



Roles ecológicos y conflictos antrópicos de los zorros del Uruguay



Mag. Natalia Mannise

Departamento de Biodiversidad y Genética- IIBCE

Tesis de Doctorado

PEDECIBA- Biología

Subárea Genética

Orientador: Dra. Susana González

Co- orientadores: Dra. Mariana Cosse

Dr. Andrés Iriarte

Integrantes del tribunal

Dra. Estela Castillo

Dr. Jesús E. Maldonado

Dra. Cecilia Da Silva

INDICE DE CONTENIDOS

1.	AGRADECIMIENTOS.....	1
2.	RESUMEN.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	4
	3.1. Los cánidos Sudamericanos.....	4
	3.2. Los cánidos de Uruguay.....	5
	3.3. Roles ecológicos de los cánidos.....	7
	3.4. Conflictos de los cánidos con actividades antrópicas.....	9
	3.5. Métodos genéticos no invasivos.....	11
4.	OBJETIVOS.....	22
5.	ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	23
6.	CAPITULO 1.....	24
	6.1. Introducción.....	24
	6.2. Preguntas planteadas.....	26
	6.3. Artículo publicado.....	28
7.	CAPÍTULO 2.....	37
	7.1. Introducción.....	37
	7.2. Preguntas planteadas.....	38
	7.3. Manuscrito para publicación.....	41
	7.4. Informe técnico.....	79
8.	CONCLUSIONES GENERALES.....	111
9.	PERSPECTIVAS.....	114

1. AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la tesis muchas personas me acompañaron y apoyaron para que pudiera llevarla a cabo.

Agradezco a mi Orientadora Susana González, a mis Co- orientadores Mariana Cosse y Andrés Iriarte, por el apoyo constante, la paciencia, la escucha y la confianza. A los integrantes del tribunal por sus valiosos comentarios que enriquecieron la tesis.

Esta tesis fue realizada en el marco del Fondo Sectorial de Salud Animal de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FSSA_X_2014_1_106026, Responsable: Carlos Robello) y por la cual obtuve una beca doctoral y fue financiado gran parte del proyecto. Además, se realizó en el marco del Proyecto Juntos Dejamos Huella (ONG Vida Silvestre-Salus) que financió el estudio en el Parque Salus.

A mis compañeros del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE, en especial a Nadia Bou, Yanina Leone, Claudia Elizondo, Antonella Bruno, Hernán Juan, Carolina Beloso, Federica Moreno, Leticia Bidegaray, Nadia Kazevas, Veronica Gonnet, Adriana Mimbacas y Sara Flores. A mis compañeros del Laboratorio de Biología Computacional del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, en especial a Mauricio Langleib, Javier Calvello y Hernán Juan por la ayuda y la paciencia en bioinfo.

Quiero agradecer especialmente a Carlos Robello, Andrés Cabrera, Eugenia Francia, Federico Giantitti y Gonzalo Greiff por su apoyo y colaboración a lo largo de la tesis.

Al Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) por su apoyo, en particular a Javier Frade y a los dueños de los campos de cría ovina Pablo Márquez y Álvaro Mendez que generosamente me dejaron realizar allí los muestreos. Al INIA La Estanzuela por su apoyo y participación en los muestreos. Agradezco a la ONG Ecobio por su colaboración en los tejidos de animales atropellados, en particular a Felipe Montenegro y Hugo Coitiño.

A los que participaron con lluvia, frío o calor de las salidas de campo: Claudia, Yanina, Nadia, Mariana, Hernán y Felipe, gracias totales!.

Un especial gracias a mi familia Graciela, Nico, Jorge, Cata y Anto fundamentales en mi vida. A mis amigos y afectos de siempre, de ahora y que me fui haciendo en este camino. A todos los que me hicieron el aguante y tuvieron palabras amables que me dieron para adelante, a todos GRACIAS.

2. RESUMEN

Los zorros de campo (*Lycalopex gymnocercus*) y de monte (*Cerdocyon thous*) son las dos especies de cánidos nativos más ampliamente distribuidas en Uruguay. Son consideradas omnívoras generalistas y oportunistas. La amplitud de nicho trófico que poseen les confiere un rol importante en la regulación de los ecosistemas. Se ha documentado que contribuyen a la dispersión de semillas y pueden controlar las poblaciones de roedores y aves consideradas plagas para ciertos cultivos. Ambas especies de zorros son perseguidas por conflictos con actividades agropecuarias ya que son consideradas depredadoras de ovinos. Los conflictos entre cánidos nativos y actividades antrópicas se han visto incrementados por el aumento de áreas de convivencia entre humanos- fauna silvestre, producto de la modificación de las áreas naturales en tierras para cultivo o cría de ganado. En este escenario, aumentan los riesgos de enfermedades emergentes y eventos de transmisión de parásitos entre fauna silvestre y ganado. Sin embargo, debido a los hábitos alimenticios generalistas y el nivel trófico que ocupan los zorros de campo y de monte, son potenciales especies centinelas de la salud ecológica. Esta última es una transdisciplina que comprende la salud humana, animal y ecosistémica, estudiando la emergencia de agentes infecciosos (parásitos y contaminantes). En esta tesis se analizan los roles tróficos de los zorros de campo y de monte en los agroecosistemas de Uruguay, así como también la presencia de parásitos en los zorros que pueden afectar al ganado. Para ello se utilizaron métodos de muestreo genéticos no invasivo (fecas colectadas en el ambiente y restos de animales atropellados) y se desarrollaron herramientas moleculares que posibilitaron el análisis de muestras depositadas en el ambiente. Por un lado, el diseño de sondas TaqMan™ y amplificación por PCR en tiempo real, permitió determinar la presencia de dos protozoarios parásitos Coccidea Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Hammondia spp.*) en zorros de Uruguay. Dichos parásitos causan abortos en ganado y diversas especies de cánidos participan del ciclo de vida de

N. caninum liberando ooquistes con sus fecas. A pesar de que no se encontraron ooquistes en las fecas, este constituye el primer registro de ADN de *N. caninum* en fecas de zorro de campo. También se registró ADN de *N. caninum* en un tejido de un zorro de campo atropellado, y *T. gondii* fue encontrado en tejidos de zorro de campo (n= 1) y de monte (n= 1) atropellados. El porcentaje de detección de muestras positivas para ambos parásitos fue bajo (2,5%) y por consiguiente indican un riesgo menor de transmisión al ganado. Por otro lado, mediante técnicas de *metabarcoding* de ADN se identificaron los taxones vertebrados que componen la dieta del zorro de monte y de campo, y se propone una estrategia mediante construcción de redes de haplotipos que permite analizar la variabilidad genética de las especies detectadas en las fecas. Los taxones vertebrados encontrados en la dieta exhibieron variaciones (interespecíficas e intraespecíficas), tanto en función de la época del año como entre las tres áreas muestreadas. Se detectaron mamíferos, aves, anfibios, reptiles y peces; siendo los mamíferos más frecuentes en todos los casos para ambas especies de zorros. Dentro de los mamíferos se resalta la presencia de roedores, liebres, mulitas y ganado (ovino y bovino). A pesar de que se reportó ADN ovino en fecas de zorros colectadas en establecimientos ganaderos, no se encontraron diferencias significativas que destaquen su consumo durante la parición ovina. Debido a los hábitos carroñeros de las especies aquí analizadas, se propone la forma de consumo por carroña, placenta y otros restos. Sin embargo, es necesario profundizar sobre las formas de consumo para una mejor comprensión sobre el conflicto de depredación. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de los roles tróficos y a la transmisión de parásitos de los zorros de Uruguay. Asimismo, aportan información para una mejor comprensión sobre los conflictos de estas especies en torno a la depredación y a su potencial papel como especies centinelas de la salud ecológica.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Los cánidos Sudamericanos

En América del Sur existe una alta diversidad dentro de la Familia Canidae (Wozencraft 1993). Este linaje habitó exclusivamente el territorio Norteamericano por aproximadamente 30 millones de años. A partir de allí se dispersó a múltiples regiones, llegando a América del Sur en el Plioceno tardío (Castelló 2018). Este evento generó una gran diversidad de taxones representada por diez especies vivientes (Wozencraft 1993).

Los cánidos endémicos de América del Sur forman un grupo filogenético independiente, que incluye el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*), el zorro de orejas cortas (*Atelocynus microtis*), el zorro vinagre (*Speothos venaticus*), el zorro de monte (*Cerdocyon thous*) y las seis especies del género *Lycalopex* (Castelló 2018; Perini et al 2010). Si bien el grupo está más relacionado filogenéticamente con los cánidos del Género *Canis* como los lobos, la mayoría de los cánidos Sudamericanos se describen como similares a los zorros aunque presentan variaciones en tamaño y morfología (Castelló 2018).

La mayoría de los cánidos Sudamericanos son considerados solitarios (forman parejas solo durante la época reproductiva) y omnívoros (Castelló 2018). Se conoce poco acerca de la abundancia y distribución de la mayoría de estas especies y por lo tanto se requiere un monitoreo cuidadoso de las mismas que permita su conservación y supervivencia (Castelló 2018).

3.2. Los canidos de Uruguay

En Uruguay habitan tres especies de cánidos silvestres nativos y una especie doméstica exótica (perro doméstico, *Canis lupus familiaris*). Las especies autóctonas son el zorro de monte (*Cerdocyon thous*), zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) y el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) (González & Martínez- Lanfranco 2012).

El aguará guazú es el mayor canido sudamericano. En Uruguay es considerado amenazado y existen escasos registros actuales (González et al 2013; González and Martínez- Lanfranco 2012; Dietz 1985). Los últimos registros para la especie fueron en el 2006 en el departamento de Cerro Largo y recientemente en 2021 en Salto (Otheguy 2021; Mannise et al 2012; Queirolo et al 2011). Se ha sugerido que estos registros corresponden principalmente a individuos que se desplazan desde poblaciones cercanas en busca de recursos para sobrevivir y reproducirse (Mannise et al 2017; Mannise et al 2012).

El zorro de campo y el zorro de monte son las dos especies de canidos nativos más ampliamente distribuidas en el territorio uruguayo (González and Martínez- Lanfranco 2012; Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000). Ambas son muy similares en tamaño corporal, consideradas de tamaño mediano (Di Bitetti et al 2009; Tchaicka et al 2007; Berta 1982). Sin embargo, presentan rangos distintivos en la coloración del pelaje y el tipo de ambiente que ocupan. Por un lado, el zorro de campo es principalmente grisáceo, con una banda oscura en la porción dorsal de su tronco y cola. Ventralmente es de color gris pálido y blanco (Lucherini et al 2004). Esta especie ocupa praderas y pasturas modificadas para ganadería que se extienden desde el este de Bolivia hasta el norte y centro de Argentina (Lucherini and Luengos Vidal 2008^a; Lucherini et al 2004) (Fig. 1). Por otro lado, el zorro de monte posee coloración marrón grisácea con el lomo oscuro al igual que las puntas de las orejas, porción distal de las patas y la zona entre las mandíbulas (Tchaicka et al 2007; Berta 1982). Es una especie versátil que habita selvas tropicales y subtropicales, sabanas, cerrado, catinga, bosques de galería y mata Atlántica que se extienden desde Venezuela hasta Uruguay (su límite sur de la distribución)

(Courtenay and Maffei 2008) (Fig. 1). Tanto el zorro de monte como de campo son considerados omnívoros generalistas y oportunistas, ya que se alimentan de frutos, invertebrados y vertebrados (Farias and Kittlein 2008; Lucherini and Luengos Vidal 2008; Tchaicka et al 2007; García and Kittlein 2005).

En áreas donde ambas especies de zorros ocurren en simpatría (Fig. 1), se observó, que el zorro de monte ocupa diversos ambientes (bosques, zonas arenosas y de arbustos); mientras que el zorro de campo fue registrado únicamente en pastizales o zonas abiertas (Di Bitetti et al 2009; Faria-Correa et al 2008; Vieira and Port 2007). Si bien no se registraron diferencias en la composición de la dieta, se detectaron patrones de actividad diferenciales. Cuando se encuentran presentes ambas especies, el zorro de monte se mantiene activo mayormente en la noche y el de campo reduce su actividad en dichos momentos, facilitando la coexistencia (Di Bitetti et al 2009; Vieira and Port 2007). De esta manera se sugirió la posible presencia de segregación temporal entre ambas especies debido a la plasticidad del comportamiento del zorro de campo (Di Bitetti et al 2009; Lucherini et al 2004; Cravino et al 1997). Los autores plantean que el zorro de campo sería competitivamente subordinado frente al zorro de monte. Sin embargo, esta hipótesis debe ser testeada a través de estudios que analicen detalladamente su dieta, patrones de actividad, interacciones sociales y ámbitos hogares en áreas en que se encuentren en simpatría y alopatría (Di Bitetti et al 2009).

En Uruguay se han realizado estudios previos en estas dos especies de cánidos nativos (Juan 2019; Cosse et al 2017; Grattarola 2015; Lassevich 2014; Carlozzi 2011; Hernández Rodríguez 2007; Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000; Cravino et al 1997). Desde el punto de vista genético, para zorro de monte se registraron altos niveles de variabilidad tanto con marcadores de ADN mitocondrial (*D-loop* y *Citocromo b*) como con loci de microsatélites nucleares (Carlozzi 2011; Lassevich 2014). De hecho, los loci de microsatélites reportaron que los zorros de monte pertenecían a una misma población genética (Grattarola 2015; Lassevich 2014). En contraste, análisis de la estructuración genética poblacional de zorro de campo revelaron la presencia de dos identidades genéticas distintas en el territorio nacional. La presencia de estos grupos genéticos no se corresponde con aislamiento por distancia o patrones geográficos, por lo que podría

tratarse de una zona de contacto entre dos poblaciones. Para confirmarlo, es necesario incluir muestras en un rango geográfico más amplio (Juan 2019).

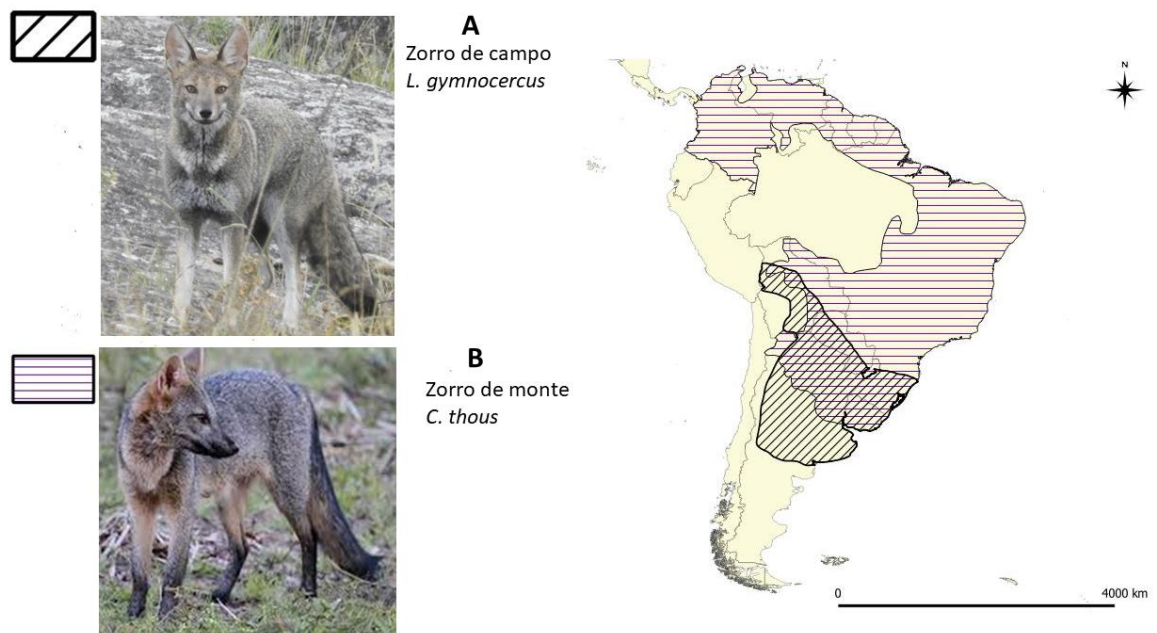


Figura 1: Distribución geográfica del zorro de campo (A) (*Lycalopex gymnocercus*) y zorro de monte (B) (*Cerdocyon thous*) en América del Sur.

3.3. Roles ecológicos de los cánidos

Los canidos silvestres cumplen un rol fundamental en la estructura y composición de los ecosistemas, por lo cual su disminución o remoción impacta sobre la biodiversidad y funcionalidad de los sistemas naturales (Ripple et al 2014). Los estudios de ecología trófica en zorro de campo y de monte revelaron que son omnívoros generalistas y oportunistas.

La dieta de zorro de monte fue analizada en distintas áreas (Cravino 2015; Hernández Rodríguez 2007; Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000; Cravino et al 1997). Mediante observación, empleando lupa binocular y a partir de fecas colectadas en el Parque Nacional San Miguel (Rocha), se detectó que la mayoría de los ítems vegetales pertenecían a frutos, predominantemente frutos de palmas (Cravino 2015; Hernández Rodríguez 2007). En 2007 la mayoría de los restos animales fueron identificados como

artrópodos (52, 3%), seguido por vertebrados (21%) (Hernández Rodríguez 2007). Sin embargo, en 2015 los restos de pequeños mamíferos fueron predominantes (Cravino 2015). En la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa (Rocha) se reportó que el zorro de monte presenta una dieta omnívora con variación estacional (Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000). Se propone su potencial rol como agente dispersor de semillas, ya que se encontró una distancia de dispersión y relocalización de las semillas hacia sitios favorables para su germinación y se observaron plántulas en desarrollo en las heces (Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000). Con respecto al zorro de campo, existen observaciones sobre forrajeo en frutos de la palma pindó y yatay (Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000).

De esta manera, desempeñan una función importante en la dispersión de semillas y control de las poblaciones de sus presas tanto de vertebrados como invertebrados (Bossi et al 2019; Cazetta and Galetti 2009; Vieira and Port 2007; Varela and Bucher 2006; Sillero-Zubiri et al 2004; Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000). Se sabe que los roedores y liebres son un componente relevante en la dieta de estos cánidos; sin embargo, se ha determinado que la carroña representa un alto porcentaje de la biomasa ingerida (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Lucherini and Luengos Vidal 2008). El consumo de carroña es descrito como un componente relevante en la dieta de zorro de campo, confiriéndole un papel importante en la descomposición de la materia (Lucherini and Luengos Vidal 2008).

