucher L, Perazza G, González S, et al. 2016. Primer registro de *Puma yagouaroundi* silvestre en Uruguay, con comentarios sobre monitoreo participativo. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2a época). 25(1): 85-91.

Greenwood PJ. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Animal Behaviour. 28: 1140–1162.

Guidobono JS, Muñoz J, Muschetto E, Teta P & Bush M. 2016. Food habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in agroecosystem habitats of Buenos Aires, Argentina. Ecología Austral. 26:040-050.

Guo SW & Thompson EA. 1992. Performing the Exact Test of Hardy- Weinberg Proportion for Multiple Alleles. Biometrics. 48:361-372.

Haines AM,Tewes ME, Laack LL, Grant WE & Young J. 2005. Evaluating recovery strategies for an ocelot (*Leopardus pardalis*) population in the United States. Biological Conservation. 126: 512-522.

Hall LA & Beissinger SR. 2014. A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies. Landscape Ecology. 29(9): 1487-1504.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR.Genome Research. 6(10): 986-994.

Henle K, Davies KF, Kleyer M, Margules C & Settele J. 2004. Predictors of species sensitivity to fragmentation. Biodiversity and Conservation. 13:207-251.

Holland PM, Abramson RD, Watson R & Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Science (USA). 88(16): 7276-7280.

Iriarte JA, Rau JR, Villalobos R, Lagos N & Sade S. 2013. Revisión actualizada sobre la biodiversidad y conservación de los felinos silvestres de Chile. Boletín de Biodiversidad de Chile. 8: 5-24.

Janecka JE, Blankenship TL, Hirth DH, Kilpatrick CW, Tewes ME & Grassman LIJr. 2007. Evidence for male-biased dispersal in Bobcats *Lynx rufus* using relatedness analysis. Wildlife Biology. 13: 38-47.

Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim JH, Raymond MM, Bonacic C, et al. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. Molecular Ecology. 8: S79- S94.

Johnson WE, Eizirik E, Murphy WJ, Pecon-Slattery J, Antunes A, Teeling E & O'brien SJ. 2006. The Late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science. 311:73-77.

Johnson WE &Franklin WL. 1991. Feeding and spatial ecology of *Felis geoffroyi* in Southern Patagonia. Journal of Mammalogy. 72(4): 815-820.

Kalinowski ST. 2002. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. Molecular Ecology. 11: 1263-1273.

Kamler JF & Gipson PS. 2000. Home range, habitat selection, and survival of Bobcats, *Lynx rufus*, in a prairie ecosystem in Kansas. Canadian Field Naturalist. 114: 388-394.

Keyghobadi N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. Canadian Journal of Zoology. 85: 1049-1064.

Kimura M & Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics. 49:725-738.

Kimura M & Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 75:2868-2872.

Landguth E, Cushman S, Schwartz M, McKelvey K, Murphy M & Luikart G. 2010. Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. Molecular Ecology. 19:4179-4191.

Langella O. 1999. Populations 1.2.32. Available via http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/

Lee TM & Jetz W. 2008. Future battlegrounds for conservation under global change. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences. 275:1261-1270.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology. 11:2453-2465.

Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W & Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. Genome Research. 4(6): 357- 362.

Lowson LJ & Perrin N. 2007. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. Molecular Ecology. 16: 1559–1578.

Macdonald DW & Loveridge AJ. 2010. Biology and conservation of wild felids. Oxford University Press, New York. 762 pp.

Manfredi C, Lucherini M, Canepuccia AD & Casanave EB. 2004. Geographical variation in the diet of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in pampas grassland of Argentina. Journal of Mammalogy.85(6): 1111-1115.

Manfredi C, Soler L, Lucherini M & Casanave EB. 2006. Home range and habitat use by Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in a wet grassland in Argentina. Journal of Zoology. 268: 381-387.

Mannise N. 2013. Análisis de la estructura genética de poblaciones de aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*). Tesis de Maestría. Universidad de la República, Montevideo. 113 pp.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research. 27(2):209-220.

Marshall TC, Slate J, Kruuk LE & Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology. 7:639-655.

Maudet C, Miller C, Bassano B, Breitenmoser-Würsten C, Gauthier D, et al. 2002. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (*ibex*)]. Molecular Ecology. 11:421-436.

Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK & O'brien SJ. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). Genomics. 57: 9-23.

Menotti-Raymond M, David VA, Weir BS & O'Brien SJ. 2012. A Population Genetic Database of Cat Breeds Developed in Coordination with a Domestic Cat STR Multiplex. Journal of Forensic Science. 57(3): 596-601.

Mills LS & Allendorf FW. 1996. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. Conservation Biology. 10(6): 1509-1518.

Moritz C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. Trends in Ecology and Evolution. 9: 373-375.

MVOTMA/DINAMA. 2013. Indicadores ambientales del Uruguay, informe del estado del ambiente de Uruguay. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. 282 pp.

Murphy MA, Evans JS, Cushman SA & Storfer A. 2008. Representing genetic variation as continuous surfaces: an approach for identifying spatial dependency in landscape genetic studies. Ecography 31: 685-697.

Napolitano C. 2011. Filogeografía, inferencia demográfica y genética de la conservación del felino *Leopardus guigna* en el Sur de Sudamérica. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile, Chile. 255 pp.

Napolitano C, Johnson WE, Sanderson J, O'Brien SJ, Hoelzel AR, Freer R, et al. 2014. Phylogeography and population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid. Conservation Genetics. 15: 631–653.

Nascimento FO. 2014. On the morphological variation and taxonomy of the Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) (Carnivora, Felidae). Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo). 54(11): 129-160.

Navarro ML. 1983. Aspectos teóricos y una aplicación práctica del análisis factorial de correspondencias. Estadística Española. 99: 33-59.

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist. 106(949): 283-292.

Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics. 41:225-33.