Numerosas especies de cánidos pueden servir como centinelas de la salud ecológica y desempeñan un papel crítico en la detección de parásitos emergentes (Aguirre 2009). Dado el nivel trófico que ocupan y sus hábitos alimenticios generalistas, el zorro de campo y de monte son candidatos ideales como centinelas de los patógenos circulantes (Aguirre 2009). El estudio de enfermedades y sus patógenos asociados en un contexto ecológico permite atender la salud en un sentido amplio, incluyendo el impacto que tiene la permanencia y transmisión de enfermedades (Aguirre 2009).

La pérdida de áreas naturales es cada vez mayor, tornándose necesario conocer la función ecológica de la diversidad biológica y los servicios que brindan (Benayas et al 2009). Los servicios ecosistémicos son bienes públicos, difíciles de medir en términos económicos y por tanto su inclusión en la toma de decisiones resulta de bajo impacto

(Ottaviani and El-Hage Scialabba 2011; Costanza et al 1998). Sin embargo, una mejor comprensión de los roles que cumplen las especies contribuirá a la valorización de los servicios ecosistémicos que brindan y por consiguiente a una gestión de los recursos naturales que los incluya.

3.4. Conflictos de los cánidos con actividades antrópicas

La ganadería, los cultivos y la forestación han sustituido en gran medida los ambientes naturales del territorio nacional (Brazeiro et al 2008). La transformación de las áreas naturales en tierras para cultivo o cría de ganado, incrementa las áreas de convivencia entre humanos- fauna silvestre y por consiguiente aumentan los conflictos entre depredadores y actividades antrópicas (Prugh et al 2009). La razón más frecuente de los conflictos entre humanos y canidos está dada por la depredación de ganado (Sillero-Zubiri and Switzer 2004). En Argentina y Sur de Brasil el zorro de campo ha sido considerado un depredador importante de cabras y ovinos (Lucherini et al 2004). En Uruguay, los zorros de campo y de monte han sido perseguidos por conflictos con actividades agropecuarias (Rodríguez-Mazzini and Molina Espinosa 2000). Ambas especies eran cazadas ilegalmente para controlar los ocasionales ataques a animales domésticos de interés pecuario (González et al 2013; Langguth 1973). Un estudio de la década de los noventa en la Sierra de Mal Abrigo (Colonia) analizó mediante necropsias y signos de depredación en corderos el ataque de zorros de campo y de monte a ovinos (Cravino et al 1997). Se registró que la mayoría de los ataques suelen ser dirigidos sobre animales débiles (Cravino et al 1997). Los cambios en el mercado en los últimos años provocaron que el rubro lanar disminuyera más de un 25%, impactando sobre los productores ovinos de nuestro país ya que disminuyó el número de ovinos (Instituto Uruguay XXI 2017). Resulta urgente atender los planteos y preocupaciones del rubro lanar respecto al impacto de depredación de los zorros sobre sus majadas. A nivel global, los métodos tradicionales para manejar dicho conflicto entre humanos y canidos, han sido remover el depredador mediante captura con trampas, caza o envenenamiento. Estos constituyen controles indiscriminados que no son de simple aplicación y son poco efectivos a largo plazo. Además, el uso de veneno puede afectar tanto al ganado como a otras especies autóctonas dado que actúan de manera indistinta (Langguth 1973). Debido a las implicancias que podían tener las técnicas tradicionalmente usadas, la

búsqueda de alternativas no letales que previenen o reducen la incidencia de la depredación de ganado se ha visto incrementada en las últimas décadas. Uno de los aspectos más importantes del desarrollo de estas metodologías, es que ninguna estrategia es aplicable en todas las situaciones, incluso la combinación de algunas es necesaria para reducir significativamente el conflicto (Sillero-Zubiri et al 2004). En este sentido el Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) ha incentivado el uso de metodologías no letales. Se han implementado cercas eléctricas de 12 joules (6000 y 7000 voltios), perros de guardia (raza Maremmano), llamas y burros (Frade 2015). El paso inicial para reducir el conflicto entre los zorros y las actividades humanas es identificar el problema y visualizarlo de manera objetiva (Sillero-Zubiri et al 2004).

Otro conflicto fauna silvestre- humano surge con el desplazamiento de áreas naturales debido al incremento de actividades antrópicas. En estos contextos aumenta el contacto entre animales domésticos y silvestres, acrecentando el riesgo de enfermedades emergentes (Muñoz-García et al 2018; Deem et al 2001). Un caso emblemático de esta problemática es la presencia de brucelosis en el parque nacional Yellowstone (USA). Esta enfermedad es causada por una bacteria *Brucella* que a nivel mundial ocasiona abortos en ganado (Meagher and Meyer 1994). Durante la campaña de erradicación de la enfermedad en USA, se analizó la presencia de brucelosis en bisontes y alces que habitaban el Parque Nacional Yellowstone. Estos la habrían contraído a través del ganado siendo la fauna silvestre reservorio de esta bacteria en la actualidad (Meagher and Meyer 1994). De hecho, hasta el día de hoy existen campañas de control de *Brucella* en los animales silvestres del Parque Yellowstone, representando una preocupación sanitaria para el país (Meagher and Meyer 1994). En otro sentido, la transmisión de parásitos con ciclos de vida complejos tiene un alto impacto en las interacciones predador- presa entre huéspedes definitivos e intermediarios (Afonso et al 2013). Algunos helmintos y protozoarios presentan ciclos de vida de este tipo y representan el 25% de las especies de patógenos (Muñoz-García et al 2018; Afonso et al 2013). Estudios previos en zorro de campo y de monte han detectado la presencia de diversos parásitos protozoarios (*Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) y helmintos (*Echinococcus*) que causan enfermedades en ganado ovino y vacuno (Almeida et al 2019; Scioscia et al 2017a; Scioscia et al 2017b; Scioscia et al 2013; Catenacci et al., 2010; Soares

et al 2009; Cañón-Franco et al 2004). La presencia de protozoarios parásitos que pueden provocar abortos en ganado fue corroborada en fecas de estos cánidos silvestres ya que se detectó la presencia de *Sarcocystis spp.* en zorro de campo (Scioscia et al 2017a) y *Neospora caninum* en zorro de monte (Almeida et al 2019).

En nuestro territorio existen escasos análisis de los conflictos cánidos silvestres-humanos. En el caso de la depredación, los estudios o bien se han llevado a cabo hace más de 20 años o bien se han realizado en establecimientos puntuales y por lo tanto no es posible extrapolar los resultados obtenidos al momento actual ni a otros establecimientos. Respecto a los parásitos que causan abortos en ganado, no se encontraron estudios previos a esta tesis en la bibliografía consultada. En este sentido, es urgente profundizar en la comprensión del conflicto para tomar medidas basadas en información actualizada en el territorio uruguayo.

3.5. Métodos genéticos no invasivos

Los métodos de muestreo no invasivo permiten estudiar especies presentes en bajas densidades o con comportamiento elusivo. Su principal ventaja es que las muestras son depositadas en el ambiente y se colectan sin la necesidad de observar o capturar individuos. Se han realizado extracciones exitosas de ADN a partir de diversas fuentes, como pelo, fecas, orina, plumas y saliva (Smith and Wang 2014). Las muestras contienen tanto ADN mitocondrial (ADNmit) como nuclear; existen múltiples copias por célula de ADNmit (de cientos a miles) y generalmente dos copias del ADN nuclear (Waits and Paetkau 2005). En estudios de muestreo genético no invasivo los análisis de ADNmit permiten la identificación de especie y los de nuclear pueden ser utilizados para la determinación de sexo e individuo (Waits and Paetkau 2005). Dichos estudios genéticos son realizados mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región blanco, obteniéndose millones de copias de la región de interés (Waits and Paetkau 2005). Una de las fuentes de ADN más usada en el estudio mediante métodos no

invasivos de mamíferos son las fecas. Estas no solo contienen ADN del depositario, sino también de sus ítems dietarios, parásitos y microbiota intestinal (Swift et al 2018).

Esta metodología posee ciertas limitaciones ya que el ADN se encuentra en baja calidad y cantidad (Taberlet et al 1999). Distintos factores afectan la preservación del ADN colectado mediante técnicas no invasivas, ya que se degrada no solo por la antigüedad de la muestra sino también por la exposición a diversas condiciones ambientales (temperatura, humedad, exposición al sol y a la lluvia) (Santini et al 2007). Por este motivo resulta necesario seleccionar cebadores que amplifiquen marcadores de ADN pequeños (200-300 pb), así como procedimientos de laboratorio precisos que eviten contaminación (Taberlet et al 1999).

La combinación del muestreo no invasivo con herramientas moleculares ha demostrado ser eficiente para responder aspectos sobre manejo, evolución y ecología de las especies (Smith and Wang 2014; Schwartz et al 2008). De hecho, el creciente desarrollo de protocolos de secuenciación masiva a partir de ADN fecal ha permitido obtener múltiples secuencias a gran escala proporcionando amplia información sobre aspectos de ecología, evolución y sanitarios (Monterroso et al 2019; Wei et al 2019; Taberlet et al 2012; Metzker 2009). Estudios recientes han desarrollado métodos basados en “in- solution DNA hybridization capture” para secuenciación masiva a partir de fecas de coyotes y zorros (“kit foxes”). Los autores han demostrado que a partir de este abordaje es posible generar genotipificación mediante SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) de múltiples especies de cánidos, permitiendo identificar individuos y asignar el sexo de los mismo en único ensayo (Parker et al 2021).

Referencias bibliográficas:

- Afonso, E., E. Germain, M. L. Pouille, S. Ruetten, S. Devillard, L. Say, et al. (2013), 'Environmental determinants of spatial and temporal variations in the transmission of *Toxoplasma gondii* in its definitive hosts', *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2:1, 278–85, <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.09.006>
- Aguirre, A. A. (2009), 'Wild canids as sentinels of ecological health: A conservation medicine perspective', *Parasites and Vectors*, 2:SUPPL.1, 1–8, <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S7>
- Almeida, J. C. de, P. de C. P. Kim, R. P. B. de Melo, J. F. Nogueira, F. D. C. Martins, J. L. Garcia, et al. (2019), 'Neospora caninum DNA in feces of crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil', *Acta Tropica*, 197:June, 105068, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105068>
- Almería, S. (2013), 'Neospora caninum and Wildlife', *International Scholarly Research Notices Parasitology*, 2013
- De Barba, M., C. Miquel, F. Boyer, C. Mercier, D. Rioux, E. Coissac, et al. (2014), 'DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet', *Molecular Ecology Resources*, 14:2, 306–23
- Benayas, J. M. R., A. C. Newton, A. Diaz, and J. M. Bullock (2009), 'Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis', *Science*, 325:5944, 1121–24
- Berta, A. (1982), 'Cerdocyon thous', *Mammalian Species*, 1–4
- Di Bitetti, M. S., Y. E. Di Blanco, J. A. Pereira, A. Paviolo, and I. J. Páez (2009), 'Time Partitioning Favors the Coexistence of Sympatric Crab-Eating Foxes (*Cerdocyon thous*) and Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*)', *Journal of Mammalogy*, 90:2, 479–90, <https://doi.org/10.1644/08-mamm-a-113.1>
- Bossi, M. A. S., R. P. Migliorini, T. G. Santos, and C. B. Kasper (2019), 'Comparative trophic ecology of two sympatric canids in the Brazilian Pampa', *Journal of Zoology*, 307(3), 215–222.

- Brazeiro, A., A. Achkar, C. Toranza, and L. Barthesagui (2008), 'Potenciales impactos del cambio de uso de suelo sobre la biodiversidad terrestre de Uruguay', 7-22pp. Efectos de los cambios globales sobre la biodiversidad. Programa CYTED
- Cañón-Franco, W. A., L. E. O. Yai, S. L. P. Souza, L. C. Santos, N. A. R. Farias, J. Ruas, et al. (2004), 'Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil', *Veterinary Parasitology*, vol. 123, no 3-4, p. 275-277, <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.004>
- Carlozzi, A. (2011), 'Análisis filogeográfico de un cánido neotropical: el zorro de monte', *Genética de La Conservación- Departamento de Genética (Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República. Orientador: González, S.)*
- Castelló, J. R. (2018), 'SOUTH AMERICAN CANIDS', in *Canids of the World* (Princeton University Press), pp. 28–73, <https://doi.org/doi:10.1515/9780691185415-004>
- Catenacci, L. S., J. Griesse, R. C. da Silva, and H. Langoni (2010), '*Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil', *Veterinary Parasitology*, 169:1–2, 190–92, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.019>
- Cazetta, E., and M. Galetti (2009), 'The Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) as a secondary seed disperser of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) in a restinga forest of southeastern Brazil. ', *Biota Neotrop.*, 9:2
- Cosse, M., F. Grattarola, and N. Mannise (2017), 'A novel real-time TaqMan PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II', *Mammal Research*, 62(4), 405-411, <https://doi.org/10.1007/s13364-017-0328-y>
- Costanza, R., R. d'Arge, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, et al. (1998), 'The value of the world's ecosystem services and natural capital', *Nature*, 387, 253–60
- Courtenay, O., and L. Maffei (2008), '*Cerdocyon thous*. ', *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 06 April 2015.

- Cravino, A. (2015), 'El ensamble de carnívoros (Orden Carnivora) del Área protegida Parque Nacional San Miguel (Rocha, Uruguay): uso de hábitat, dieta y valor indicador', Biodiversidad y Ecología de La Conservación- IECA (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- Udelar. Orientador: Brazeiro, A.)
- Cravino, J. L., M. E. Calvar, M. A. Berruti, N. A. Fontana, and J. C. Poetti (1997), 'American southern cone foxes: predators or prey? An Uruguayan study case', *Journal of Wildlife Research*, 2:2, 107–14
- Dietz, J. M. (1985), '*Chrysocyon brachyurus*', *Mammalian Species*, 234
- Dubey, J. P., B. C. Barr, J. R. Barta, I. Bjerkås, C. Björkman, B. L. Blagburn, et al. (2002), 'Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia', *International Journal for Parasitology*, 32:8, 929–46, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)
- Dubey, J. P., G. Schares, and L. M. Ortega-Mora (2007), 'Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*', *Clinical Microbiology Reviews*, 20:2, 323–67, <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- Faria-Correa, M., R. A. Balbuena, E. M. Vieira, and T. R. O. de Freitas (2008), 'Activity, habitat use, density, and reproductive biology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian Atlantic Forest', *Mammalian Biology*, 74:3, 220–29, <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2008.12.005>
- Farias, A. A., and M. J. Kittlein (2008), 'Small-scale spatial variability in the diet of pampas foxes (*Pseudalopex gymnocercus*) and human-induced changes in prey base', *Ecological Research*, 23:3, 543–50
- Frade, J. (2015), 'Experiencias exitosas en el control de predadores', *Lana: Noticias Sul*, 169, 21–25
- Galan, M., M. Pages's, and J.-F. Cosson (2012), 'Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples', *PlosOne*, 7:11, <https://doi.org/10.5061/dryad.1j6v6>

- García, V. B., and M. J. Kittlein (2005), 'Diet, habitat use, and relative abundance of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) in northern Patagonia, Argentina', *Mammalian Biology*, 70:4, 218–26,
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2004.11.019>
- González, E. M., & J. A. Martínez- Lanfranco (2012), *Mamíferos de Uruguay. Guía de Campo e Introducción a Su Estudio y Conservación*. (Montevideo, Uruguay. : Ediciones de la Banda Oriental)
- González, E. M., J. A. Martínez-Lanfranco, E. Juri, A. L. Rodales, G. Botto, and A. Soutullo (2013), 'Capítulo 8 Mamíferos', in A. Soutullo, C. Clavijo, and J. A. Martínez-Lanfranco (eds), *Especies Prioritarias Para La Conservación En Uruguay. Vertebrados, Moluscos Continentales y Plantas Vasculares* (Montevideo: SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC), pp. 175–208
- Grattarola, F. (2015), 'Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos de Uruguay', Departamento de Biodiversidad y Genética. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Tesis de maestría. PEDECIBA. UdelaR. Orientador: Cosse, M.)
- Hawash, Y. (2014), 'DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR', *Korean Journal of Parasitology*, 52:3, 263–71,
<https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.263>
- Hernández Rodríguez, Y. (2007), 'Importancia del zorro de monte *Cerdocyon thous* enterianus (Carnívora: Canidae) para la conservación del monte nativo en el Parque Nacional San Miguel', *Zoología de Vertebrados- Facultad de Ciencias* (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- Universidad de la República. Orientador: Clara, M.)
- Instituto Uruguay XXI (2017), 'Informe Anual de Comercio Exterior', 10,
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Juan, H. (2019), 'Caracterización de la estructura genética poblacional del zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) en Uruguay', Departamento de Biodiversidad y Genética- IIBCE (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- UdelaR. Orientador: Mannise, N.)
- Langguth, A. (1973), 'Los carnívoros del Uruguay y sus relaciones con el hombre y el

- hábitat.', in Primera Reunión Nacional Sobre La Fauna y Su Habitat (Montevideo: Instituto Nacional de Preservación del Medio Ambiente.), II, 1–13
- Lassevich, D. (2014), 'Utilización de microsatélites para el estudio de poblaciones silvestres de zorro de monte (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766)', Departamento de Biodiversidad y Genética (IIBCE- Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Orientador: Cosse, M.)
- Lucherini, M, M. Pessino, and A. A. Farias (2004), 'Pampas fox *Pseudalopex gymnocercus*', Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs: Status Survey and Conservation Action Plan
- Lucherini, Mauro, and E. M. Luengos Vidal (2008), '*Lycalopex gymnocercus* (carnivora: canidae)', Mammalian Species, 1–9
- Mannise, N., M. Cosse, S. González, L. H. Emmons, J. M. Barbanti Duarte, M. D. Beccaceci, et al. (2017), 'Maned wolves retain moderate levels of genetic diversity and gene flow despite drastic habitat fragmentation', Endangered Species Research, 449–62, <http://www.int-res.com/abstracts/esr/v34/p449-462/>
- Mannise, N., M. Cosse, L. Repetto, M. R. Franco Berriel, J. E. Maldonado, and S. González (2012), 'Análisis genético sobre la presencia de aguará guazú (Carnivora, Mammalia) en Uruguay ', Boletín de La Sociedad Zoológica Del Uruguay, 21, 30–38
- Meagher, M., and M. E. Meyer (1994), 'On the Origin of Brucellosis in Bison of Yellowstone National Park: A Review', Conservation Biology, 8:3, 645–53, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08030645.x>
- Metzker, M. L. (2009), 'Sequencing technologies- the next generation', Nature Reviews Genetics, 11:1, 31–46
- Monterroso, P., R. Godinho, T. Oliveira, P. Ferreras, M. J. Kelly, D. J. Morin, et al. (2019), 'Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis', Mammal Review, 49:2, 97–112, <https://doi.org/10.1111/mam.12144>
- Moore, D. P. (2005), 'Neosporosis in South America', Veterinary Parasitology, 127:2, 87–

97, <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.001>

Muñoz-García, C. I., E. Berriatua, and C. Martínez-Carrasco (2018), 'What do we know about parasites of wildlife in high biodiversity areas with anthropogenic disturbance? the special case of Mexico', *Animal Health Research Reviews*, 19:2, 155–61, <https://doi.org/10.1017/S1466252318000087>

Otheguy, M. (2021), Filman a aguará guazú en Salto, Comunidad Científica- La Diaria, <https://ladiaria.com.uy/ciencia/articulo/2021/8/filman-a-aguara-guazu-en-salto/>

Ottaviani, D., and N. El-Hage Scialabba (2011), *Payments for Ecosystem Services and Food Security* (FAO)

Parker, L.D., Campana, M.G., Quinta, J.D., Cypher, B., Rivera, I., Fleischer, R.C., Ralls, K., Wilbert, T.R., Boarman, R., Boarman, W.I., Maldonado, J.E. (2021) An efficient method for simultaneous species, individual, and sex identification via in-solution single nucleotide polymorphism capture from low-quality scat samples. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.13552. Epub ahead of print. PMID: 34779133.