Nei M. 1987. Capítulo 8. Genetic Distance and Molecular Phylogeny. Pp: 193-223. En: Ryman N & Utter F. (Eds.). Population Genetics & Fishery Management. Washington Sea Grant Program. 420 pp.

Nikolic N & Chevalet C. 2014. Detecting past changes of effective population size. Evolutionary applications. 7: 663–681.

Nowell K & Jackson P(Eds.). 1996. Status Survey and Conservation Action Plan: Wild Cats. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Gland, Switzerland. 382 pp.

Oliveira TG. 1998. *Leopardus wiedii*. Mammalian Species. 579: 1-6.

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM & Shipley P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes. 4(3): 535-538.

Ortega J, Franco MR, Adams BA, Ralls K & Maldonado JE. 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. Conservation Genetics. 5: 715-718.

Palsböll PJ, Bérubé M & Allendorf FW. 2006. Identification of management units using population genetic data. Trends in Ecology and Evolution. 22: 11-16.

Paetkau D, Slade R, Burden M & Estoup A. 2004. Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. Molecular Ecology. 13:55-65.

Peakall R & Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics. 28: 2537-2539.

Peakall R & Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.

Pereira JA, Varela DM & Raffo L. 2005. Relevamiento de los felinos silvestres en la región del Parque Nacional Pre-Delta (Entre Ríos, Argentina). FACENA. 21: 69-77.

Pereira JA, Fracassi NG & Uhart MM. 2006. Numerical and spatial responses of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) to prey decline in Argentina. Journal Of Mammalogy. 87(6):1132–1139.

Pereira JA, Di Bitetti MS, Fracassi NG, Paviolo A, De Angelo CD, Di Blanco YE & Novaro AJ. 2011. Population density of Geoffroy's cat in scrublands of central Argentina. Journal of Zoology. 283: 37–44.

Pereira JA, Walker RS & Novaro AJ. 2012. Effects of livestock on the feeding and spatial ecology of Geoffroy's cat. Journal of Arid Environments. 76: 36-42.

Pereira JA, Lucherini M & Trigo TC. 2015. *Leopardus geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T15310A50657011. En: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T15310A50657011.en> [Acceso Marzo 2016].

Pereira JA & Aprile G. 2012. Felinos de Sudamérica. Londaiz Laborde Ediciones. 104 pp.

Pereira JA & Novaro AJ. 2014. Habitat–specific demography and conservation of Geoffroy's cats in a human dominated landscape. Journal of Mammalogy. 95(5): 1025–1035.

Pecon-Slattery J & O'Brien SJ. 1998. Patterns of Y and X Chromosome DNA Sequence Divergence During the Felidae Radiation. Genetics. 148: 1245-1255.

Piggott MP & Taylor AC. 2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. Wildlife Research. 30: 1-13.

Pilgrim KL, Mckelvey KS, Riddle AE & Schwartz MK. 2005. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. Molecular Ecology Notes. 5:60-61.

Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L & Estoup A. 2004. GeneClass2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. Journal of Heredity. 95:536-539.

Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155:945-959.

Pritchard JK, Wen X & Falush D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. En: <http://pritchardlab.stanford.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf> [Acceso Enero 2016].

Prugh LR, Stoner CJ, Epps CW, Bean WT, Ripple WJ, Laliberte AS & Brashares JS. 2009. The Rise of the Mesopredator. BioScience. 59(9): 779-791.

Pugnolle F & Meeus T. 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. Heredity. 88: 161–165.

QGIS Development Team. 2016. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Available in http://www.qgis.org/

Raymond M & Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. Journal of Heredity. 86: 248-249.

Reed DH. 2005. Relationship between Population Size and Fitness. Conservation Biology. 19: 563-568.

Rannala B & Mountain JL. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 94: 9197-9201.

Rice WR. 1989. Analysing tables of statistical tests. Evolution. 43: 223-225.

Ricketts TH. 2001. The matrix matters: Effective isolation in fragmented landscapes. The American Nataturalist. 158:87-99.

Riley SPD, Foley J & Chomel B. 2004. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. Journal of Wildlife Diseases. 40:11-22.

Rousset F. 2008. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources. 8:103-106.

Row JR, Gomez C, Koen EL, Bowman J, Murray DL & Wilson PJ. 2012. Dispersal promotes high gene flow among Canada Lynx populations across mainland North America. Conservation Genetics. 13(5): 1259-1268.

Sacks BN, Brown SK & Ernest HB. 2004. Population structure of California coyotes corresponds to habitat specific breaks and illuminates species history. Molecular Ecology. 13: 1265–1275.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, et al. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science's Compass. 287(5459): 1770-1774.

Sánchez-Díaz AC. 2012. Identificación y cuantificación de especies del género *Merluccius* mediante la utilización de PCR a tiempo real. Tesis de Doctorado. Universidad de Vigo Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, España. 327 pp.

Schewart MK & McKelvey KS. 2009. Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. Conservation Genetics. 10 (2): 441-452.

Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma. 109: 365–371.

Schlötterer C & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research. 20: 211-215.

SEAM. 2011a. Especies en peligro de extinción. En: <http://www.seam.gov.py/sites/default/files/peligro_de_extincion.pdf>[Acceso Setiembre 2016].

SEAM. 2011b. Especies amenazadas de extinción. En: <http://www.seam.gov.py/sites/default/files/amenazadas_de_extincion.pdf>[Acceso Setiembre 2016].

Segelbacher G, Cushman SA, Epperson BK, Fortin MJ, Francois O, et al. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. Conservation Genetics. 11:375-385.

Selkoe KA & Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters. 9:615-629.

Sunquist M & Sunquist F. 2002. Wild Cats of the World. The University of Chicago Press, Chicago. 452 pp.

Swihart RK, Gehring TM, Kolozsvary MB & Nupp TE. 2003. Responses of 'resistant' vertebrates to habitat loss and fragmentation: the importance of niche breadth and range boundaries. Diversity and Distribution. 9:1-18.

Takezaki N & Nei M. 2008. Empirical tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with microsatellite DNA. Genetics Society of America. 178: 385–392.

Tarifa T & Aguirre LF. 2009. Capítulo 6. Mamíferos. Pp: 419-776. En: Ministerio de Medio Ambiente y Agua. Libro rojo de la fauna silvestre de vertebrados de Bolivia. Ministerio de Medio Ambiente y Agua, La Paz, Bolivia. 571 pp.

Taylor BL & Dizon AE. 1999. First policy then science: Why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. Molecular Ecology. 8: S11-S16.

Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, et al. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. Molecular Ecology. 17: 4317-4333.

Trigo TC, Schneider A, Oliveira TG, Lehugeur LM, Silveira L, et al. 2013. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. Current Biology. 23: 2528–2533.

Trigo TC, Tirelli FP, de Freitas TRO & Eizirik E. 2014. Comparative assessment of genetic and morphological variation at an extensive hybrid zone between two wild cats in southern Brazil. PLoS ONE 9(9): e108469. doi:10.1371/journal.pone.0108469

Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, Johnson W, Vandewoude S, Vazquez-Salat N, et al. 2005. Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. Journal of Virology. 79:8282-8294.

Valdes AM, Slatkin M & Freimer NB. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. Genetics. 133:737-749.

Vilas C, Miguel ES, Amaro R & García C. 2006. Relative contribution of inbreeding depression and eroded adaptive diversity to extinction risk in small populations of Shore Campion. Conservation Biology. 20:229-238.

Wang J. 2004. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. Conservation Biology. 18: 332-343.

Wang C, Schroeder KB, & Rosenberg NA. 2012. A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. Genetics. 192:651-669.

Waples RS & Gaggiotti O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Molecular Ecology. 15: 1419-1439.

Wright S. 1943. Isolation by distance. Genetics. 28:114-138.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics. 15:323-354.

Wozencraft WC. 2005. Order Carnivora. Pp: 532-628. En: Wilson DE & Reeder DM (Eds.). Mammal Species of the World, 3. ed. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. 2 vols. 2142 pp.

Wu CH & Drummond AJ. 2011. Joint inference of microsatellite mutation models, population history and genealogies using transdimensional Markov Chain Monte Carlo. Genetics. 188: 151-164.

Ximénez A. 1975. *Felis geoffroyi*. Mammalian Species. 54: 1-4.

Ximénez A. 1982. Notas sobre félidos neotropicales 8. Observaciones sobre el contenido estomacal y el comportamiento alimentar de diversas especies de felinos. Revista Nordentina de Biologia 5(1): 89-91.

Zane L, Bargelloni L & Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology. 11: 1-16.

Anexo I. Muestras analizadas. Para cada muestra se detalla el país de procedencia, el acrónimo con que fue ingresado a la colección de tejidos y ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, la colección de la cual procede la muestra y el tipo de muestra. Se presenta también el año de colecta, datos de localidad y regionalización dentro del país en departamento (Dpto.), provincia o estado según el caso. Las coordenadas geográficas en grados decimales y la determinación del sexo.

IIBCE=colección del Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. MNHN=colección del Museo Nacional de Historia Natural. ECOBIO=muestra procedente del proyecto rutas (http://impactorutasecobiouy.blogspot.com.uy). BA y ER=códigos de las muestras proporcionadas por Javier Pereira. bLge= códigos de las muestras proporcionadas por Tatiane Trigo y Caroline Espinosa. MCNT= colección del Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, proporcionadas por Tatiane Trigo y Caroline Espinosa. M=macho, H=hembra.$^{do}$=sexo en datos de origen, $^{mol}$=sexo determinado por técnicas moleculares. Los casilleros en rojo marcan errores en la asignación de sexos, se presenta el dato de origen.

| Nro. | País | Acrónimo IIBCE | Colección | Muestra | Año | Localidad | Dpto./Provincia/Estado | Latitud | Longitud | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Uy | U33 | IIBCE | tejido | 1999 | R.9 km 216 (viniendo de Montevideo pasando 300 mts del km 216) | Montevideo | -34.4721 | -54.2585 | $H^{mol}$ |
| 2 | Uy | U36 | IIBCE | pelos | 2000 | Parque Lecocq, procedencia original Minas | Lavalleja | -34.3645 | -55.2334 | $M^{mol}$ |
| 3 | Uy | U38 | IIBCE | sangre | 2000 | Parque Lecocq, capturado en la zona | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $M^{do,mol}$ |
| 4 | Uy | U47 | IIBCE | pelos | 2004 | Muestra tomada en el almacén Fimosi. Cazado cerca de Pueblo Vera | Salto | -31.6000 | -56.8123 | ? |
| 5 | Uy | U48 | IIBCE | sangre | 2004 | Parque Lecocq, gato capturado en las cercanías sin ingresar al parque | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $M^{do,mol}$ |
| 6 | Uy | U51 | IIBCE | tejido | 2004 | Arerunguá | Salto | -31.6519 | -56.6617 | $M^{do,mol}$ |
| 7 | Uy | U52 | IIBCE | tejido | 2004 | Arerunguá | Salto | -31.6519 | -56.6617 | $M^{do,mol}$ |
| 8 | Uy | U53 | IIBCE | tejido | 2004 | Arerunguá | Salto | -31.6519 | -56.6617 | $H^{do,mol}$ |
| 9 | Uy | U54 | IIBCE | tejido | 2003 | Arerunguá | Salto | -31.6519 | -56.6617 | $M^{mol}$ |
| 10 | Uy | U57 | IIBCE | tejido | 2006 | Atropellado Luis Batlle Berres | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $M^{mol}$ |
| 11 | Uy | U58 | IIBCE | sangre y pelos | 2006 | Parque Lecocq, Donado por Dinama | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $M^{mol}$ |
| 12 | Uy | U59 | IIBCE | pelos | 2006 | Nacida en Parque Lecocq, madre y padre capturados en la zona | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $H^{do}$ |
| 13 | Uy | U70 | IIBCE | sangre | 2012 | Parque Lecocq, capturado en la zona | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $H^{mol}$ |
| 14 | Uy | U71 | IIBCE | sangre | 2012 | Parque Lecocq, capturado en la zona | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $H^{mol}$ |
| 15 | Uy | U81 | IIBCE | tejido | 2013 | Ruta 8 Km436, Centurión | Cerro Largo | -32.1470 | -53.7990 | $H^{mol}$ |
| 16 | Uy | U82 | MNHN6408 | tejido | 1995 | R.9 km189 | Rocha | -34.6320 | -54.4620 | $M^{do,mol}$ |
| 17 | Uy | U104 | IIBCE | pelos y sangre | 2014 | Parque Lecocq, capturado en la zona | Montevideo | -34.7919 | -56.3325 | $M^{mol}$ |
| 18 | Uy | U108 | IIBCE | tejido | 2014 | R 10 km 256 | Rocha | -34.4422 | -53.9303 | $H^{mol}$ |