Perini, F. A., C. A. M. Russo, and C. G. Schrago (2010), 'The evolution of South American endemic canids: a history of rapid diversification and morphological parallelism', *J . Evolutionary Biology*, 23

Pompanon, F., B. E. Deagle, W. O. C. Symondson, D. S. Brown, S. N. Jarmon, and P. Taberlet (2012), 'Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing', *Molecular Ecology*, 21, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>

Prugh, L. R., C. J. Stoner, C. W. Epps, W. T. Bean, W. J. Ripple, A. S. Laliberte, et al. (2009), 'The Rise of the Mesopredator', *BioScience*, 59:9, 779–91, <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.9.9>

Queirolo, D., J. R. Moreira, L. Soler, L. H. Emmons, F. H. G. Rodrigues, A. A. Pautasso, et al. (2011), 'Historical and current range of the Near Threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America', *Oryx*, 45:2

Ripple, W. J., J. A. Estes, R. L. Beschta, C. C. Wilmers, E. G. Ritchie, M. Hebblewhite, et al.

- (2014), 'Status and ecological effects of the world's largest carnivores', *Science*, 343:6167, 1241484
- Rodríguez-Mazzini, R., and B. Molina Espinosa (2000), 'El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma. Estudios realizados en la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa. Reserva de Biósfera Bañados del Este', Documentos de Trabajo N° 30, 32
- Santini, A., V. Lucchini, E. Fabbri, and E. Randi (2007), 'Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples', *Molecular Ecology Notes*, 7:6, 955–61, <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01829.x>
- Schwartz, M. K., S. L. Monfort, R. A. Long, P. MacKay, W. J. Zielinski, and J. C. Ray (2008), 'Genetic and endocrine tools for carnivore surveys', in R. A. Long, P. MacKay, W. J. Zielinski, and J. C. Ray (eds), *Noninvasive Survey Methods for Carnivores*, pp. 238–62
- Scioscia, Nathalia P., L. Olmos, A. Gorosábel, L. Bernad, J. Pedrana, Y. P. Hecker, et al. (2017a), 'Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) new intermediate host of *Sarcocystis svanai* (Apicomplexa: Sarcocystidae)', *Parasitology International*, 66:3, 214–18, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.01.021>
- Scioscia, Nathalia Paula, P. M. Beldomenico, R. S. Petrigh, N. Pierangeli, and G. M. Denegri (2013), 'Epidemiological studies on *Echinococcus* in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) and European hare (*Lepus europaeus*) in Buenos Aires province, Argentina', *Parasitology Research*, 112:10, 3607–13, <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3548-3>
- Scioscia, Nathalia Paula, M. L. Gos, G. M. Denegri, and G. Moré (2017), 'Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in intestine mucosal scrapings and fecal samples of Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*)', *Parasitology International*, 66:5, 622–26, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.06.004>
- Sharon L. Deem Wendy Weisman, W. B. K. (2001), 'Putting Theory into Practice: Wildlife Health in Conservation', *Conservation Biology*, 15:5, 1224–33, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2001.00336.x>
- Sillero-Zubiri, C., M. Hoffmann, D. W. Macdonald, I. S. C. S. Group, and I. U.–T. W. C. Union

- (2004), *Canids : Foxes, Wolves, Jackals, and Dogs : Status Survey and Conservation Action Plan* (Gland, Switzerland: IUCN--The World Conservation Union)
- Sillero-Zubiri, C., and D. Switzer (2004), 'Management of wild canids in human dominated landscapes', *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan*. 2nd Edition. IUCN Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 257–66
- Smith, O., and J. Wang (2014), 'When can non-invasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies?', *Molecular Ecology Resources*, 14:5, 1011–23, <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12250>
- Soares, R. M., L. R. P. B. Cortez, S. M. Gennari, M. K. Sercundes, L. B. Keid, and H. F. J. Pena (2009), 'Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*', *Veterinary Parasitology*, 162:1–2, 46–50, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.003>
- Staats, M., A. J. Arulandhu, B. Gravendeel, A. Holst-Jensen, I. Scholtens, T. Peelen, et al. (2016), 'Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408:17, 4615–30, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>
- Swift, J. F., R. F. Lance, X. Guan, E. R. Britzke, D. L. Lindsay, and C. E. Edwards (2018), 'Multifaceted DNA metabarcoding: Validation of a noninvasive, next-generation approach to studying bat populations', *Evolutionary Applications*, 11:7, 1120–38, <https://doi.org/10.1111/eva.12644>
- Taberlet, P, L. P. Waits, and G. Luikart (1999), 'Noninvasive genetic sampling: look before you leap', *Trends in Ecology and Evolution*, 14:8, 323–27, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10407432
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei, and L. H. Rieseberg (2012), 'Environmental DNA', *Molecular Ecology*, 21:8, 1789–93, <http://10.0.4.87/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann, and E. Willerslev (2012), 'Towards next generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding', *Molecular*

Ecology, 21:8, 2045–50

- Taberlet, Pierre, and G. Luikart (1999), ‘Non-invasive genetic sampling and individual identification’, *Biological Journal of the Linnean Society*, 68:1–2, 41–55, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01157.x>
- Tchaicka, L., E. Eizirik, T. G. De Oliveira, J. F. Cândido Jr, and T. R. O. Freitas (2007), ‘Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*)’, *Molecular Ecology*, 16:4, 819–38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03185.x>
- Varela, O., and E. H. Bucher (2006), ‘Passage time, viability, and germination of seeds ingested by foxes’, *Journal of Arid Environments*, 67:4, 566–78, <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.03.013>
- Vieira, E. M., and D. Port (2007), ‘Niche overlap and resource partitioning between two sympatric fox species in southern Brazil’, *Journal of Zoology*, 272:1, 57–63
- Waits, L. P., and D. Paetkau (2005), ‘Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: a review of applications and recommendations for accurate data collection’, *Journal of Wildlife Management*, 69:4, 1419–33, <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2193/0022-541X%282005%2969%5B1419%3ANGSTFW%5D2.o.CO%3B2>
- Wei, F., Q. Wu, Y. Hu, G. Huang, Y. Nie, and L. Yan (2019), ‘Conservation metagenomics: a new branch of conservation biology’, *Science China Life Sciences*, 62:2, 168–78, <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9423-3>
- Wozencraft, W. C. (1993), ‘Order carnivora’, in D. E. Wilson and D. M. Reeder (eds), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (Washington D. C: Smithsonian Institution Press), SECOND EDI, 279–348

4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

El objetivo general de esta tesis es conocer el rol trófico que cumplen en los agroecosistemas las dos especies de zorros que habitan en Uruguay: el zorro de monte (*C. thous*) y de campo (*L. gymnocercus*). Esta información permitirá analizar los conflictos de estas especies en torno a la depredación y a la transmisión de enfermedades que afectan al ganado.

Objetivos específicos:

- i. Desarrollar herramientas moleculares para ser utilizadas a partir de muestras depositadas en el ambiente.
- ii. Detectar la presencia de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en zorros de campo y de monte.
- iii. Caracterizar los taxones vertebrados presentes en la dieta de las especies de canidos nativos más ampliamente distribuidas en nuestro país mediante protocolos de secuenciación masiva.
- iv. Analizar variaciones interespecíficas en la dieta de los zorros.
- v. Determinar diferencias intraespecíficas en la composición de la dieta tanto estacionales como geográficas- locales.

5. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para abordar los distintos objetivos específicos esta tesis está organizada en dos Capítulos. En el Capítulo 1 se analizó la presencia de los protozoarios parásitos *N. caninum* y *T. gondii* en ambas especies de canidos nativos; mientras que en Capítulo 2 se estudiaron los vertebrados presentes en la dieta de dichos zorros. Para ello se utilizaron métodos genéticos no invasivos, teniendo en consideración los requisitos necesarios para utilizar esta aproximación. Cada Capítulo cuenta con una breve introducción a la temática particular seguido de un artículo. El artículo que completa el Capítulo 1 ya fue publicado, mientras que el del Capítulo 2 es un manuscrito para su publicación y está acompañado de un informe que fue entregado al SUL (Secretariado Uruguayo de la Lana). Luego de ambos capítulos se presentan conclusiones generales y perspectivas.

6. CAPÍTULO 1

6.1. Introducción

El protozooario *Neospora caninum* causa la enfermedad parasitaria neosporosis, considerada una de las principales enfermedades causantes de abortos en bovinos. A nivel mundial se estima que causa pérdidas económicas anuales de un billón de dólares. En el ciclo de vida del parásito existen tres estadios infecciosos: taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos. Los taquizoítos y bradizoítos se encuentran en el hospedero intermediario (ganado) en donde tiene lugar la replicación asexual; mientras que los esporozoítos son excretados por el hospedero definitivo (cánidos) en donde ocurre la replicación sexual (Fig. 2) (Almería 2013.). Esta enfermedad puede ser transmitida a través de la placenta (transmisión vertical) o de manera postnatal (transmisión horizontal). Esta última ocurre mediante la ingesta de tejidos infectados con taquizoítos y/o por la ingesta de alimentos o agua contaminada (Almería 2013).

6.2. Preguntas planteadas

En este capítulo se busca responder las siguiente preguntas:

- ¿En que medida los zorros de campo y de monte en vida libre en Uruguay son reservorio de *N. canium* y *T. gondii*?
- ¿Los zorros de campo y de monte transmiten *N. caninum* al gando a través de sus fecas?

Referencias bibliográficas:

- Almeida, J.C., Kim, P. C. P., de Melo, R. P. B. , Nogueira, J. F., Martins, F. D. C., Garcia, J. L., Lemos Freire, R., Mota, R. A. (2019), 'Neospora caninum DNA in Feces of Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1776) from Northeastern Brazil.' *Acta Tropica* 197: 105068.
- Almería, S. (2013), 'Neospora caninum and Wildlife', *International Scholarly Reresearch Notices Parasitology*, 2013
- Cañón-Franco, W. A., L. E. O. Yai, S. L. P. Souza, L. C. Santos, N. A. R. Farias, J. Ruas, F. W. Rossi, A. A. B. Gomes, J. P. Dubey, and S. M. Gennari. (2004), 'Detection of Antibodies to *Neospora caninum* in Two Species of Wild Canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil.' *Veterinary Parasitology* 123:275–77.
- Dubey, J. P., B. C. Barr, J. R. Barta, I. Bjerkås, C. Björkman, B. L. Blagburn, D. D. Bowman, D. Buxton, J. T. Ellis, B. Gottstein, A. Hemphill, D. E. Hill, D. K. Howe, M. C. Jenkins, Y. Kobayashi, B. Koudela, A. E. Marsh, J. G. Mattsson, M. M. McAllister, D. Modrý, Y. Omata, L. D. Sibley, C. A. Speer, A. J. Trees, A. Uggla, S. J. Upton, D. J. L. Williams, and D. S. Lindsay, (2002). 'Redescription of *Neospora caninum* and Its Differentiation from Related Coccidia.' *International Journal for Parasitology* 32(8):929–46.
- Dubey, J. P., G. Schares, and L. M. Ortega-Mora. (2007), 'Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*.' *Clinical Microbiology Reviews* 20(2):323–67.
- Hawash, Yousry. (2014), 'DNA Extraction from Protozoan Oocysts/Cysts in Feces for Diagnostic PCR.' *Korean Journal of Parasitology* 52(3):263–71.
- Moore, D. P. (2005), 'Neosporosis in South America.' *Veterinary Parasitology* 127(2):87–97.



Molecular detection of coccidian Apicomplexa Parasites isolated from wild crab-eating and pampas foxes through novel TaqMan™ probes: a contribution to their molecular epidemiology

Natalia Mannise^{1,2} · Andrés Cabrera^{3,4} · Hernán Juan^{1,2} · Mariana Cosse¹ · Federico Giannitti⁵ · María E. Francia^{3,6,9} · Telma González⁷ · Andrés Iriarte² · Franklin Riet-Correa^{5,10} · Carlos Robello^{3,8} · Susana González¹

Received: 24 November 2020 / Accepted: 11 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia* spp. are coccidian parasites similar in morphology. Molecular techniques are necessary to detect parasite DNA isolated from stool samples in wild canids because they were reported as definitive hosts of *N. caninum* life cycle. The objective of this study was to develop a highly sensitive and accurate molecular method for the identification of coccidian Apicomplexa parasites in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*). Tissue samples from road-killed animals (pampas fox = 46, crab-eating fox = 55) and feces (pampas fox = 84, crab-eating fox = 2) were collected, and species were diagnosed through molecular assay. PCR was used for the amplification of a fragment of the coccidian Apicomplexa nss-rRNA gene. Additionally, we developed a novel real-time PCR TaqMan™ probe approach to detect *T. gondii*-*Hammondia* spp. and *N. caninum*. This is the first report of *N. caninum* DNA in pampas fox feces (n = 1), thus it was also detected from pampas fox tissues (n = 1). Meanwhile, *T. gondii* was found in tissues of pampas (n = 1) and crab-eating (n = 1) foxes and *H. triffittae* in one crab-eating fox tissue. Despite the low percentage (2.5%) of positive samples, the molecular method developed in this study proved to be highly sensitive and accurate allowing to conduct an extensive monitoring analysis for these parasites in wildlife.

Keywords Real-time PCR · Neosporosis · Toxoplasmosis · *Hammondia* spp. · Neotropical canids

✉ Susana González
sgonzalez@iibce.edu.uy

¹ Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Universidad de La República Facultad de Medicina, Avenida Dr. Alfredo Navarro 3051, 11600 Montevideo, Uruguay

³ Laboratorio de Interacciones Hospedero- Patógeno, Unidad de Biología Molecular Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay

⁴ Unidad de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Instituto de Patobiología, Universidad de La República, Alberto Lasplacés 1620, 11600 Montevideo, Uruguay

⁵ Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela. Ruta 50, Km. 11 (70000), Colonia, Uruguay

⁶ Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, Universidad de La República, Avenida Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

⁷ Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene, Universidad de La República, Avenida Dr. Alfredo Navarro 3051, 11600, Montevideo, Uruguay

⁸ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de La República, Avenida Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

⁹ Present Address: Laboratory of Apicomplexan Biology, Unidad de Biología Molecular Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay

¹⁰ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

Introduction

Neospora caninum is a coccidian parasite with a wide host range, similar in morphology and life cycle to *Toxoplasma gondii* and *Hammondia* spp. [1, 2]. Those similarities have led to the misdiagnosis of neosporosis in the past [3, 4]. Molecular based approaches have been successfully used to distinguish them in several infected tissues and isolated parasite stages [5, 6]. Methods based on PCR amplification not only allow species-specific identification of parasitic protozoa but also are considered extremely sensitive because they detect just a copy of the parasite DNA [7]. Furthermore, these parasites differentiate upon distinct definitive hosts and animals mainly affected by the disease [1]. Toxoplasmosis is a disease of humans, sheep, and goats, with felids as definitive hosts [1]. Neosporosis mainly affects cattle and dogs, causing abortion and neonatal mortality in livestock worldwide [1, 4]. In *N. caninum*'s life cycle, the intermediate host (cattle and other ruminants) ingest environmentally resistant oocysts shed by the definitive host (dogs or wild canids of the genus *Canis* are the only known host that shed oocysts to the environment) in the feces [4, 8]. The definitive hosts acquire the parasite by consuming infective tissue cysts lodged in the muscle or brain of the intermediate hosts [8]. Despite that there are no records available of clinical disease caused by *Hammondia* spp., felids are definitive hosts of *Hammondia hammondi*, dogs of *Hammondia heydorni* and wild canids of *Hammondia triffittae* [9].

The detection of parasites in free-ranging wildlife is challenging since most of the samples analyzed are normally postmortem and degraded [8]. Currently, the analysis of samples obtained non-invasively, such as feces or carcasses (e.g. road-killed animals) placed in the environment, is recommended instead of animal captures because they do not disturb the ecosystem and biodiversity [10]. In this regard, PCR based techniques proved to be efficient for *N. caninum* detection from different samples, including non-invasive samples [11–13]. Through molecular and serological analysis not only *N. caninum* but also *T. gondii* were determined from free ranging crab-eating foxes in northern Brazil [11]. Molecular methods confirmed the presence of *Hammondia heydorni* in feces of captive crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and its role as definitive host of the parasite was clarified [14]. Recently, *N. caninum* DNA was identified in feces of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in northern Brazil [12]. The crab-eating fox and pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) are the two wild canid species most widely distributed in Uruguay [15]. Despite that previous studies in South America reported *N. caninum* antibodies in wild crab-eating foxes and pampas foxes, no previous studies of *N. caninum* and

T. gondii were carried in Uruguay [16]. This is a major issue to be addressed because in Uruguay cattle raising for beef and dairy are one of the most important economic activities [17]. Neosporosis has been identified as one of the main causes of abortions in beef and dairy cattle in the country [18, 19]. Moreover, the seroprevalence level in dairy cattle (22%) has remained relatively stable over time, indicating that neosporosis is an endemic disease in a large proportion in Uruguay [20].

In this study, we aimed to develop a highly sensitive and accurate molecular method based on a TaqMan™ probe assay to identify the occurrence of coccidian Apicomplexa parasites (*N. caninum*, *T. gondii* and *Hammondia* spp.) isolated from DNA collected from non-invasive samples (carcasses and feces) from the crab-eating and pampas foxes.