| Nro. | País | Acrónimo IIBCE | Colección | Muestra | Año | Localidad | Dpto./Provincia/Estado | Latitud | Longitud | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 19 | Uy | U112 | IIBCE | tejido | 2014 | R 26 km 426, cercanías Melo | Cerro Largo | -32.4290 | -54.1590 | $H^{mol}$ |
| 20 | Uy | U120 | IIBCE | pelos | 2014 | Zoo Santa Teresa, capturado en dpto. de Rocha | Rocha | -34.0328 | -53.5397 | $M^{mol}$ |
| 21 | Uy | U121 | IIBCE | tejido | 2014 | R9 próximo a caminería | Rocha | -34.3937 | -54.1064 | $H^{mol}$ |
| 22 | Uy | U123 | MNHN305 | tejido | 1956 | Artigas, Paso de Ramos, Río Cuareim | Artigas | -30.1540 | -56.7860 | $M^{mol}$ |
| 23 | Uy | U124 | MNHN3168 | tejido | 1988 | Flores, Aº Porongos, 3km al W de Paso de las Muchas | Flores | -33.3970 | -56.8340 | $M^{mol}$ |
| 24 | Uy | U128 | IIBCE | tejido | 2014 | Campo cerca a Reserva Tálice | Flores | -33.5027 | -56.9531 | $M^{mol}$ |
| 25 | Uy | U129 | MNHN309 | tejido | 1957 | Santa Lucía Chico | Florida | -34.2850 | -56.3140 | $H^{mol}$ |
| 26 | Uy | U130 | EMG1088 | tejido | 2011 | Quebrada de los Cuervos | Treinta y Tres | -32.8070 | -54.4500 | $M^{mol}$ |
| 27 | Uy | U131 | MNHN1265 | tejido | 1963 | Lavalleja, Estancia Bella Vista, Zapicán | Lavalleja | -33.5270 | -54.9550 | $H^{do,mol}$ |
| 28 | Uy | U134 | MNHN2022 | tejido | 1971 | Aº del Tigre 3km aguas arriba de barra con R. Cuareim | Artigas | -30.7370 | -56.1340 | $H^{do,mol}$ |
| 29 | Uy | U135 | MNHN1352 | tejido | 1957 | Aº Tres Cruces Grande | Artigas | -30.2910 | -57.1400 | $M^{do,mol}$ |
| 30 | Uy | U136 | MNHN4738 | tejido | 1999 | Isla del Padre, Río Uruguay, frente a granja Perroni | Artigas | -30.4360 | -57.7760 | $M^{do}$ |
| 31 | Uy | U138 | MNHN4784 | tejido | 2004 | Entrada a Punta Ballena | Maldonado | -34.8970 | -55.0380 | $M^{do,mol}$ |
| 32 | Uy | U139 | IIBCE | tejido | 2014 | R60 Km31 | Rocha | -34.6414 | -55.2472 | $H^{mol}$ |
| 33 | Uy | U140 | MNHN4739 | tejido | 1994 | Río Cuareim, desembocadura del Aº Yacaré Cururú | Artigas | -30.1020 | -57.0640 | $M^{mol}$ |
| 34 | Uy | U141 | MNHN4666 | tejido | 2004 | Río Negro, Paso Aguiar | Cerro Largo | -32.2980 | -54.8400 | $M^{do}$ |
| 35 | Uy | U142 | MNHN2478 | tejido | 1971 | Aº Cololó | Soriano | -33.0900 | -57.9250 | $H^{do,mol}$ |
| 36 | Uy | U143 | MNHN1619 | tejido | 1964 | Aº Tigre | Colonia | -34.1600 | -58.1440 | $H^{do}$ |
| 37 | Uy | U144 | MNHN2021 | tejido | 1971 | Aº del Tigre 3km aguas arriba de barra con R. Cuareim | Artigas | -30.7370 | -56.1340 | $M^{do,mol}$ |
| 38 | Uy | U145 | MNHN4737 | tejido | 1999 | CALNU – 10 km al S de B. Unión | Artigas | -30.3440 | -57.6310 | $M^{do}$ |
| 39 | Uy | U152 | IIBCE | tejido | 2013 | Ruta 9 km 80,500 sobre puente de Arroyo Solís Grande | Canelones | -34.7111 | -55.4445 | $M^{mol}$ |
| 40 | Uy | U154 | IIBCE | tejido | 2013 | R. 26 | Paysandú | -31.8873 | -56.9519 | $M^{mol}$ |
| 41 | Uy | U166 | ECOBIO | tejido | 2015 | R8 km30 | Canelones | -34.7172 | -55.9473 | $M^{mol}$ |
| 42 | Uy | U167 | ECOBIO | tejido | 2015 | R11 km9 | San José | -34.3530 | -57.0352 | $M^{mol}$ |
| 43 | Uy | U181 | IIBCE | tejido | 2015 | R5 km193 | Durazno | -33.3147 | -56.4959 | $M^{mol}$ |
| 44 | Uy | U182 | IIBCE | tejido | 2013 | Cerro Largo sin datos. Se ubica en el centro del departamento | Cerro Largo | -32.2905 | -54.1605 | $M^{mol}$ |
| 45 | Uy | U183 | ECOBIO | tejido | 2015 | R 109 | Maldonado | -34.3192 | -54.6387 | $M^{mol}$ |
| 46 | Uy | U186 | IIBCE | tejido | 2015 | Cañada de Aceguá, R8 Km441 Seccional 5ta Cerro Largo | Cerro Largo | -32.0039 | -54.1338 | $M^{mol}$ |
| 47 | Uy | U188 | IIBCE | pelos | 2016 | Melilla | Montevideo | -34.7451 | -56.2789 | $M^{do,mol}$ |

| Nro. | País | Acrónimo IIBCE | Colección | Muestra | Año | Localidad | Dpto./Provincia/Estado | Latitud | Longitud | Sexo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 48 | Uy | U190 | IIBCE | feca | 2015 | Reserva Natural Salus | Lavalleja | -34.3806 | -55.3007 | $M^{mol}$ |
| 49 | Uy | U191 | IIBCE | feca | 2015 | Reserva Natural Salus | Lavalleja | -34.3985 | -55.3265 | $H^{mol}$ |
| 1 | Ar | U3 | IIBCE | tejido | 1999 | Ruta provincial 76, Partido de haprida | Buenos Aires | -37.3013 | -60.7138 | $M^{mol}$ |
| 2 | Ar | U4 | IIBCE | tejido | 1999 | Punta Indio, sobre ruta Provincial 11, Partido de Punta Indio | Buenos Aires | -35.3730 | -57.3330 | $M^{mol}$ |
| 3 | Ar | U7 | IIBCE | tejido | 1999 | Ruta Provincial 11, Rincón de Viedma, Partido de Chascomús | Buenos Aires | -35.6620 | -57.3270 | $M^{mol}$ |
| 4 | Ar | U9 | IIBCE | tejido | 1999 | Pta. Lara, Partido de Ensenada | Buenos Aires | -34.8392 | -57.8733 | $M^{mol}$ |
| 5 | Ar | U13 | IIBCE | tejido | 1998 | Esq. De Crotto, Ruta provincial 11, Partido de Tordillo | Buenos Aires | -36.3011 | -57.3813 | $M^{mol}$ |
| 6 | Ar | U14 | IIBCE | tejido | 1999 | Reserva Provincial La Saeada Gde. Partido de Madariaga | Buenos Aires | -37.0679 | -57.1726 | $M^{mol}$ |
| 7 | Ar | U15 | IIBCE | tejido | 1999 | Ea Ensenada de San Martín, Partido de Castelli | Buenos Aires | -35.8864 | -57.6772 | $H^{mol}$ |
| 8 | Ar | U146 | BA10 | tejido | 2009 | R 7, pasando Luján | Buenos Aires | -34.5385 | -59.1648 | $H^{mol}$ |
| 9 | Ar | U147 | BA16 | tejido | 2009 | Diego Gaynor | Buenos Aires | -34.2825 | -59.2278 | $H^{mol}$ |
| 10 | Ar | U149 | BA62 | tejido | 1999 | Delta del Paraná | Buenos Aires | -34.0467 | -58.3883 | $M^{mol}$ |
| 11 | Ar | U150 | ER18 | tejido | 2011 | R 14, a 19 km de Ceibas | Entre Ríos | -33.3519 | -58.7263 | $M^{mol}$ |
| 12 | Ar | U151 | ER19 | tejido | 2011 | R 12, a 5km de Ceibas | Entre Ríos | -33.5408 | -58.7919 | $M^{mol}$ |
| 1 | Br | U157 | bLge75 | tejido | 2003 | Município de Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Estância Santa Helena | Rio Grande do Sul | -32.1777 | -52.9920 | $H^{mol}$ |
| 2 | Br | U158 | bLge76 | tejido | 2004 | Município de Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Estância Santa Helena | Rio Grande do Sul | -32.1777 | -52.9920 | $M^{mol}$ |
| 3 | Br | U159 | bLge78 | tejido | 2004 | Município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Estação Ecológica do Taim | Rio Grande do Sul | -32.5766 | -52.5611 | $M^{mol}$ |
| 4 | Br | U160 | bLge28 | tejido | 1997 | Rodovia BR-116, entre municípios de Tapes e Arambaré | Rio Grande do Sul | -30.7516 | -51.6344 | $M^{mol}$ |
| 5 | Br | U161 | MCNT006 | tejido | 2000 | Estado:RS, Municipio: Itaqui | Rio Grande do Sul | -29.1902 | -56.5367 | $M^{do,mol}$ |
| 6 | Br | U162 | MCNT030 | tejido | 2000 | Estado:RS, Municipio: Alegrete | Rio Grande do Sul | -29.7788 | -55.8195 | $M^{do,mol}$ |
| 7 | Br | U163 | MCNT036 | tejido | 2006 | Estado:RS, Municipio:Pelotas, Localidad:Vale do quilombo | Rio Grande do Sul | -29.3893 | -50.8429 | $H^{do,mol}$ |
| 8 | Br | U164 | MCNT038 | tejido | 2005 | Estado: RS, Municipio: Guaíba, Localidad: BR116 | Rio Grande do Sul | -30.1561 | -51.3721 | $M^{mol}$ |
| 9 | Br | U165 | MCNT039 | tejido | 2006 | Estado:RS, Municipio: Pelotas | Rio Grande do Sul | -31.6601 | -52.3340 | $H^{do,mol}$ |