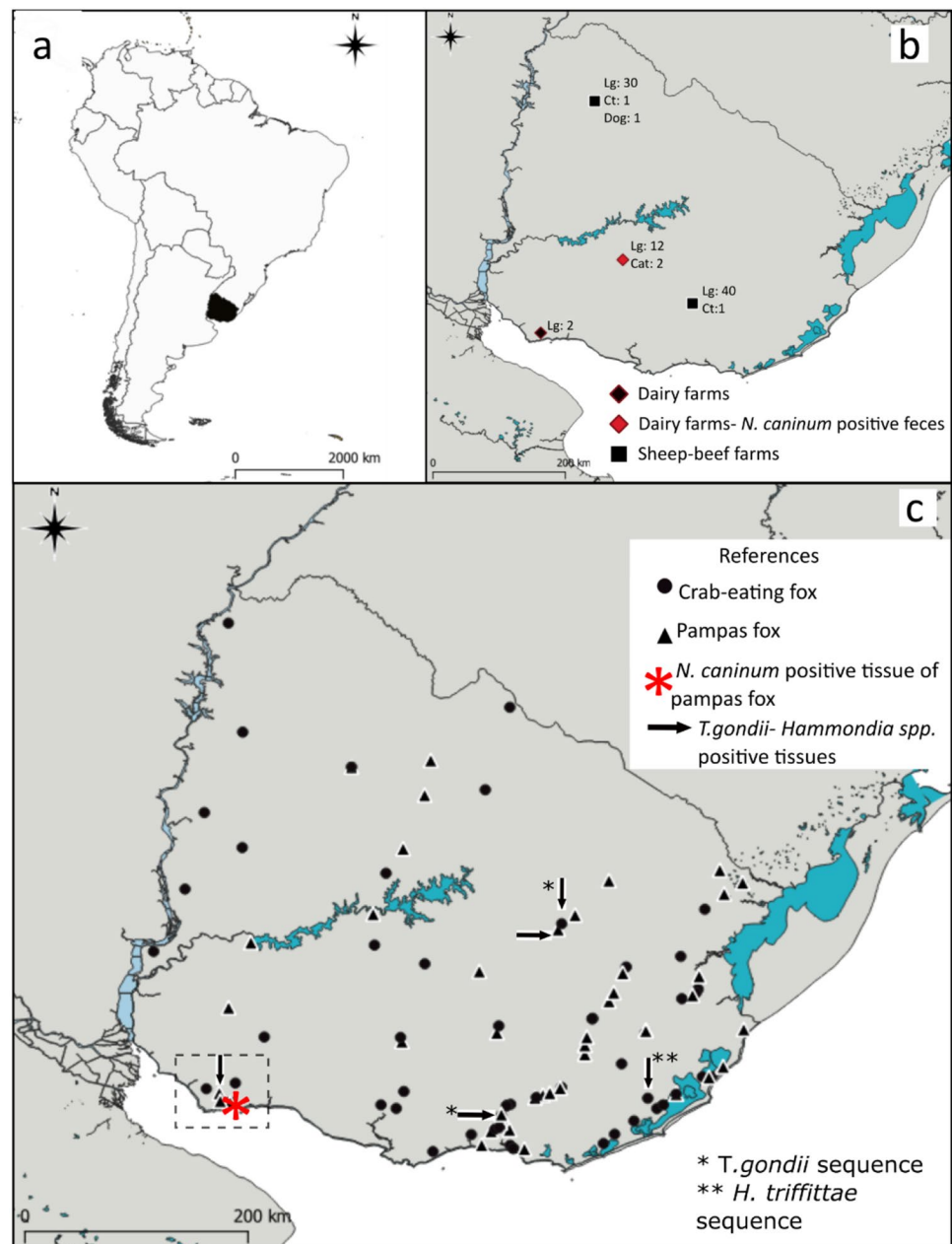
Materials and methods

Tissues (skin, muscle, liver, kidney and non-determined tissues) were sampled between 2004 and 2018 from different road-killed animals across Uruguay. From 7 road-killed animals included in this study, not only the skin but also feces were collected and independently stored. Feces were collected non-invasively in 4 different locations in Uruguay between 2016 and 2018 (Fig. 1); two of them were dairy farms with a history of neosporosis in cattle and two were sheep and beef farms with undetermined neosporosis status. One of the dairy farms was an experimental farm in the south-west region with sporadic abortions. The other dairy farm was in the central region and had a record of a *N. caninum* abortion epidemic outbreak [21]. The remaining two sampling sites were dedicated to sheep and beef raising practices (Fig. 1).

Each tissue sample was stored in tubes and conserved in 95% ethanol for no more than two weeks until DNA extractions; while feces were kept at 4 °C for no more than five days until DNA extraction and coprological examinations. DNA extractions from tissue were carried out following the salt-based method described by González et al. [22]. Fecal DNA was isolated using the QiAmp DNA Stool Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA quality and quantity were assessed using a NanoDrop™ ND-1000 UV–vis Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Inc., Wilmington, DE).

Canid species were determined through the combined use of a TaqMan™ probe and real-time PCR amplification [23]. Three TaqMan™ probes were included in the PCR to allow the identification of domestic dog (*Canis lupus familiaris*), crab-eating fox (*C. thous*), and pampas fox (*L. gymnocercus*). Real-time PCR amplifications were carried out in a BioRad CFX96 (Applied Biosystems) using SensiFastprobe™ PCR master mix (Bioline, London, UK) [23].

Fig. 1 Geographic distribution of the samples collected. **a** Geographic location of Uruguay. **b** Location of the four farms where feces were collected, the number of samples of each mammalian species is indicated: pampas fox (Lg), crab-eating fox (Ct), domestic dog (dog), and domestic cat (cat). **c** Geographic distribution of tissues collected from road-killed animals; road-killed animals whose feces were collected ($n = 7$) are shown with a dotted-square inset in the figure. References are embedded in the figure



The detection of additional mammalian species was achieved through the amplification of an mtDNA fragment of the control region using universal primers as described in Grattarola et al. [24].

The Ritchie [25] sedimentation technique was applied in those identified foxes fecal samples that were collected only in dairy farms with previous neosporosis diagnosis in cattle. The final sediment was transferred into a slide and observed by light microscopy with 4×, 10× and 40× magnification lens. Oocysts were identified by their morphologic characteristics [26].

A fragment of the coccidian Apicomplexa nuclear small-subunit (nss)-rRNA gene (300 bp) was amplified using

COC1 and COC2 primers [13]. The endpoint PCR consisted of a final volume of 15 µl supplemented with 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mg/mL of bovine serum albumin (BSA), 0.05 mM dNTPs, 0.05 U Taq polymerase (Invitrogen, USA), 0.5 µM of each primer, and ~ 80 ng of template DNA. Thermocycling conditions comprised of an initial denaturalization step of 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 1 min, 51 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension step of 72 °C for 10 min.

Amplification was tested by 2% agarose (SBS Genetech, Beijing) electrophoresis using GoodView™ (SBS Genetech, Beijing) nucleic acid stain. From PCR products a volume of 10 µl was purified by incubation with 0.19

U of Phosphatase alkaline and 0.76 U of Exonuclease I (Fermentas, USA) at 37 °C for 1 h and 30 min followed by 5 min at 75 °C, and sequenced by Sanger technology in an ABI3130 DNA genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequence quality was assessed with MEGA6 [27] and compared with the GenBank database using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool) [28].

A novel primer pair was designed for the amplification of a short fragment (127 bp) of the coccidian Apicomplexa nss-rRNA gene (Table 1). Based on conserved sequences, two TaqMan™ probes were designed using Primer Express 3.0 software from Applied Biosystems (Life Technologies) to detect *N. caninum* and *T. gondii*-*Hammondia* spp. (Table 1). TaqMan™ probes were labeled with reporter and quencher dyes with different absorption spectra [29]. Real-time PCR assays with TaqMan™ probes were tested using genomic DNA isolated from brain tissues of mice (n = 3) and cow (n = 6) previously shown positive for *N. caninum* by PCR and ELISA [21]. It was also tested including sheep fetus's brain tissues (n = 5) formerly confirmed positive for *T. gondii* by PCR. Additionally, genomic DNA from isolated strains of *T. gondii* (n = 3), *H. hammondi* (n = 1) and *N. caninum* (n = 1) and 2 feces from dogs with a positive diagnosis for *N. caninum* by serology were also tested. PCR consisted of 1X PrimeTime Gene Expression Master Mix (IDT, UK), 1X PrimeTime® Std qPCR Assay (IDT, UK) containing each a mix of TaqMan™ probe and primers, and DNA template (60–100 ng). Cycling conditions on BioRad CFX96 (Applied Biosystems) included an initial denaturalization step of 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 62 °C for 1 min. Fluorescence acquisition was set during the extension step on the FAM channel (470 nm excitation and 510 nm detection) and HEX channel (530 nm excitation and 550 nm detection) to detect either *N. caninum* or *T. gondii*-*Hammondia* spp., respectively. Samples were considered positive when TaqMan™ probe hybridizations were detected before cycle 34, and were purified and sequenced following the methods previously described.

Results

A total of 197 samples were tested, comprising road-killed animals (n = 101) and feces (n = 96). Road-killed animals identified as pampas and crab-eating foxes were 46 and 55, respectively (Fig. 1 and Table 2). Four feces from road-killed animals corresponded to pampas fox and 3 to the crab-eating fox. Fecal samples collected in farms were mostly from pampas fox (n = 84). Only 2 feces of crab-eating foxes were determined in sheep and beef farms; a domestic dog was detected in a fecal sample from a sheep and beef farms, and 2 domestic cats (*Felis catus*) feces were identified in a dairy farm (Fig. 1 and Table 2). The coprological examination conducted in the 14 samples from pampas fox collected in the dairy farms nor detected any oocyst from *N. caninum*.

This original molecular approach proved to be effective and allowed the identification of *N. caninum* DNA in pampas fox feces for the first time. The coccidian Apicomplexa nss-rRNA gene amplification (endpoint PCR) showed positive results for pampas fox in 1 tissue (skin) of a road-killed animal and 4 feces from the dairy farm located in the central region (Fig. 1). For the pampas fox whose tissue showed positive results, a fecal sample was also analyzed without positive amplifications. From the positive amplification products, 2 high-quality sequences were recovered, one from the skin sample and the other one from a fecal sample. Both nucleotide sequences are available in the GenBank (skin sample Acc: MW183407, fecal sample Acc: MW183408) and displayed the highest identity percentage (100% for the skin of the road-killed animal and 99.46% for the other individual fecal sample) with *N. caninum* (Acc: LN714488) by BLAST. The real-time PCR TaqMan™ probe assay showed positive results for *N. caninum* detection only in the pampas fox tissue (Fig. 2).

Real-time PCR amplification combined with TaqMan™ probes allowed the detection of *T. gondii*-*Hammondia* spp. and *N. caninum* from tissues of pampas and crab-eating foxes. The HEX TaqMan™ probe for *T. gondii*-*Hammondia* spp. detection showed positive results in road-killed samples

Table 1 Novel coccidian Apicomplexa primers and TaqMan™ probes for *N. caninum* and *T. gondii*-*Hammondia* spp.

	Sequence 5'-3'	T melting (°C)		
Primers				
Nc-UY primer forward	ACATGCGCACATGCCTCTT	59		
Nc-UY primer reverse	CCGTCGCAGACCGAAGTC	59		
TaqMan™ probes			Reporter	Quencher
<i>N. caninum</i> probe	TGGTCCTCAGGTGAT	67	FAM	ZEN/IBFQ
<i>T. gondii</i> - <i>Hammondia</i> spp. probe	TGGTCCTCGGGTGAT	66	HEX	ZEN/IBFQ

Primers and TaqMan™ probes names, their sequences, and melting temperature (T melting) are indicated. Reporter and quencher dyes for TaqMan™ probes are also shown

Table 2 Samples detailed information

Species	Samples	n	Tg-H	Nc	CE
Crab-eating fox <i>Cerdocyon thous</i>	Skin	29	1**, 1***	–	–
	Muscle	5	–	–	–
	Liver	5	–	–	–
	Kidney	1	–	–	–
	ND	15	–	–	–
	Feces (RK)	3	–	–	–
	Feces (DF)	–	–	–	–
	Feces (SB)	2	–	–	–
	Total	60	2	0	0
Pampas fox <i>Lycalopex gymnocercus</i>	Skin	20	1, 1**	1*	–
	Muscle	6	–	–	–
	Liver	4	–	–	–
	Kidney	–	–	–	–
	ND	16	1	–	–
	Feces (RK)	4	–	–	–
	Feces (DF)	14	–	1*	14 ND
	Feces (SB)	70	–	–	–
	Total	134	3	2	14
Domestic dog <i>Canis lupus familiaris</i>	Skin	–	–	–	–
	Muscle	–	–	–	–
	Liver	–	–	–	–
	Kidney	–	–	–	–
	ND	–	–	–	–
	Feces (RK)	–	–	–	–
	Feces (DF)	–	–	–	–
	Feces (SB)	1	–	–	–
	Total	1	0	0	0
Domestic cat <i>Felis catus</i>	Skin	–	–	–	–
	Muscle	–	–	–	–
	Liver	–	–	–	–
	Kidney	–	–	–	–
	ND	–	–	–	–
	Feces (RK)	–	–	–	–
	Feces (DF)	2	–	–	–
	Feces (SB)	–	–	–	–
	Total	2	0	0	0

For pampas and crab-eating foxes is shown the number of samples (n) discriminated by tissue type of different road-killed animals, and not determined tissue (ND). The number of feces (n) collected from road-killed animals (RK), dairy farms (DF), and sheep and beef raising (SB) farms are presented for each species identified. The number of samples with positive results for parasite identification from TaqMan™ probe real time PCR are indicated for Tg-H (*T. gondii*- *Hammondia* spp.) and Nc (*N. caninum*)

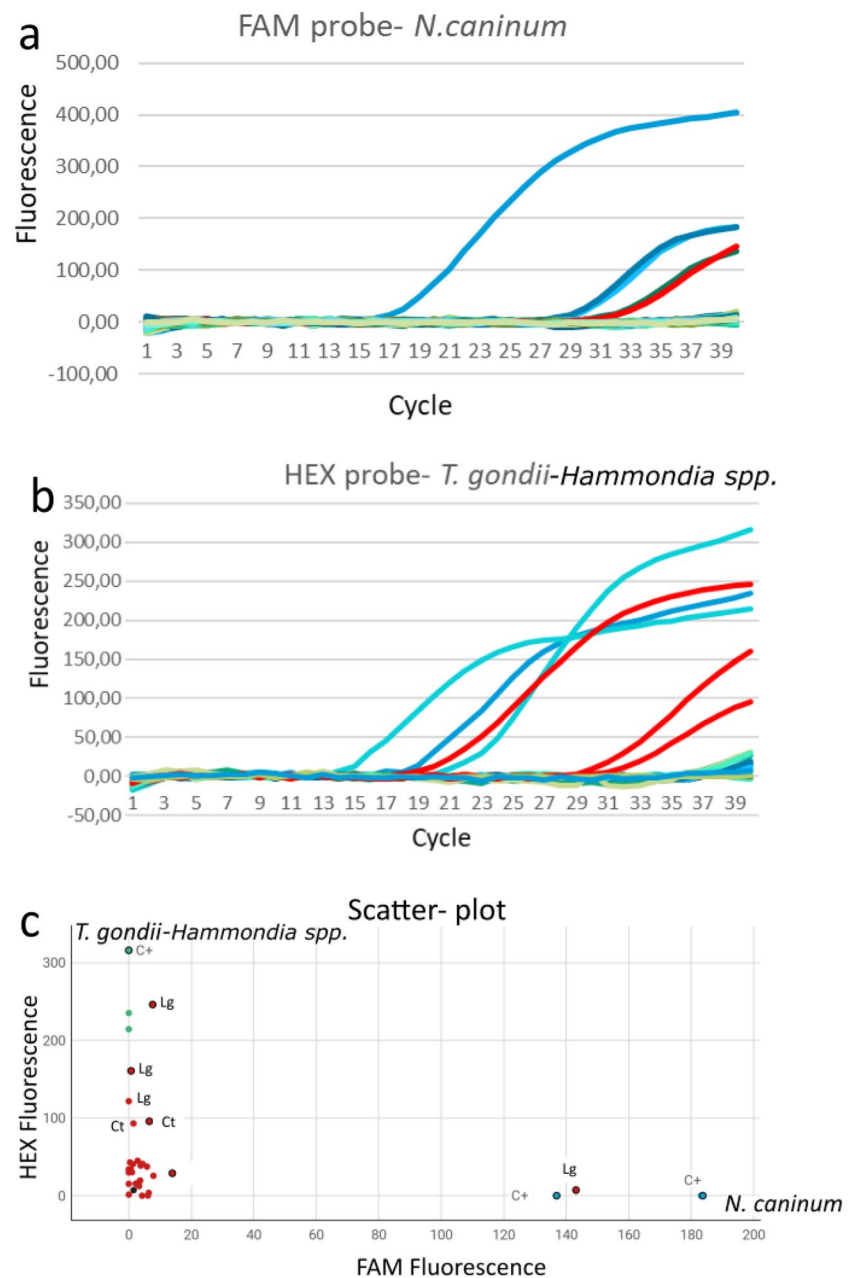
With an asterisk (*) are shown the sequences of *N. caninum* obtained through endpoint PCR, while *T. gondii* and *H. triffittae* sequences obtained through real time PCR are indicated in double (**) and triple (***) asterisk, respectively

Coprological examination (CE) column indicates the number of foxes feces analysed and no oocysts detection (ND)

from 3 pampas foxes and 2 crab-eating foxes. Three good quality sequences were obtained from these samples that revealed positive TaqMan™ probe results. The sequences for one pampas fox (Nc331 in supplementary data 1) and

one crab-eating fox (Nc232 in supplementary data 1) showed 98 and 91.67% of identity respectively with *T. gondii* (Acc: MT634250) by BLAST. Furthermore, the sequence of the other road-killed crab-eating fox (Nc318 in supplementary

Fig. 2 Real-time TaqManTM probe assay for *N. caninum* (a) and *T. gondii*-*Hammondia* spp. (b). Positive controls are indicated in blue and pampas and crab-eating fox tissues are indicated in red (a and b). TaqManTM probes allelic discrimination is shown on scatter-plot (c) for tissues of pampas fox (Lg) and crab-eating fox (Ct). HEX: *T. gondii*-*Hammondia* spp. TaqManTM probe, FAM: *Neospora caninum* TaqManTM probe. (Color figure online)



data 1) exhibited 98.31% of identity with *Hammondia triffittae* (Acc: GQ984222) by BLAST (Figs. 1, 2). The TaqManTM probes designed in this study combined with sequencing PCR products allowed the detection of *N. caninum*, *T. gondii* and *Hammondia* spp. (Fig. 2c, supplementary data 2).

Discussion

In the present study, *N. caninum* was identified by molecular techniques in pampas fox feces and tissue of a road-killed animal. From positive pampas fox amplifications, one fecal

and one tissue sample yielded high-quality sequences allowing further analysis. Furthermore, no positive amplification was obtained from the fecal sample of the pampas fox whose tissue showed positive results. This indicates that the road-killed animal was exposed to *N. caninum* and no detection from feces could be related to the parasite's multifaceted life cycle and oocysts excretion pattern. In the definitive hosts, protozoa genetic material at this stage is enclosed in oocysts with strong cell walls that may affect its detection [7]. Moreover, for *N. caninum*, it is known that only a small number of oocysts are excreted by infected dogs [30]. Consistently, no *N. caninum*-like oocysts were detected in any of the samples subjected to the coprological examination.

This is in concordance with its oocyst excretion number and dynamics [30] and with a recent study on crab-eating fox feces in Brazil in which no oocysts were found [12]. Like other food items, when *N. caninum* contained in cysts is ingested, its DNA can be found in feces. This could explain the *N. caninum* DNA presence in pampas fox feces without oocysts excretion that is important to confirm the species role as definitive host. Additionally, the DNA detection and absence of *N. caninum*-like oocysts could reinforce the high sensitivity of molecular methods in comparison to classical coprological assays [12].

The real-time PCR TaqMan™ probe approach developed here allowed the identification of positive tissues for *N. caninum* in pampas fox ($n = 1$), while after sequencing were confirmed for *T. gondii* in pampas ($n = 1$) and crab-eating ($n = 1$) foxes and for *H. triffittae* in crab-eating fox ($n = 1$). The real-time PCR TaqMan™ probe assay presented here has the limitation that sequencing is necessary to differentiate *T. gondii* from *Hammondia* spp. Moreover, the TaqMan™ probes showed successful results for the positive controls of these parasites included in real-time PCR. Its high sensitivity and shorter amplification fragment length enabled the detection of *T. gondii* and *Hammondia triffittae* positive tissues from road-killed animals that were not detectable by endpoint PCR [31, 32]. Positive results for *N. caninum* obtained by endpoint PCR in one pampas fox fecal sample was not corroborated by this TaqMan™ probe assay. Low parasitic DNA load combined with inhibitory agents present in feces could affect the sensitivity and agreement to real-time TaqMan™ probe PCR reactions [33, 34].

The distinction between *N. caninum*, *T. gondii* and *H. triffittae* presence in canids is important in epidemiological terms. Firstly, canids are not a major concern for *T. gondii* epidemiology because felids are the only known hosts that excrete its oocysts to the environment. However, its identification in wild canids tissues indicate its presence in the environment (see below) [2]. Secondly, *H. triffittae* and *N. caninum* use canids as definitive hosts but it is only known that *N. caninum* causes clinical disease [9]. In this sense, the detection of *N. caninum* in wild canids has a higher impact for its epidemiology understanding. The *N. caninum* sylvatic cycle consists of wild canids eating infected meat and excreting oocysts on the environment which can be subsequently ingested by herbivores [8]. Recent molecular studies in Brazil yielded positive results from crab-eating fox feces, reinforcing that further studies are necessary to elucidate the ingestion and passage through feces without intestinal sexual reproduction [12]. The putative role of this canid species in the *N. caninum* transmission cycle remains unclear until oocyst detection from feces. Despite negative results obtained here from crab-eating fox feces, a reduced sample number was analyzed; thus, we cannot exclude its presence for this

fox species in Uruguay. In contrast, this is the first study in which *N. caninum* DNA was identified in pampas fox feces. The pampas fox occupies mainly grasslands from southern South America, including modified pasture for ranching [35]. They are inhabiting the same areas as cattle and for that reason, it is mandatory to understand the presence of these parasites in the species. Despite that molecular detection does not per se imply the presence of oocysts in the feces, it proved to be a highly sensitive specific method for its DNA identification.

Although it is important to elucidate the involvement of wild canids in sylvatic cycles in South American countries, which depend heavily on cattle raising for their economies, it is also relevant to understand these species' roles as a reservoir [8]. The results obtained here for *N. caninum* in pampas fox and *T. gondii* in crab-eating fox tissues are in concordance with previous serological studies conducted in Brazil [11, 16, 36]. The identification of *H. triffittae* from a road-killed crab-eating fox is in agreement with a former study in captive crab-eating foxes feces developed in Brazil [14]. Moreover, its detection from tissues could indicate that they have been exposed to the parasites probably through cyst ingestion from cattle remains but not necessarily participating as definitive host in *N. caninum* or *H. triffittae* life cycle. Despite that both fox species studied are widely distributed in Uruguay, *N. caninum* DNA was identified in a low percentage on pampas fox samples collected in the south dairy basin. This suggests that pampas fox has been exposed to *N. caninum*; however, it is essential to continue the analysis of wildlife and other factors that could be contributing to the spread and persistence of neosporosis in Uruguay.

In conclusion, the method described here successfully identified *N. caninum*, *T. gondii* and *H. triffittae* in wild foxes. Our results showed that crab-eating fox and pampas fox have been exposed to *N. caninum*, *T. gondii* and *H. triffittae* in Uruguay. However, the low percentage detected indicates low potential risk for its transmission to cattle. Molecular-based techniques are powerful for parasite detection in wildlife and allow accurate epidemiological understanding and surveillance.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06492-w>.

Acknowledgements We thank Yanina Leone, Claudia Elizondo, Nadia Bou, Rubén Darío Caffarena, Carlos Omar Schild, Caroline da Silva Silveira and Melissa Macías-Rioseco for their assistance during fieldwork; the team of road-killed animals of NGO ECOBIO, INIA- “La Estanzuela” and SUL for their collaboration in sample collection. We are grateful to Yester Basmadján (Instituto de Higiene-Universidad de la República, Uruguay) for her guidance and assistance in coprological analysis and oocysts identification. We are grateful to Jon Boyle from University of Pittsburgh for kindly providing us with DNA from *Hammondia hammondi*.

Author contributions NM: sample collection and laboratory procedures, data analysis, writing, and editing original draft. AC: sample collection and laboratory procedures assistance. HJ: sample collection and laboratory procedures assistance. FG: sample collection and discussion of strategy and results. ME.F: discussion of strategy and results, laboratory assistance, editing original and revised draft. MC: sample collection, laboratory assistance, TaqMan probe development supervision, discussion of results, and graphs visualization. TG: coprological analysis, oocysts identification, and review. AI: methodology, results, discussion, and review. FR-C: results discussion and review. CR: study design, discussion of strategy and results, supervision, resources, and review. SG: study design, discussion of strategy and results, supervision, review, and editing.

Funding This study obtained financial support from Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FSSA_X_2014_1_106026).

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The foxes samples were collected non-invasively, with non-requirement of ethical approval. The positive control samples have been obtained according to the protocol approved by the Ethical Committee of the Institut Pasteur in Montevideo, Uruguay (permission number CEUA 010-17, date 11.06.2017). The handling animals guidelines followed in this study have been previously described in Cabrera et al. [21].

References

- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20(2):323–367
- Dubey JP, Sreekumar C (2003) Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 33:1437–1453
- Dubey JP, Lindsay DS (1990) Neosporosis in dogs. Vet Parasitol 36(1–2):147–151
- Dubey JP, Schares G (2011) Neosporosis in animals—the last five years. Vet Parasitol 180(1–2):90–108
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR et al (2002) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. Int J Parasitol 32(8):929–946
- Gondim LFP (2006) *Neospora caninum* in wildlife. Trends Parasitol 22(6):247–252
- Hawash Y (2014) DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. Korean J Parasitol 52(3):263–271
- Almería S (2013) *Neospora caninum* and wildlife. ISRN Parasitol. <https://doi.org/10.5402/2013/947347>
- Gjerde B, Dahlgren SS (2011) *Hammondia triffittae* n. comb. of foxes (*Vulpes spp.*): biological and molecular characteristics and differentiation from *Hammondia heydorni* of dogs. Parasitol 138(3):303–321
- Swift JF, Lance RF, Guan X, Britzke ER, Lindsay DL, Edwards CE (2018) Multifaceted DNA metabarcoding: validation of a non-invasive, next-generation approach to studying bat populations. Evol Appl 11(7):1120–1138
- Almeida JC, Melo RPB, Kim PCP, Guerra NR, Alves LC, Costa DF, Alves CJ, Porto WJN, Mota RA (2018) Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous*—Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil. Acta Parasitol 63(1):184–189
- Almeida JC, Kim PCP, de Melo RPB, Nogueira JF, Martins FDC, García JL, Freire RL, Mota RA (2019) *Neospora caninum* DNA in feces of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*—Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil. Acta Trop 197:105068
- Ho MS, Barr BC, Marsh AE, Anderson ML, Rowe JD, Tarant AF, Hendrickx AG, Sverlow K, Dubey JP, Conrad PA (1996) Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. J Clin Microbiol 34(5):1203–1208
- Soares RM, Cortez LR, Gennari SM, Sercundes MK, Keid LB, Pena HF (2009) Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. Vet Parasitol 162(1–2):46–50
- González EM, Martínez- Lanfranco JA (2012) Mamíferos de Uruguay Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Ediciones de la Banda Oriental, Montevideo
- Cañón-Franco WA, Yai LEO, Souza SLP, Santos LC, Farias NAR, Ruas J, Rossi FW, Gomes AAB, Dubey JP, Gennari SM (2004) Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. Vet Parasitol 123:275–277
- MGAP-DIEA (2019) Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Oficina de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Anuario Estadístico Agropecuario, Montevideo
- Easton C (2006) Estudio patológico de las principales causas infecciosas en el aborto bovino en Uruguay. Dissertation, Facultad de Veterinaria. Universidad de la República Oriental del Uruguay.
- Macías-Rioseco M, Silveira C, Fraga M, Casaux L, Cabrera A, Francia ME, Robello C, Maya L, Zaranonelli L, Suanes A, Colina R, Buschiazzo A, Giannitti F, Riet-Correa F (2020) Causes of abortion in dairy cows in Uruguay. Pesqui Vet Bra 40(5):325–332
- Macchi MV, Suanes A, Salaberry X, Fernandez F, Piaggio J, Gil AD (2020) Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. Prev Vet Med 179:105022
- Cabrera A, Fresia P, Berná L, Silveira C, Macías-Rioseco M, Arevalo AP, Crispo M, Pritsch O, Riet-Correa F, Giannitti F, Francia ME, Robello C (2019) Isolation and molecular characterization of four novel *Neospora caninum* strains. Parasitol Res 118(12):3535–3542
- González S, Mannise N, Repetto L, Maldonado JE (2015) Sex determination of three Neotropical canids by high resolution melting analysis. Conserv Genet Resour 7(3):643–645
- Cosse M, Grattarola F, Mannise N (2017) A novel real-time TaqMan PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II. Mammal Res 62(4):405–411
- Grattarola F, González S, Cosse M (2014) A novel primer set for mammal species identification from feces samples. Conserv Genet Resour 7(1):57–59
- Ritchie LS (1948) An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull US Army Med dep 8(4):326
- Ash LR, Orihel TC (2007) Atlas of human parasitology. American Society of clinical pathologists, Chicago
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28(10):2731–2739
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403–410
- Johansson MK (2006) Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. In: Didenko VV (ed) Fluorescent energy transfer nucleic acid probes. Human Press, Totowa NJ, pp 17–29

30. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM (1998) Rapid communication: dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28(9):1473–1479
31. O'Neill D, Turner PD, O'Meara DB, Chadwick EA, Coffey L, O'Reilly C (2013) Development of novel real-time Taq Man® PCR assays for the species and sex identification of otter (*Lutra lutra*) and their application to noninvasive genetic monitoring. *Mol Ecol Resour* 13(5):877–883
32. Santini A, Lucchini V, Fabbri E, Randi E (2007) Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Mol Ecol Notes* 7(6):955–961
33. Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Dias-Neto E et al (2014) Evaluation of real-time PCR assay to detect *Schistosoma mansoni* infections in a low endemic setting. *BMC Infect Dis* 14(1):1–10
34. ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L (2008) Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(2):179–185
35. Lucherini M, Luengos Vidal EM (2008) *Lycalopex gymnocercus* (Carnivora: Canidae). *Mamm Species* 820:1–9
36. Moore DP (2005) Neosporosis in South America. *Vet Parasitol* 127(2):87–97

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7. CAPÍTULO 2

7.1. Introducción

El zorro de campo y de monte son especies omnívoras generalistas y oportunistas (Lucherini and Luengos Vidal 2008; Berta 1982). Como se mencionó anteriormente, se han llevado a cabo diversos estudios de ecología trófica en ambas especies mediante observación de restos para su asignación taxonómica. En los análisis de dieta realizados en nuestro país se encontró que dentro de los ítems animales la identificación taxonómica tuvo una baja resolución, ya que las categorías dentro de los vertebrados e invertebrados llegaban hasta la determinación de Clase y Orden respectivamente (Cravino 2015; Hernández Rodríguez 2007). En este contexto, en donde son considerados depredadores de corderos, resulta urgente desarrollar estrategias que posibiliten la detección de taxones a niveles taxonómicos profundos.

El creciente desarrollo de protocolos de secuenciación masiva combinado con la colecta de muestras ambientales como las fecas, permite obtener múltiples secuencias a gran escala (Monterroso et al 2019; Wei et al 2019; Taberlet et al 2012; Metzker 2009). El término *metabarcoding* de ADN hace referencia a la identificación de manera eficiente de múltiples especies (o taxones superiores) a partir de ADN total extraído de muestras ambientales (Taberlet et al 2012). Para ello se amplifica por PCR una región informativa, y sus productos son posteriormente secuenciados en plataformas de secuenciación masiva (Staats et al 2016). Una serie de consideraciones deben tenerse en cuenta a la hora de llevar adelante un estudio de *metabarcoding* ya que las muestras están depositadas en el ambiente, el ADN suele estar típicamente degradado (Taberlet et al 2012; Taberlet and

Luikart 1999). De esta manera los cebadores que se utilizan para estudios de *metabarcoding* de ADN amplifican fragmentos pequeños denominados mini-barcodes (aproximadamente 100- 250 pb) (Pompanon et al 2012.; Taberlet et al 2012). El fragmento de ADN elegido debe ser eficiente para discriminar taxones pero a la vez necesita ser amplificado mediante cebadores que permitan una amplia cobertura taxonómica (ser universales para ciertos grupos) (Pompanon et al 2012; Taberlet et al 2012). En este contexto, en los últimos años, el *metabarcoding* de ADN ha demostrado ser muy eficiente para el estudio de dieta en especies omnívoras (De Barba et al 2014; Galan et al 2012).

7.2. Preguntas planteadas

En este contexto, se plantean las siguientes preguntas:

- ¿El *metabarcoding* de ADN es una herramienta adecuada para el análisis de dieta en zorros de campo y de monte?
- ¿Qué vertebrados están presentes en la dieta de zorro de campo y de monte de un mismo establecimiento?
- ¿Qué variaciones estacionales y geográficas- locales se encuentran en los taxones vertebrados que componen la dieta de los zorros de Uruguay?
- ¿Cuál es la dieta del zorro de campo durante la época de parición de los ovinos?

Referencias bibliográficas:

- De Barba, M., C. Miquel, F. Boyer, C. Mercier, D. Rioux, E. Coissac, and P. Taberlet. (2014), 'DNA Metabarcoding Multiplexing and Validation of Data Accuracy for Diet Assessment: Application to Omnivorous Diet.' *Molecular Ecology Resources*, 14(2):306–23.
- Berta, A. (1982), '*Cerdocyon thous*.' *Mammalian Species* 1–4.
- Cravino, A. (2015), 'El ensamble de carnívoros (Orden Carnivora) del Área protegida Parque Nacional San Miguel (Rocha, Uruguay): uso de hábitat, dieta y valor indicador', *Biodiversidad y Ecología de La Conservación- IECA* (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- UdelaR. Orientador: Brazeiro, A.)
- Galan, M., Pages's, M., Cosson, J. F. (2012), 'Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples.' *PlosOne* 7(11).
- Hernández Rodríguez, Y. (2007), 'Importancia del zorro de monte *Cerdocyon thous enterrianus* (Carnívora: Canidae) para la conservación del monte nativo en el Parque Nacional San Miguel', *Zoología de Vertebrados- Facultad de Ciencias* (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- Universidad de la República. Orientador: Clara, M.)
- Lucherini, M., and E. M. Luengos Vidal (2008), '*Lycalopex gymnocercus* (carnívora: canidae)', *Mammalian Species*, 1–9
- Metzker, M. L. (2009), 'Sequencing Technologies- the next Generation.' *Nature Reviews Genetics* 11(1):31–46.
- Monterroso, P., R. Godinho, T. Oliveira, P. Ferreras, M. J. Kelly, D. J. Morin, et al. (2019), 'Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis', *Mammal Review*, 49:2, 97–112, <https://doi.org/10.1111/mam.12144>
- Pompanon, F., B. E. Deagle, W. O. C. Symondson, D. S. Brown, S. N. Jarmon, and P. Taberlet (2012), 'Who is eating what: diet assessment using next generation

- sequencing', *Molecular Ecology*, 21, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>
- Swift, J. F., Lance, R. F., Guan, X., Britzke, E. R., Lindsay, D. L., Edwards, C. E. (2018), 'Multifaceted DNA Metabarcoding: Validation of a Noninvasive, next-Generation Approach to Studying Bat Populations.' *Evolutionary Applications* 11(7):1120–38.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L. H. (2012), 'Environmental DNA.' *Molecular Ecology* 21(8):1789–93.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E. (2012), 'Towards Next generation Biodiversity Assessment Using DNA Metabarcoding.' *Molecular Ecology* 21(8):2045–50.
- Taberlet, P. and Luikart, G. (1999), 'Non-Invasive Genetic Sampling and Individual Identification.' *Biological Journal of the Linnean Society* 68(1–2):41–55.
- Wei, F., Q. Wu, Y. Hu, G. Huang, Y. Nie, and L. Yan (2019), 'Conservation metagenomics: a new branch of conservation biology', *Science China Life Sciences*, 62:2, 168–78, <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9423-3>

7.3. Manuscrito para publicación

Title: DNA metabarcoding: a practical approach to diet assessment in Neotropical foxes

Mannise N^{1,2}, Cosse M^{1*}, Greif G³, Bou N¹, Robello C^{3,4}, González S¹, Iriarte A^{2*}.