Anexo II. Matriz de genotipos. Se detalla el país de procedencia de cada muestra: Uruguay (Uy), Argentina (Ar), Brasil (Br). Para cada locus se muestran los dos alelos caracterizados para cada muestra (al1 y al2) y el multiplex al cual pertenece. La ausencia de datos está codificada como "000".

| País | Muestra | Multiplex A | | | | | | Multiplex B | | | | | | Multiplex C | | | | | | Multiplex D | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | FCA304 | | FCA742 | | FCA096 | | FCA124 | | F42 | | FCA391 | | FCA126 | | FCA424 | | FCA146 | | FCA043 | | FCA 187 | |
| | | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 | al1 | al2 |
| Uy | U33 | 108 | 110 | 113 | 125 | 210 | 210 | 175 | 179 | 216 | 234 | 223 | 227 | 126 | 128 | 176 | 182 | 130 | 134 | 117 | 119 | 167 | 171 |
| Uy | U36 | 108 | 114 | 117 | 125 | 210 | 210 | 179 | 183 | 228 | 234 | 227 | 231 | 128 | 130 | 176 | 176 | 134 | 134 | 117 | 125 | 163 | 167 |
| Uy | U38 | 114 | 116 | 101 | 117 | 206 | 214 | 175 | 187 | 220 | 230 | 223 | 223 | 120 | 122 | 176 | 176 | 130 | 136 | 119 | 125 | 169 | 171 |
| Uy | U47 | 108 | 114 | 121 | 147 | 208 | 210 | 179 | 179 | 242 | 246 | 223 | 239 | 118 | 128 | 168 | 176 | 128 | 130 | 117 | 121 | 167 | 169 |
| Uy | U48 | 108 | 114 | 117 | 121 | 216 | 222 | 187 | 187 | 220 | 234 | 223 | 223 | 122 | 126 | 176 | 176 | 130 | 134 | 125 | 129 | 171 | 175 |
| Uy | U51 | 108 | 108 | 099 | 107 | 202 | 202 | 175 | 175 | 230 | 242 | 223 | 235 | 120 | 122 | 176 | 176 | 130 | 132 | 125 | 131 | 167 | 169 |
| Uy | U52 | 108 | 108 | 101 | 117 | 206 | 218 | 175 | 175 | 222 | 238 | 219 | 235 | 122 | 122 | 176 | 182 | 132 | 134 | 119 | 125 | 167 | 169 |
| Uy | U53 | 112 | 114 | 125 | 147 | 210 | 222 | 179 | 183 | 216 | 246 | 223 | 231 | 122 | 122 | 172 | 182 | 132 | 136 | 115 | 121 | 163 | 167 |
| Uy | U54 | 106 | 106 | 121 | 121 | 210 | 214 | 179 | 183 | 222 | 226 | 223 | 223 | 118 | 128 | 176 | 182 | 134 | 134 | 119 | 125 | 169 | 173 |
| Uy | U57 | 108 | 108 | 117 | 125 | 200 | 200 | 179 | 183 | 216 | 246 | 223 | 231 | 122 | 128 | 176 | 176 | 134 | 136 | 119 | 127 | 167 | 167 |
| Uy | U58 | 108 | 114 | 101 | 125 | 222 | 224 | 175 | 187 | 220 | 234 | 223 | 229 | 124 | 124 | 176 | 176 | 130 | 136 | 119 | 127 | 169 | 171 |
| Uy | U59 | 114 | 116 | 117 | 117 | 000 | 000 | 179 | 179 | 220 | 230 | 219 | 223 | 126 | 128 | 176 | 180 | 000 | 000 | 119 | 125 | 167 | 175 |
| Uy | U70 | 108 | 108 | 117 | 117 | 188 | 188 | 175 | 179 | 234 | 242 | 219 | 223 | 130 | 132 | 176 | 176 | 000 | 000 | 119 | 123 | 169 | 169 |
| Uy | U71 | 114 | 124 | 117 | 117 | 000 | 000 | 175 | 179 | 220 | 220 | 000 | 000 | 122 | 122 | 176 | 176 | 134 | 136 | 117 | 123 | 169 | 169 |
| Uy | U81 | 108 | 110 | 117 | 121 | 200 | 200 | 175 | 201 | 216 | 230 | 223 | 223 | 124 | 132 | 176 | 176 | 116 | 132 | 117 | 119 | 167 | 167 |
| Uy | U82 | 000 | 000 | 000 | 000 | 202 | 210 | 175 | 175 | 222 | 230 | 223 | 223 | 118 | 128 | 176 | 180 | 134 | 134 | 117 | 123 | 167 | 171 |
| Uy | U104 | 108 | 114 | 101 | 133 | 200 | 200 | 175 | 179 | 230 | 234 | 223 | 227 | 122 | 122 | 176 | 176 | 132 | 134 | 119 | 125 | 167 | 171 |
| Uy | U108 | 108 | 116 | 101 | 125 | 212 | 220 | 175 | 179 | 230 | 230 | 223 | 231 | 122 | 126 | 176 | 176 | 130 | 136 | 119 | 123 | 167 | 169 |
| Uy | U112 | 108 | 114 | 101 | 133 | 210 | 218 | 175 | 183 | 234 | 242 | 223 | 235 | 118 | 124 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 127 | 169 | 175 |
| Uy | U120 | 112 | 114 | 101 | 121 | 192 | 210 | 175 | 175 | 226 | 234 | 223 | 227 | 122 | 122 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 131 | 167 | 169 |
| Uy | U121 | 000 | 000 | 101 | 121 | 000 | 000 | 179 | 183 | 222 | 242 | 223 | 223 | 122 | 122 | 182 | 182 | 130 | 134 | 119 | 121 | 163 | 167 |