¹ Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo 11600, Uruguay.

² Laboratorio de Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo 11600, Uruguay.

³ Laboratorio de Interacciones Hospedero- Patógeno, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo 11400, Uruguay.

⁴ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo 11800, Uruguay.

Corresponding authors: *A. Iriarte (airiarteo@gmail.com); *M. Cosse (marianacosse@gmail.com)

Abstract

Pampas and crab-eating foxes are medium-sized canids living in sympatry in the middle east of South America. The diet composition studies on these species will provide a deep understanding of their ecological roles in the ecosystem structure and regulation. Here we analyzed the vertebrate taxa dietary components from both foxes using the metabarcoding technique, a powerful tool for dietary evaluations that allows fast and accurate food taxa identification. We amplified a 12S ribosomal gene fragment of the mtDNA from feces of pampas fox and crab-eating fox using primers developed for vertebrates. Also, a fox blocking primer was designed to minimize the host amplicon products. Pooled samples were sequenced through paired-end reads (100 bp library) on a MiSeq Illumina Platform. A reference database was built with sequences available at GenBank. Following previous studies using traditional methods, we found that the most common food taxa were rodents. Qualitative differences in the diet composition among foxes were identified; armadillo species were one of the main food items in pampas fox, while a wide variety of amphibians and birds were only identified in crab-eating fox feces. These results showed that the methodology applied in this study is powerful enough to identify the vertebrate food taxa from fecal DNA in the two sympatric wild canids. Additionally, a first approach for assessing intraspecific food genetic variation was developed based on sequence variant network reconstruction. The value of this strategy for the analysis of intraspecific diversity is discussed.

Keywords: Non-invasive genetic techniques, next-generation sequencing, molecular ecology, environmental DNA.

1. Introduction

The comprehension of trophic interactions is necessary for a wide range of ecological studies, from conservation biology to ecosystem functionality [1,2]. The suitable identification of taxa consumed is difficult to obtain from micro and macroscopic evaluations of feces because hard parts need to be preserved. It depends on expert skills for taxa determination from semi-digested food items [1]. Fecal DNA-based dietary assessment techniques have demonstrated to be powerful enough for detailed taxonomic identification [1]. Throughout the advent of next-generation sequencing (NGS) technologies and the increasing amount of sequences that could be obtained, the term metabarcoding has recently emerged [3,4]. DNA metabarcoding was introduced to identify multiple taxa using DNA isolated from environmental samples, such as soil, water, or feces [4]. This technique offers a powerful approach for biodiversity non-invasive assessment [5]. It comprises the amplification by PCR and its subsequent NGS of environmental DNA [6]. Despite its high potential, some traits need to be considered: i) DNA is typically degraded in environmental samples, and ii) several taxa must be amplified during the same PCR reaction [4]. For taxa identification, the sequences obtained are compared to a reference sequence database [4]. To accomplish a DNA metabarcoding analysis, it is highly recommended that primers amplify a short DNA fragment in a wide variety of organisms and the construction of a suitable and trustable reference database [4,6]. Metabarcoding DNA has been broadly used in mammal dietary assessments, revealing robust results when identifying taxa from fecal DNA [2,7–11]. In fecal samples, host DNA is present in higher amounts, and food target concentration differences need to be considered in the data analysis steps throughout this technique [1]. This methodology is also a non-invasive manner to approach trophic studies at a population scale, allowing researchers to analyze tens or hundreds of individuals simultaneously with a fast and precise identification of food species [12]. Furthermore, it could also be possible to analyze the intraspecific genetic variability of food items identified [13]. Methods based on sequence

abundance have previously been used to explore the populations' genetic diversity and communities from environmental samples [13–15].

Understanding the carnivore's diet is critical for an adequate evaluation of species role in resource use and competition [16]. Medium size carnivore species (mesocarnivores) are essential in the proper maintenance of environment function, structure, and dynamics [17]. They have generalized behavior and play ecological roles such as prey population size regulation [17,18]. Canidae are opportunistic mesocarnivores predators able to respond to temporal and spatial resource changes. Accordingly, differences in the canids' diet are expected over local areas, though only a few studies have been previously developed on Neotropical canid feeding ecology [19]. In the Neotropics, several canid species with similar morphology and habits co-occur [20]. The crab-eating fox, *Cerdocyon thous*, and the pampas fox, *Lycalopex gymnocercus*, live in sympatry in southern Brazil, northern Argentina, Paraguay, and Uruguay [21,22]. They are considered mesopredator species with omnivorous generalist diets with similar behavior [21,22]. Feeding studies on fox species revealed similar diet compositions and temporal partitioning of resource utilization [20–23].

In this work, we aim to determine the vertebrate taxa present in the diet of crab-eating and pampas foxes living in sympatry by using a DNA metabarcoding technique. Additionally, a first approach to evaluate the intraspecific diversity of food species was presented.

2. Material and methods

2.1. Study area and sampling.

The study was conducted in the "Reserva Natural Salus" (34° 23'37.8168" S; 55° 19'43.05" W) in the south central region of Uruguay (Fig.1). The area is located in the Coronilla hill, and it has 1,300 hectares in length, containing small hills, woodlands, bushes, and grasslands. Fecal samples were collected in different environments across the study area during 2015 in cold (during winter in June) and warm (during summer in April) periods. Each field survey consisted of three days of

samplings with five field assistants for feces collection. Carnivore fresh feces were stored individually in plastic tubes in the freezer until DNA extraction to avoid contaminants from other environmental sources [1,10].

2.2. DNA extraction and host feces species identification.

DNA isolations were done immediately after samples arrived at the laboratory and were conducted using the DNA Stool™ Minikit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. Internal and external fecal parts were taken and homogenized for DNA extractions [10].

Canid host species of the feces were identified using a three TaqMan™ probe real-time PCR assay [24]. Based on this technique, three species-specific TaqMan™ probes with different dyes were included for crab-eating fox *C. thous*, pampas fox *L. gymnocercus*, and domestic dog *Canis lupus familiaris* detection. These are the three canid species inhabiting the study area. PCR amplifications were conducted on Rotor-Gene™ 6000 (Corbett) with SensiFastprobe™ PCR master mix (Bioline, London, UK) following Cosse et al. [24] procedures.

2.3. DNA metabarcoding: amplification and sequencing.

A fox-blocking oligonucleotide was developed following De Barba et al. [10] and Vestheim and Jarman [25] to avoid host DNA amplification from feces. For its design, a 12S rRNA gene fragment (98bp) of mitochondrial DNA (mtDNA) was amplified and sequenced from tissues of crab-eating and pampas foxes following Ríaz et al. [26]. The fox blocking oligonucleotide developed with a phosphate (PHO) 3' extreme modification (5'-CCACTATGCTTAGCCTTAAACGTAAATGATTYTAT PHO- 3') was included in the 12S fragment PCR from fecal DNA (Section 2.2), using the primer set 12S-V5 [26]. The PCR consisted in 10µl final volume with 0.04U of Taq polymerase (Invitrogen, USA), 1X Taq buffer, 1.5mM of MgCl, 0.2mg/mL of BSA (Bovine Serum Albumin), 0.05mM of dNTPs, 0.1 µM of forward and reverse primers, 1.6µM of fox blocking primer and a 4-8ng/µl final

concentration of DNA. The primers 12S-V5 forward and reverse for the 12S fragment mtDNA gene contained overhang sequences that were used on a second round of indexing PCR amplifications to add the Nextera indexes for sequencing on a MiSeq Illumina™ platform. The thermal profile started with a denaturalization step of 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds and 58°C for 90 seconds. We used 40 to 45 cycles in degraded fecal DNA.

Amplification success was confirmed by 2X agarose electrophoresis using Goodview™ (SBS Genetech, Beijing) nucleic acid stain. Each PCR product obtained was purified using 0.8U/μl of Exonuclease I and 0.2U/μl of Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP) enzymes (ThermoFisher Scientific™, USA); the thermal profile was 37°C for 1 hour and 30 minutes followed by 5 minutes at 75°C. PCR purified products were quantified using a Nanodrop TMND-1000 UV-vis Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). PCR purified products from the same fox species and season were pooled in equimolar concentrations. Thus, four pools were generated that included libraries prepared from crab-eating and pampas foxes feces collected in warm and cold seasons.

Paired-end (2X 100) sequencing was performed using the Illumina MiSeq platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), available at the sequencing facility of the Institut Pasteur, Montevideo. The raw reads obtained were trimmed based on quality (Phred score ≥ 30) using SICKLE software [27]. PCR primers were removed, applying a locally developed script. Paired-end reads were merged using the PEAR program [28], and the consensus sequences were determined.

2.4. Reference database and sequences analysis.

The reference database was built using the available sequences of the 12S rRNA mitochondrial gene at GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), including complete vertebrate mitochondrial genomes and partial sequences. The final dataset comprised 306,362 sequences from 28,270 different vertebrate species. Complete taxonomy information for each sequence included in the reference database was retrieved from Genbank. The reference database used and the raw reads

generated are available at http://www.higiene.edu.uy/ddbp/Andres/mannise_et_al_2020_data.html.

A detailed description of the bioinformatics workflow was included as supplementary data (Supplementary data 1). The pipeline described was completed for each experiment (reads obtained from pooled samples) and was implemented through locally developed scripts. In brief, non-redundant consensus sequences (consensus from paired-end reads) were used for taxonomic identification based on a local reference database. For each consensus sequence (used as query), the most similar reference sequences (best hits) were defined using the highest blast score. Then, taxonomic information for each best hit was retrieved. The species list was determined based on the total number of hits in blast search and the matched species' presence in Uruguay (detailed information in Supplementary data 1). When the consensus sequences matched a reference sequence (subject in the database) that belongs to taxa that do not occur in the study area, the determination of the item was left at higher taxonomic levels such as Genera, Family, or Order. In such cases, a Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) was assigned. MOTUs frequency graphs at each taxonomic level were built for MOTUs represented by at least ten reads.

We did an alignment using MUSCLE [29], including all generated consensus sequences for each food item detected in each pool. Then, a network was constructed for each species with more than one sequence variant using the minimum spanning method [30] in PopArt [31] (Supplementary data 2). A criterion based on sequence variants frequency and network position was applied; low abundant sequences, which at the same time are similar (one-point mutation apart) and derived from central highly abundant ones, are considered non-biological variants [32,33]. On the other hand, high abundant unique sequences (centroids) are real biological sequences. Non-biological variants may result from PCR bias, sequencing base-calling errors, or degradation [15,33].

A recent approach was developed to separate erroneous sequences from real biological intra-MOTUs variants in coding-sequences used for metabarcoding analysis. It combines the network reconstruction and the comparison of conserved (first and second codon positions) and non-conserved (third codon position) positions [33]. Following this idea, we defined conserved positions within the 12S rRNA sequence based on the rRNA secondary structures available at the Rfam site (rfam.xfam.org) [34]. The 12S-V5 primer pair amplifies the V5 variable region of the 12S rRNA gene [26], including loops and helices in the RNA structure (Supplementary data 3). Thus, we used the conserved positions (structural helices sequences) to estimate the number of noisy variants per site and compared this variation rate with non-conserved sites. We did a new network reconstruction for conserved, non-conserved, and all sites independently for the most frequent food species on each pooled sample. The overall mean *p*-distance was estimated on these food species for conserved, non-conserved, and all sites, separately using MEGA X [35]. The mean *p*-distance calculated among reads of each species in the structurally conserved sequence represents an error rate estimation.

3. Results

Forty-four samples were collected during the cold season. Among them, six crab-eating and ten pampas fox feces were assigned through molecular methods. Thirty-six samples were collected during the warm season. There, two crab-eating fox and nine pampas fox feces were identified (Fig.1). The remaining samples either corresponded to another carnivore species, or the DNA was too degraded to be amplified. The sequences of pampas and crab-eating foxes for the 12S rRNA gene fragment corresponded for one haplotype for each fox specie and were deposited in the GenBank database (crab-eating fox: accession numbers MT272186 and MT272187; pampas fox: accession numbers MT272188 and MT272189).

Paired-end sequences were obtained from each pool for crab-eating and pampas fox collected at cold and warm seasons. After trimming, a total of 5,761 non-ambiguous consensus sequences

were kept for analysis. That is 1,395 in pool I (crab-eating fox cold sampling), 1,242 in pool II (crab-eating fox warm sampling), 2,125 in pool III (pampas fox cold sampling), and finally 999 in pool IV (pampas fox warm sampling).

3.1. Vertebrate taxa determination in canids diet.

The Blast searches results distribution of identity values of best hits identified is shown for each pool in Fig. 2 of Supplementary data 1. For best hits, the number of reads (NR) and sequence variants (SV) obtained for each pool and taxonomic level reached is presented in Table 1. During the cold season, crab-eating and pampas fox feces revealed the presence of cavy (*Cavia aperea*) and cow (*Bos taurus*). Several amphibian and bird food items were detected on crab-eating fox. In contrast, only one amphibian species and one Passeriform bird MOTU were identified on pampas fox during the cold season (Table 1). In crab-eating fox, the food items with more reads during cold and warm seasons were *Cavia aperea* and *Lepus europaeus*, respectively (Table 1). On the other hand, in pampas fox, the food items with the highest number of reads were *Cavia aperea* during the cold season and *Mus sp.* in the warm seasons sampling (Table 1). Other items identified in pampas fox feces include three armadillo species, all of which are described for the study area. A wide variety of toads taxa were detected in the crab-eating fox feces. In this case, during the warm sampling period, the genus *Rhinella* was detected, while *Pseudis*, *Leptodactylus*, and *Physalaemus* were identified only in the cold season samples (Table 1).

Higher taxonomic levels such as Genera, Family, Order, and Class were also analyzed (Fig. 2), and general trends were identified. Most food items consumed by crab-eating foxes were mammals, both in cold and warm seasons (78.5 and 60.3% of reads, respectively). Amphibians represented 16.6% of the reads in the cold season, and birds 30.7% in the warm season. Also, in pampas fox, mammals were the substantial majority of food items consumed, 99.1% of reads in the cold season and 96.4% in the warm season. For both fox species, rodents were the most prevalent

Order among mammals. In the cold season, 67.0% of reads belonged to the Caviidae family, and in the warm season, 51.8% to the Muridae family.

3.2. Genetic variability in food item species.

The sequence variants of the species consumed by pampas and crab-eating foxes during cold and warm seasons allowed a first approach to study the genetic variation of the species consumed (Supplementary data 2). We applied a criterion based on network reconstruction, in which the sequence position and the frequency in the network was used to evaluate each sequence variant identified [30,32]. Those sequence variants that occupied a central position and are more abundant are considered real biological sequence variants. On the other hand, low-frequency variants, which are located on the network's periphery, and are closely related to high-frequency variants, are considered noisy variants [32, 33]. The erroneous variants can result from multiple non-mutually exclusive effects such as PCR bias, environmental degradation, or sequencing errors. Our criterion agrees with previous methods reported to assess intraspecific genetic variation in metabarcoding studies [13,15,33]. This methodology identified one unique biological variant in each food item analyzed at the species level. However, there are one or more variants that may also be considered real variants according to network position and frequency.

The denoising strategy proposed here was based on the analysis of the variability in structurally conserved and non-conserved sequences in the amplified region of the 12S rRNA. Nucleotide changes observed in conserved-structure-associated sequences are more probably caused by erroneous reads. These non-real biological variations are expected to be mostly randomly distributed in the sequence. Our analyses reveal no difference in the estimated variability (measure as overall mean *p*-distance) between the structural conserved and the non-conserved sequence regions. Moreover, no main differences can be observed between the network generated using both (Fig. 3 and Supplementary data 3). This result suggests that intraspecific variation observed in food items comes from erroneous reads. Taken together, we conclude that

there is only one real biological variant identified in *C. aperea* in the cold season on both fox species. Also, in the warm season, only one natural variant could be considered in *L. europaeus* on crab-eating fox and only one in *B. taurus* on pampas fox (Fig. 3).

4. Discussion

4.1. NGS is a powerful tool for food item identification in trophic analyses.

The metabarcoding strategy provided valuable information for the accurate identification of food vertebrate species. Moreover, it represents an improvement from classical feeding analysis in terms of taxonomic level resolution, allowing comparing dietary results from different studies [20]. The experimental design used in this study for carnivore species detection and diet assessment proved to be sensitive enough to allow trophic evaluations [11]. We also present a novel and strong blocking oligonucleotide for pampas and crab-eating fox for the 12S rRNA gene fragment. The use of this kind of oligonucleotides is an issue that needs to be addressed since the predator DNA is much more abundant than the consumed taxa DNA. In other words, host DNA amplification needs to be reduced to allow a more efficient food species detection [1].

Despite the advantages of the speed, accuracy, and potential of the NGS approach for dietary studies, some considerations should be taken into account [1]. The taxonomic resolution of the DNA fragment chosen should have broad taxonomic coverage, suitable discrimination power, and high amplification efficiency. The latter is usually linked to short amplicon length (100-250bp) [1]. In this sense, the DNA fragment chosen here fulfills all these conditions and has been previously successfully used in several carnivores and omnivorous metabarcoding feeding studies [2,10,25,36]. Taxonomic bias or underrepresentation of local species in the reference database may affect the analysis, as can be observed in the distribution of MOTUs among the identified food items (Fig. 2). Thus, it is mandatory to improve and increase the quality and taxonomy coverage of the sequence database, including local species data. Meanwhile, the definition of MOTUs at higher taxonomic levels may help explore diet composition based on available data on

public databases [1]. Several vertebrate DNA sequences for the 12S rRNA gene species that inhabit the study area were missing in the Genbank. However, in some cases, the identification of taxa at the Genera level was possible (e.g., *Pseudis* and *Colaptes*). A similar approach was used when two or more species in the database displayed equal similarity scores due to the insufficient resolution of 12S rRNA for species assignment. In some cases, the identification at the Genera level was enough since only one species of the group is present in the study area (e.g., *Cavia aperea*).

Both false-positive and false-negative results are frequent in diet metabarcoding approaches; false-positive results may appear due to various technical artifacts (e.g., PCR bias, degradation, and sequencing errors) [4,10,37]. On the other hand, false negatives could be explained in terms of a low abundance of food items in the sample (under the detection threshold), lower PCR primer specificity [8,37], or bias in the reference database. Several strategies are recommended to prevent these methodological shortcomings: inclusion of positive and negative controls on every step as well as replicates and the usage of universal primers for PCR [10,37]. Here we followed these recommendations, and as a result, relatively low-frequency taxa were detected.

4.2. Genetic variation assessment of food species using the mitochondrial 12S rRNA gene.

The study of the genetic variability of food species was achieved through network reconstruction (Fig. 3). This methodology uses the frequency and network position of detected variants to discriminate biological variability from noise (see above). The development of methods to distinguish between variability generated from erroneous reads from natural biological variability is much needed to improve the accuracy of metabarcoding based on NGS. This is particularly important in environmental samples, in which DNA is typically presented in low quality and degraded. Thus, PCR cycles or sequencing depth needs to be increased to achieve amplification success [14]. To identify real genetic variations it is recommended to implement positive controls, multiple replicates, and high-quality filtering [14]. Erroneous sequences could be eliminated, at

least partially, by denoising data and applying rigorous filtering thresholds [15,38]. Unfortunately, low abundant real biological variants could also be lost [13]. We used a denoising technique for non-coding DNA following a previously published method for coding sequences [33]. Variations observed in sequence sites involved in the rRNA helices secondary structure, which is conserved among vertebrate species, are assumed to be mainly errors. The null or marginal differences found in the estimated *p*-distances between structurally conserved and non-conserved sequences suggest that most of the variation observed is mainly random and comes from erroneous reads (Supplementary data 3). Thus, we can state that in our study, only one variant was detected in all cases; the most frequent and central sequence in each network reconstruction should be considered the only real biological variant (Fig. 3). There are non-mutually exclusive explanations for this lack of variability in the consumed taxa identified. First, our study was focused on a small area, and the number of samples per pool was low. Therefore, the low genetic variability observed may characterize the populations analyzed in the study area. Second, and more probably, the DNA fragment used here, which allows species and taxa discrimination, may be too conserved for intraspecific genetic analysis [26]. This is a primary approach, further analyses including non-coding intraspecific variable DNA fragments should be done to confirm this denoising strategy.

4.3. Previously reported results support the metabarcoding methodology.

In agreement with published diet studies based on morphological characteristics of taxa remains from feces of both fox species, the most common vertebrate food items identified in this study were mammals (rodents and hares). Cavies (*Cavia aperea*) were detected in almost all seasons and consumed by both fox species. The only exception was seen during the warm season in crab-eating fox (Table 1), where minor consumption of meat animal proteins may occur because large amounts of fruits are accessible and there are less energetic requirements [20]. Also, in accordance with our results, published trophic analyses concluded that rodents and particularly

Cavies were the main taxa consumed by these foxes [19,20,22]. The brown hare, *Lepus europaeus*, is also one of the most abundant food items identified, and species from this Genera have been previously described as important prey for both fox species [19,22,39].

Interestingly, some dietary composition differences were detected between fox species (Table 1). As reported by Bossi et al. [22], several amphibian taxa remain were present, especially in crab-eating fox feces, while different armadillo species are specific prey items for pampas fox. Birds were found as food items in both fox species, but only the Passeriform Order was identified in pampas fox. Despite the smaller number of crab-eating fox feces sampled, many more taxa were detected in their diet, even those previously reported in other areas of its geographic distribution [20,22]. Although the limitation of the pooling strategy used here and the consequences of the relatively low number of samples included, the metabarcoding approach represents an improvement from the macroscopic trophic analysis. In the latter, the comparison of the results from different studies is challenging mainly due to differences in taxonomic level prey resolution [1,20].

Cow DNA was identified in three of the four pools analyzed. The only exception was crab-eating fox during the warm season, the pool with a reduced number of collected feces (Table 1). This observation is not surprising since the study area is a Reserve with a popular picnic zone with barbecues. Thus, foxes could be consuming leftovers because predation attacks on cows are improbable [19]. Moreover, livestock consumption was earlier related to their scavenger habits [19,22]. The presence of livestock in fox's diet needs to be further analyzed and clarified because canids are persecuted by predation of domestic animals (mainly sheep) and are recurrent targets of poisoning and hunting by ranch owners [22,39]. Note, however, that no sheep DNA was found among food items in our study. Unfortunately, the current methodological approaches cannot distinguish carrion consumption from predation, thus new sampling and molecular methods need to be developed.

5. Conclusion

This work is the first vertebrate diet composition analysis on Neotropical canids conducted using a metabarcoding approach. A sensitive and accurate methodology was applied for crab-eating fox and pampas fox diet characterization to achieve this goal. Our results agree with previous trophic analyses in these fox species based on macroscopic methods, validating the methodological strategy. Moreover, a first approach for detecting consumed species sequence variants was presented based on network reconstruction using non-coding DNA fragments. The extensive use of these techniques will allow going further in the understanding of South American wild canids feeding ecology and in the knowledge about their role in ecosystem regulation.

Author contributions: Conceptualization: Mannise N, Cosse M and Iriarte A; Field and laboratory procedures: Mannise N, Cosse M, Bou N, and Greif G; Data analysis: Mannise N and Iriarte A; Funding acquisition: Cosse M, Robello C, González S; Writing - original draft: Mannise N and Iriarte A; Writing - review & editing: Cosse M, Iriarte A, Greif G, Bou N, Robello C, González S.

Declaration of competing interest: The authors have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Antonella Bruno, Yanina Leone, Daniel Hernández, Claudia Elizondo, Hernán Juan, Eduardo Méndez, Alejandro Rodríguez, Andrés de Mello, Natalia Zaldua, for their assistance on field and laboratory work; Andres Ligrone for data shape file; Felipe Montenegro for his comments during data analysis.

Funding

We obtained financial support from Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII FSSA_2015_1_1005292), NGO Vida Silvestre Uruguay and Salus Company.

References

- [1] F. Pompanon, B.E. Deagle, W.O.C. Symondson, D.S. Brown, S.N. Jarman, P. Taberlet, Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing, *Mol. Ecol.* 21 (2012) 1931–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x>.
- [2] W. Shehzad, T. Riaz, M.A. Nawaz, C. Miquel, C. Poillot, S.A. Shah, F. Pompanon, E. Coissac, P. Taberlet, Carnivore diet analysis based on next- generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan, *Mol. Ecol.* 21 (2012) 1951–1965.
- [3] J. Shendure, H. Ji, Next-generation DNA sequencing, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1135–1145.
- [4] P. Taberlet, E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann, E. Willerslev, Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding, *Mol. Ecol.* 21 (2012) 2045–2050.
- [5] K. Deiner, H.M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D.M. Lodge, N. de Vere, M.E. Pfrender, L. Bernatchez, Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities, *Mol. Ecol.* 26 (2017) 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>.
- [6] M. Staats, A.J. Arulandhu, B. Gravendeel, A. Holst-Jensen, I. Scholtens, T. Peelen, T.W. Prins, E. Kok, Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4615–4630. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>.
- [7] B.E. Deagle, Æ.D.J. Tollit, Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces : potential to estimate diet composition ?, (2007) 743–747. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9197-7>.

- [8] B.E. Deagle, A.C. Thomas, A.K. Shaffer, A.W. Trites, Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count?, (2013) 620–633. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12103>.
- [9] E. Quemere, F. Hibert, C. Miquel, E. Lhuillier, E. Rasolondraibe, J. Champeau, C. Rabarivola, L. Nusbaumer, C. Chatelain, L. Gautier, P. Ranirison, B. Crouau-Roy, P. Taberlet, L. Chikhi, A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range, *PLoS One*. 8 (2013) 19.
- [10] M. De Barba, C. Miquel, F. Boyer, C. Mercier, D. Rioux, E. Coissac, P. Taberlet, DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet, *Mol Ecol Resour*. 14 (2014) 306–323.
- [11] M. Buglione, V. Maselli, D. Rippa, G. de Filippo, M. Trapanese, D. Fulgione, A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare, *Mamm. Biol*. 88 (2018) 31–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.10.010>.
- [12] P. Monterroso, R. Godinho, T. Oliveira, P. Ferreras, M.J. Kelly, D.J. Morin, L.P. Waits, P.C. Alves, L.S. Mills, Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis, *Mamm. Rev*. 49 (2019) 97–112. <https://doi.org/10.1111/mam.12144>.
- [13] V. Elbrecht, E.E. Vamos, D. Steinke, F. Leese, Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data, (2018) 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.4644>.
- [14] C.I.M. Adams, M. Knapp, N.J. Gemmell, G.J. Jeunen, M. Bunce, M.D. Lamare, H.R. Taylor, Beyond biodiversity: Can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool?, *Genes (Basel)*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/genes10030192>.
- [15] V.M.A. Zizka, M. Weiss, F. Leese, Can metabarcoding resolve intraspecific genetic diversity changes to environmental stressors? A test case using river macrozoobenthos,

- Metabarcoding and Metagenomics. 4 (2020). <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.51925>.
- [16] U. Klare, J.F. Kamler, D.W. MacDonald, A comparison and critique of different scat-analysis methods for determining carnivore diet, *Mamm. Rev.* 41 (2011) 294–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00183.x>.
- [17] G.W. Roemer, M.E. Gompper, B. Van Valkenburgh, The ecological role of the mammalian mesocarnivore, *Bioscience*. 59 (2009) 165–173.
- [18] L.R. Prugh, C.J. Stoner, C.W. Epps, W.T. Bean, W.J. Ripple, A.S. Laliberte, J.S. Brashares, The Rise of the Mesopredator, *Bioscience*. 59 (2009) 779–791. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.9.9>.
- [19] A.A. Farias, M.J. Kittlein, Small-scale spatial variability in the diet of pampas foxes (*Pseudalopex gymnocercus*) and human-induced changes in prey base, *Ecol. Res.* 23 (2008) 543–550.
- [20] E.M. Vieira, D. Port, Niche overlap and resource partitioning between two sympatric fox species in southern Brazil, *J. Zool.* 272 (2007) 57–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00237.x>.
- [21] M.S. Di Bitetti, Y.E. Di Blanco, J.A. Pereira, A. Paviolo, I.J. Pérez, Time Partitioning Favors the Coexistence of Sympatric Crab-Eating Foxes (*Cerdocyon thous*) and Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*), *J. Mammal.* 90 (2009) 479–490. <https://doi.org/10.1644/08-mamm-a-113.1>.
- [22] M.A.S. Bossi, R.P. Migliorini, T.G. Santos, C.B. Kasper, Comparative trophic ecology of two sympatric canids in the Brazilian Pampa, *J. Zool.* (n.d.).
- [23] M. Faria-Correa, R.A. Balbuena, E.M. Vieira, T.R.O. de Freitas, Activity, habitat use, density, and reproductive biology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian

- Atlantic Forest, *Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkunde*. 74 (2008) 220–229.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2008.12.005>.
- [24] M. Cosse, F. Grattarola, N. Mannise, A novel real-time TaqMan™ PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II, *Mammal Res.* 62 (2017) 405–411.
<https://doi.org/10.1007/s13364-017-0328-y>.
- [25] H. Vestheim, S.N. Jarman, Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs, *Front Zool.* 5 (2008) 1742–9994.
- [26] T. Riaz, W. Shehzad, A. Viari, F. Pompanon, P. Taberlet, E. Coissac, ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) e145.
- [27] N.A. Joshi, J.N. Fass, Sickel: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software], (2011).
- [28] J. Zhang, K. Kobert, T. Flouri, A. Stamatakis, PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read mergeR, *Bioinformatics.* 30 (2014) 614–620.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.
- [29] R.C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1792–1797.
- [30] H.-J. Bandelt, P. Forster, A. Röhl, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies., *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 37–48.
- [31] J.W. Leigh, D. Bryant, popart: full-feature software for haplotype network construction, *Methods Ecol. Evol.* 6 (2015) 1110–1116.

- [32] F. Moreno, G. Figueiro, N. Mannise, A. Iriarte, S. González, J.M.B. Duarte, M. Cosse, Use of next-generation molecular tools in archaeological neotropical deer sample analysis, *J. Archaeol. Sci. Reports.* 10 (2016) 403–410.
- [33] X. Turon, A. Antich, C. Palacín, K. Præbel, O.S. Wangensteen, O. S. From metabarcoding to metaphylogeography: separating the wheat from the chaff. *Ecol. App.* 30(2020) e02036.
- [34] I. Kalvari, E.P. Nawrocki, N. Ontiveros-Palacios, J. Argasinska, K. Lamkiewicz, M. Marz, S. Griffiths-Jones, C. Toffano-Nioche, D. Gautheret, Z. Weinberg, E. Rivas, S.R. Eddy, R.D. Finn, A. Bateman, A.I. Petrov, Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families, *Nucleic Acids Res.* (2020). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1047>.
- [35] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 2731–2739. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/28/10/2731.abstract>.
- [36] G.F. Ficetola, E. Coissac, S. Zundel, T. Riaz, W. Shehzad, J. Bessiere, P. Taberlet, F. Pompanon, An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes, *BMC Genomics.* 11 (2009) 434. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-434>.
- [37] E. Corse, C. Tougard, G. Archambaud, D. Duneau, L. Zinger, R. Chappaz, C.C.Y. Xu, E. Meglécz, One-locus-several-primers : A strategy to improve the taxonomic and haplotypic coverage in diet metabarcoding studies One - locus - several - primers : A strategy to improve the taxonomic and haplotypic coverage in diet metabarcoding studies, (2019). <https://doi.org/10.1002/ece3.5063>.
- [38] S. Tsuji, A. Maruyama, M. Miya, M. Ushio, H. Sato, T. Minamoto, H. Yamanaka, Environmental DNA analysis shows high potential as a tool for estimating intraspecific genetic diversity in a wild fish population, *Mol. Ecol. Resour.* (2020) 1–11.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13165>.

- [39] V.B. García, M.J. Kittlein, Diet, habitat use, and relative abundance of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) in northern Patagonia, Argentina, Mamm. Biol. - Zeitschrift für Säugetierkunde. 70 (2005) 218–226.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2004.11.019>.

Table 1: Summary of the taxonomic identification from the sequences generated in this study. NR: Number of high-quality reads for each detected MOTUs at different taxonomic levels. SV: Number of sequence variants for the species identified in feces of crab-eating and pampas fox.

Order	Family	Genera	Species	Crab-eating fox				Pampas fox			
				Cold (n=6)		Warm (n=2)		Cold (n=10)		Warm (n=9)	
				NR	SV	NR	SV	NR	SV	NR	SV
Amphibia				1186		157		243		0	
Anura	Hylidae			4	-	-	-	-	-	-	-
Anura	Hylidae	Pseudis	sp.	7	-	-	-	-	-	-	-
Anura	Leptodactylidae	Leptodactylus	ocellatus	25	6	-	-	-	-	-	-
Anura	Leptodactylidae	Physalaemus	gracilis	246	41	-	-	-	-	-	-
Anura	Bufonidae			902	-	124	-	-	-	-	-
Anura	Bufonidae	Rhinella	granulosa	-	-	33	5	-	-	-	-
Anura	Odontophrynidae	Odontophrynus	sp.	-	-	-	-	3		-	-
Anura	Odontophrynidae	Odontophrynus	americanus	-	-	-	-	241	32	-	-
Aves				342		646		34		73	
Columbiformes	Columbidae			163	-	-	-	-	-	-	-
Galliforms	Cracidae			-	-	212	-	-	-	-	-
Piciforms	Picidae	Colaptes	sp.	179	-	-	-	-	-	-	-
Passeriformes	Turdidae	Turdus	sp.	-	-	412	-	-	-	73	-
Passeriformes	Turdidae	Turdus	rufiventris	-	-	9	4	-	-	-	-
Passeriformes	Troglodytidae			-	-	-	-	34	-	-	-
Psittaciforms	Psittacidae	Myiopsitta	monachus	-	-	13	3	-	-	-	-
Mammalia				5591		1268		30343		1972	
Artiodactyla	Bovidae	Bos	taurus	117	16	-	-	1095	150	913	118
Artiodactyla	Cervidae	Mazama	gouazoubira	-	-	-	-	100	25	41	7
Artiodactyla	Suidae	Sus	scrofa	-	-	-	-	122	29	-	-
Didelphimorphia	Didelphidae	Didelphis	sp.	-	-	-	-	-	-	10	-
Lagomorpha	Leporidae	Lepus	europaeus	46	13	1268	131	-	-	-	-
Rodentia	Caviidae	Cavia	aperea	3408	386	-	-	20328	632	13	7
Rodentia	Caviidae	Hydrochoerus	hydrochaeris	-	-	-	-	14	7	-	-
Rodentia	Muridae			12	-	-	-	-	-	62	-
Rodentia	Muridae	Mus	sp.	2009	-	-	-	-	-	959	-
Rodentia	Cricetidae			-	-	-	-	15	-	13	-
Rodentia	Cricetidae	Akodon	sp.	-	-	5	1	1851	-	2	-
Rodentia	Myocastoridae	Myocastor	coypus	-	-	-	-	519	82	-	-
Xenarthra	Dasypodidae	Cabassous	sp.	-	-	-	-	18	-	-	-
Xenarthra	Dasypodidae	Dasypus	hybridus	-	-	-	-	5411	418	-	-
Xenarthra	Dasypodidae	Dasypus	novemcinctus	-	-	-	-	101	37	-	-
Xenarthra	Dasypodidae	Euphractus	sexcinctus	-	-	-	-	758	8	-	-
Reptilia				0		33		0		0	
Testudines	Emydidae			-	-	1	-	-	-	-	-
Testudines	Emydidae	Trachemys	sp.	-	-	32	-	-	-	-	-

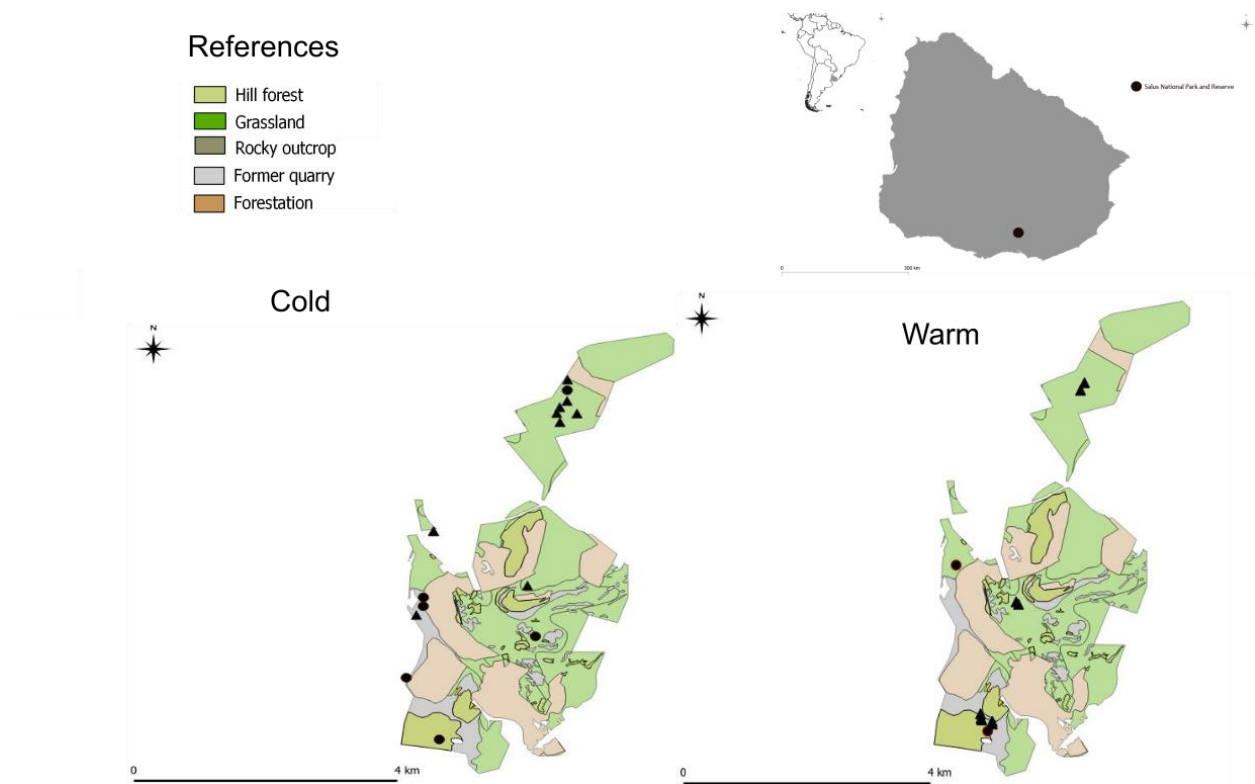


Figure 1: Geographic distribution of collected samples. The upper inset shows the localization of the sampling area. Pampas fox (triangle) and crab-eating fox (circle) sample locations are indicated for cold (left) and warm (right) seasons in a land cover map.