| Uy | U123 | 108 | 114 | 113 | 113 | 200 | 200 | 175 | 179 | 220 | 250 | 223 | 235 | 120 | 122 | 176 | 176 | 124 | 136 | 125 | 125 | 167 | 169 |
| Uy | U124 | 116 | 116 | 117 | 125 | 000 | 000 | 171 | 175 | 222 | 230 | 227 | 235 | 120 | 122 | 176 | 176 | 132 | 134 | 117 | 127 | 167 | 169 |
| Uy | U128 | 108 | 108 | 113 | 117 | 196 | 214 | 179 | 187 | 220 | 226 | 231 | 235 | 120 | 122 | 176 | 180 | 130 | 134 | 115 | 117 | 167 | 169 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Uy | U129 | 112 | 112 | 113 | 121 | 206 | 212 | 183 | 187 | 220 | 222 | 231 | 235 | 122 | 122 | 176 | 180 | 128 | 132 | 119 | 121 | 167 | 169 |
| Uy | U130 | 112 | 112 | 101 | 129 | 194 | 206 | 175 | 175 | 222 | 226 | 231 | 231 | 122 | 126 | 176 | 176 | 134 | 136 | 119 | 121 | 165 | 167 |
| Uy | U131 | 108 | 108 | 125 | 129 | 206 | 208 | 175 | 175 | 222 | 226 | 227 | 231 | 118 | 122 | 176 | 180 | 130 | 134 | 115 | 121 | 169 | 169 |
| Uy | U134 | 112 | 124 | 101 | 113 | 000 | 000 | 175 | 179 | 222 | 230 | 000 | 000 | 128 | 130 | 176 | 180 | 116 | 128 | 119 | 129 | 167 | 175 |
| Uy | U135 | 114 | 114 | 117 | 133 | 000 | 000 | 175 | 183 | 216 | 246 | 227 | 227 | 122 | 122 | 176 | 180 | 132 | 134 | 117 | 119 | 167 | 167 |
| Uy | U136 | 116 | 116 | 117 | 125 | 000 | 000 | 175 | 183 | 222 | 246 | 219 | 227 | 120 | 122 | 176 | 176 | 116 | 132 | 125 | 125 | 167 | 167 |
| Uy | U138 | 116 | 116 | 101 | 129 | 206 | 218 | 175 | 175 | 222 | 226 | 227 | 231 | 122 | 126 | 176 | 180 | 134 | 136 | 119 | 121 | 165 | 167 |
| Uy | U139 | 108 | 108 | 125 | 125 | 210 | 218 | 171 | 175 | 220 | 222 | 219 | 231 | 122 | 122 | 168 | 176 | 132 | 134 | 117 | 121 | 169 | 169 |
| Uy | U140 | 108 | 108 | 117 | 125 | 198 | 210 | 183 | 183 | 220 | 222 | 201 | 227 | 122 | 122 | 176 | 176 | 132 | 134 | 119 | 127 | 163 | 171 |
| Uy | U141 | 112 | 112 | 099 | 129 | 178 | 184 | 175 | 175 | 222 | 226 | 231 | 231 | 122 | 122 | 176 | 180 | 132 | 134 | 119 | 121 | 165 | 167 |
| Uy | U142 | 112 | 114 | 121 | 125 | 184 | 184 | 179 | 179 | 216 | 234 | 219 | 223 | 128 | 128 | 176 | 176 | 124 | 134 | 125 | 129 | 167 | 175 |
| Uy | U143 | 132 | 138 | 117 | 125 | 200 | 200 | 179 | 187 | 222 | 234 | 219 | 231 | 122 | 128 | 176 | 176 | 136 | 136 | 119 | 127 | 169 | 171 |
| Uy | U144 | 108 | 124 | 101 | 101 | 000 | 000 | 175 | 175 | 222 | 234 | 227 | 227 | 122 | 128 | 176 | 176 | 116 | 136 | 119 | 127 | 167 | 169 |
| Uy | U145 | 118 | 118 | 121 | 147 | 210 | 210 | 175 | 175 | 234 | 246 | 223 | 227 | 122 | 122 | 176 | 176 | 136 | 138 | 125 | 125 | 167 | 167 |
| Uy | U152 | 112 | 114 | 117 | 119 | 202 | 210 | 171 | 175 | 228 | 232 | 223 | 223 | 122 | 126 | 168 | 176 | 134 | 134 | 121 | 125 | 163 | 171 |
| Uy | U154 | 114 | 116 | 125 | 125 | 204 | 210 | 171 | 175 | 216 | 230 | 219 | 223 | 120 | 130 | 176 | 176 | 130 | 130 | 129 | 131 | 167 | 167 |
| Uy | U166 | 112 | 114 | 117 | 125 | 214 | 224 | 175 | 179 | 234 | 234 | 219 | 227 | 120 | 122 | 174 | 174 | 134 | 134 | 119 | 121 | 167 | 171 |
| Uy | U167 | 108 | 108 | 129 | 129 | 188 | 212 | 175 | 179 | 228 | 234 | 227 | 227 | 122 | 130 | 174 | 180 | 134 | 134 | 117 | 119 | 167 | 175 |
| Uy | U181 | 000 | 000 | 121 | 125 | 000 | 000 | 171 | 175 | 216 | 246 | 223 | 223 | 122 | 130 | 176 | 176 | 116 | 130 | 117 | 119 | 167 | 169 |
| Uy | U182 | 108 | 116 | 117 | 121 | 000 | 000 | 175 | 175 | 216 | 222 | 219 | 223 | 120 | 122 | 176 | 176 | 134 | 134 | 117 | 119 | 169 | 171 |
| Uy | U183 | 114 | 114 | 113 | 121 | 200 | 200 | 175 | 175 | 216 | 234 | 227 | 227 | 122 | 122 | 176 | 180 | 134 | 134 | 119 | 119 | 171 | 175 |
| Uy | U186 | 108 | 112 | 117 | 125 | 000 | 000 | 175 | 179 | 230 | 234 | 231 | 235 | 122 | 126 | 176 | 176 | 132 | 132 | 125 | 125 | 165 | 167 |
| Uy | U188 | 114 | 116 | 121 | 125 | 192 | 206 | 175 | 183 | 234 | 246 | 231 | 231 | 122 | 126 | 176 | 176 | 130 | 130 | 117 | 125 | 167 | 171 |
| Uy | U190 | 112 | 112 | 101 | 125 | 220 | 226 | 183 | 183 | 220 | 226 | 223 | 227 | 120 | 126 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 125 | 167 | 173 |
| Uy | U191 | 108 | 114 | 125 | 125 | 202 | 214 | 175 | 183 | 222 | 222 | 219 | 223 | 122 | 126 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 125 | 163 | 175 |
| Ar | U3 | 116 | 122 | 121 | 125 | 000 | 000 | 179 | 183 | 234 | 234 | 227 | 227 | 118 | 128 | 168 | 176 | 130 | 134 | 125 | 129 | 167 | 169 |
| Ar | U4 | 112 | 112 | 115 | 117 | 222 | 224 | 171 | 171 | 234 | 238 | 223 | 227 | 122 | 130 | 168 | 176 | 132 | 132 | 125 | 129 | 169 | 169 |
| Ar | U7 | 112 | 114 | 101 | 121 | 214 | 216 | 175 | 187 | 234 | 242 | 223 | 223 | 120 | 124 | 176 | 176 | 132 | 134 | 111 | 129 | 167 | 175 |
| Ar | U9 | 108 | 114 | 115 | 121 | 212 | 212 | 183 | 191 | 222 | 234 | 223 | 235 | 126 | 126 | 176 | 176 | 124 | 130 | 125 | 129 | 167 | 175 |
| Ar | U13 | 112 | 118 | 119 | 155 | 204 | 222 | 183 | 187 | 242 | 250 | 223 | 227 | 118 | 126 | 176 | 176 | 130 | 130 | 125 | 129 | 167 | 175 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ar | U14 | 110 | 112 | 119 | 125 | 222 | 224 | 187 | 187 | 216 | 242 | 227 | 227 | 118 | 128 | 168 | 176 | 124 | 134 | 117 | 125 | 169 | 171 |
| Ar | U15 | 114 | 114 | 101 | 113 | 208 | 208 | 175 | 187 | 234 | 238 | 219 | 219 | 118 | 128 | 176 | 176 | 132 | 132 | 125 | 129 | 167 | 169 |
| Ar | U146 | 114 | 114 | 113 | 121 | 212 | 228 | 183 | 187 | 234 | 238 | 219 | 223 | 124 | 124 | 176 | 176 | 124 | 132 | 117 | 129 | 167 | 169 |
| Ar | U147 | 108 | 114 | 101 | 151 | 210 | 212 | 179 | 187 | 236 | 240 | 223 | 223 | 118 | 120 | 168 | 176 | 124 | 134 | 115 | 121 | 167 | 169 |
| Ar | U149 | 112 | 120 | 117 | 129 | 000 | 000 | 183 | 187 | 218 | 232 | 223 | 223 | 118 | 124 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 119 | 167 | 167 |
| Ar | U150 | 112 | 114 | 121 | 121 | 216 | 218 | 179 | 179 | 232 | 232 | 223 | 223 | 124 | 124 | 168 | 176 | 130 | 134 | 119 | 121 | 171 | 173 |
| Ar | U151 | 108 | 112 | 099 | 123 | 000 | 000 | 179 | 179 | 218 | 244 | 223 | 223 | 122 | 124 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 129 | 167 | 171 |
| Br | U157 | 112 | 124 | 121 | 125 | 206 | 210 | 175 | 175 | 234 | 238 | 215 | 227 | 118 | 132 | 176 | 176 | 134 | 136 | 119 | 129 | 169 | 175 |
| Br | U158 | 108 | 114 | 121 | 121 | 220 | 220 | 171 | 171 | 220 | 234 | 223 | 229 | 122 | 128 | 176 | 176 | 116 | 134 | 119 | 121 | 167 | 167 |
| Br | U159 | 114 | 116 | 101 | 125 | 220 | 220 | 171 | 175 | 220 | 230 | 219 | 231 | 120 | 122 | 176 | 176 | 132 | 134 | 119 | 127 | 167 | 175 |
| Br | U160 | 108 | 124 | 113 | 117 | 206 | 212 | 175 | 175 | 216 | 226 | 219 | 223 | 122 | 130 | 176 | 176 | 124 | 134 | 119 | 125 | 171 | 171 |
| Br | U161 | 108 | 110 | 121 | 125 | 194 | 194 | 179 | 183 | 216 | 242 | 215 | 223 | 120 | 126 | 176 | 182 | 124 | 136 | 119 | 125 | 167 | 167 |
| Br | U162 | 124 | 124 | 101 | 101 | 212 | 212 | 171 | 171 | 220 | 242 | 223 | 231 | 120 | 126 | 176 | 176 | 130 | 134 | 115 | 125 | 167 | 169 |
| Br | U163 | 102 | 112 | 125 | 129 | 000 | 000 | 171 | 171 | 222 | 234 | 225 | 229 | 120 | 122 | 176 | 176 | 132 | 136 | 115 | 125 | 169 | 175 |
| Br | U164 | 000 | 000 | 099 | 117 | 000 | 000 | 175 | 183 | 222 | 222 | 219 | 223 | 120 | 132 | 176 | 176 | 134 | 134 | 123 | 131 | 169 | 171 |
| Br | U165 | 000 | 000 | 121 | 121 | 200 | 200 | 175 | 179 | 230 | 234 | 219 | 223 | 122 | 128 | 176 | 176 | 134 | 134 | 119 | 125 | 167 | 169 |