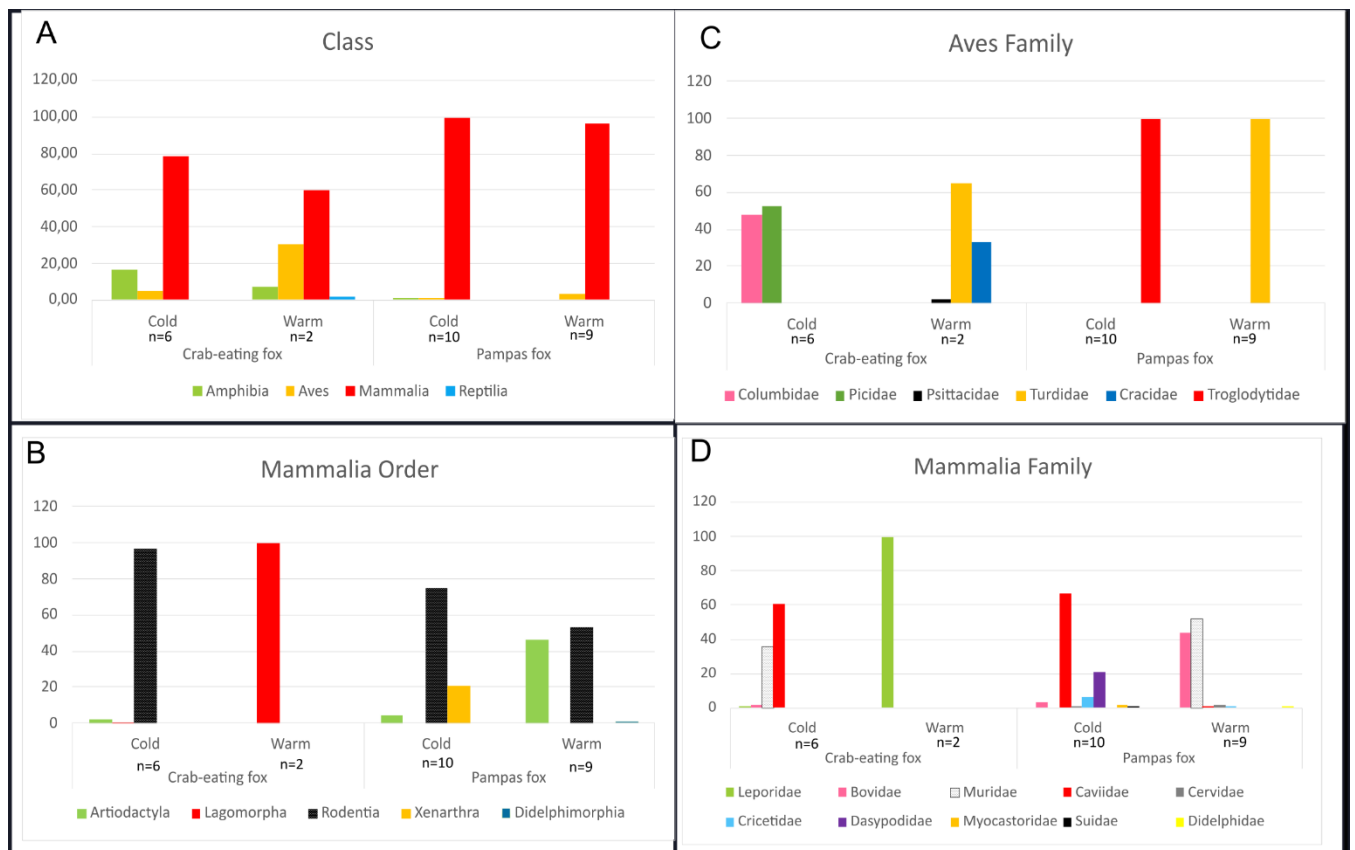


Figure 2: Distribution of vertebrate MOTUs detected in crab-eating and pampas fox diets during cold and warm sampling periods. A-Vertebrate Class taxonomic level, B-Mammalia Orders, C-Aves Family, and D-Mammalia Family.

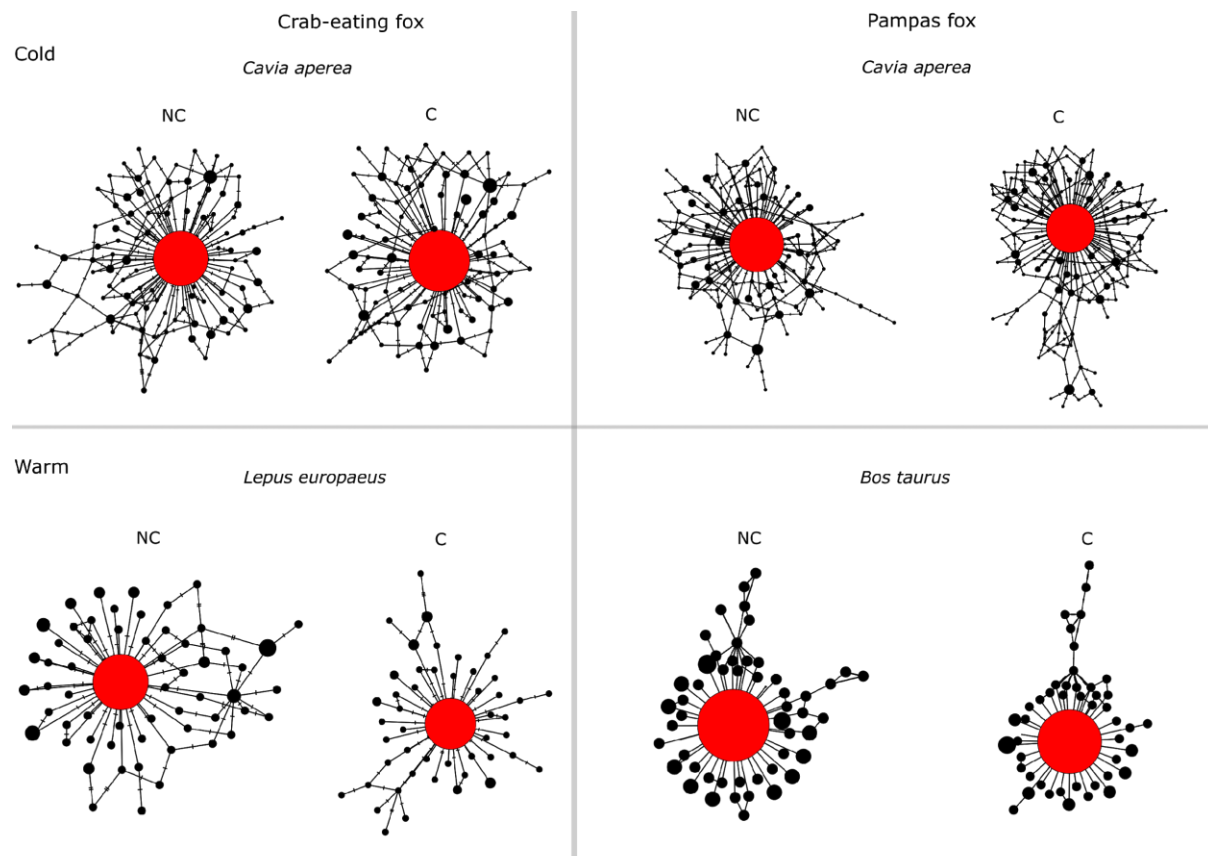


Figure 3: Network reconstruction based on the structurally conserved (C) and non-conserved (NC) sequences variants of the main food items found in our study. Putative biological sequence variants are red-colored, while noisy sequence variants are black-colored.

Supplementary data 1

Bioinformatics sequence analysis.

The pipeline described in this section, shown in Figure 1, was completed for each pool. The sequencing experiments were performed on a MiSeq Illumina platform in the Institute Pasteur of Montevideo.

1. The raw paired-end reads were trimmed based on quality and length (Phred score ≥ 30 , length ≥ 80) through SICKLE software [1]. PCR primers were removed using a locally developed script. Pair-end reads were merged using the PEAR program [2], and the consensus sequences were determined. Only consensus sequences generated from 90% overlapped reads were considered [Fig. 1, 1st step].

2. Once the consensus sequences for each pair of high-quality reads were obtained, redundant (100% identical) sequences were removed through the CD-HIT-EST tool [3] [Fig. 1, 2nd step].

3. BLASTN searches against our reference database were performed for these non-redundant consensus sequences. Blast searches were performed with a minimal identity value of 80% and a minimal query coverage of 70%. Only best hits (those sequences in the database reported with maximum blast score) were considered for taxonomy identification [Fig. 1, 3rd step]. The histogram showing the distribution of identity values of best hits identified is shown for each pool in Fig. 2 of this supplementary data.

4. For each consensus sequence, all hits in the database that showed the maximum blast score were listed together with their associated taxonomical metadata. The total number of non-redundant consensus sequences that match each species in the reference database were calculated, and then species were ordered decreasingly [Fig. 1, 4th step].

5. A biological criterion was used to define species as candidate food items. All identified taxa (best hit) that do not occur in the study area, or region, were considered erroneous matches due to reference database gaps or the molecular marker's inadequate resolution to discriminate closely related species. The highest number of non-redundant consensus sequences assigned to these erroneous matches were used as a threshold for acceptance. All hits below these thresholds were considered not trustable. When species were not present in the region, but a species from the same Genera inhabited the study area, the determination was left at the Genera taxonomic level. A list of candidate food items at Species or Genera level was finally obtained for each pool [Fig. 1, 5th step].

6. The original consensus sequences obtained for each item (output 1st step) in each pool were used for further statistical and sequence variant analyses [Fig. 1, 6th step]. Multiple alignments and sequence variants networks were generated with all recovered original consensus sequences assigned to each candidate food item in each season and each fox species. Alignments were done in MUSCLE [4]. The minimum spanning method [5] was used as implemented in PopArt software for network reconstruction [6].

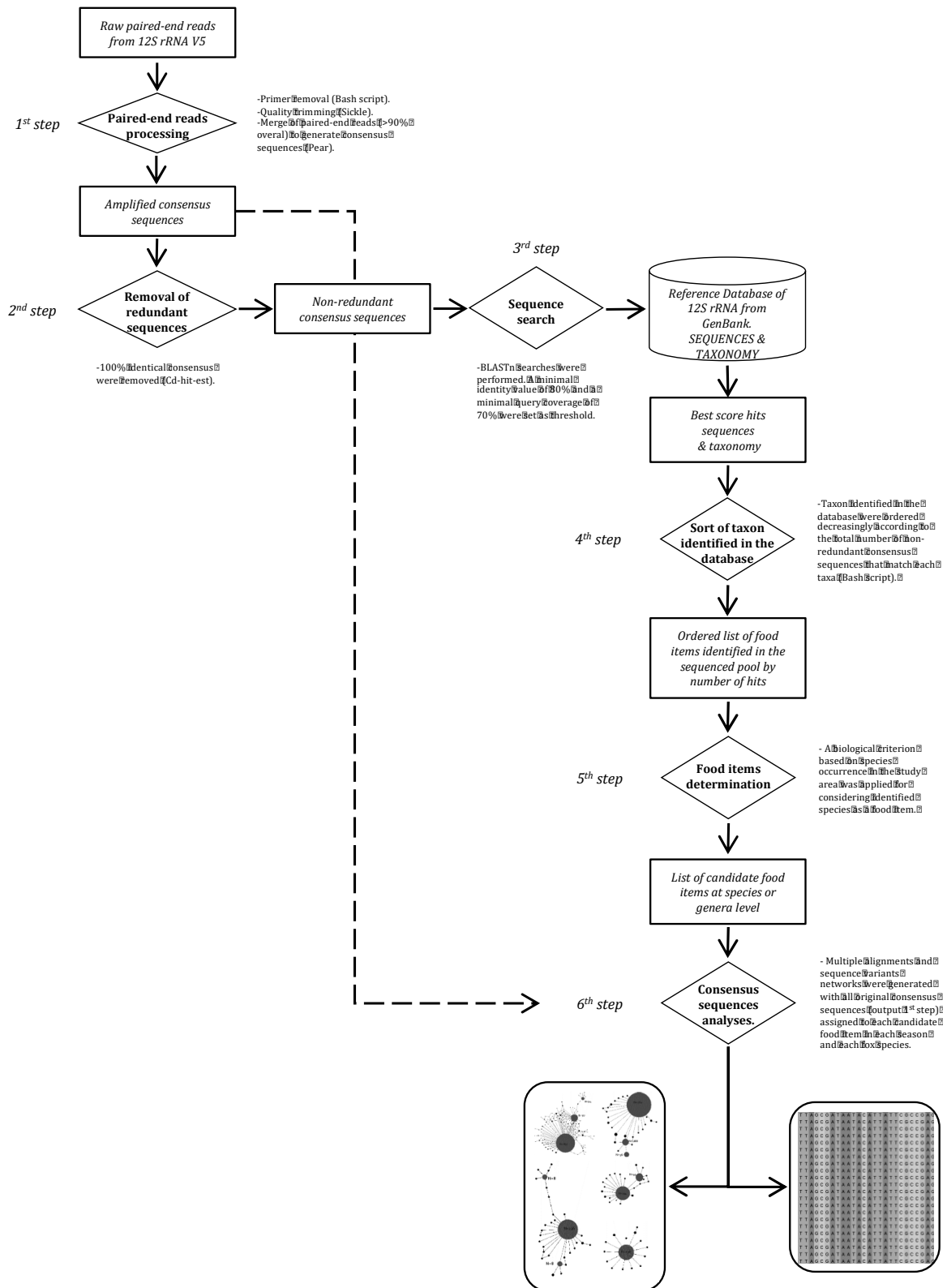


Figure 1: Bioinformatic workflow, from paired-end reads to food items identification and sequence variant network reconstruction.

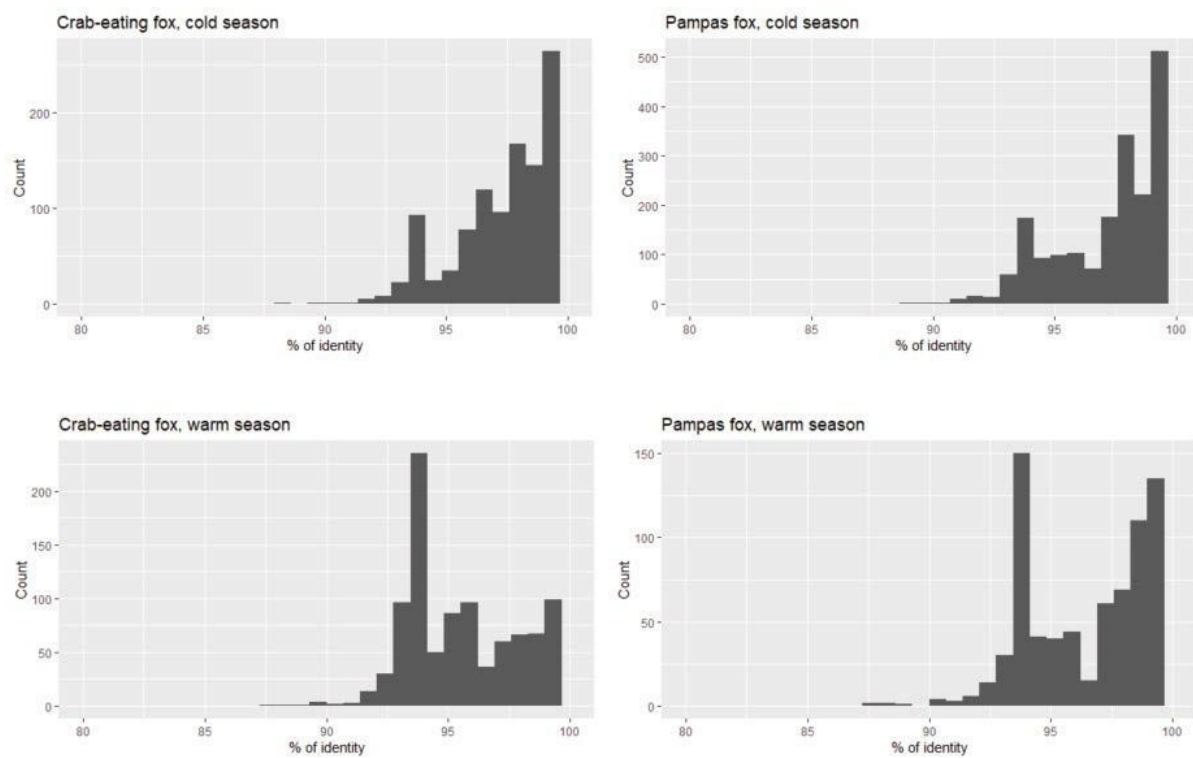


Figure 2: Histogram showing the distribution of identity percentage for BLAST best hits for each pooled sample.

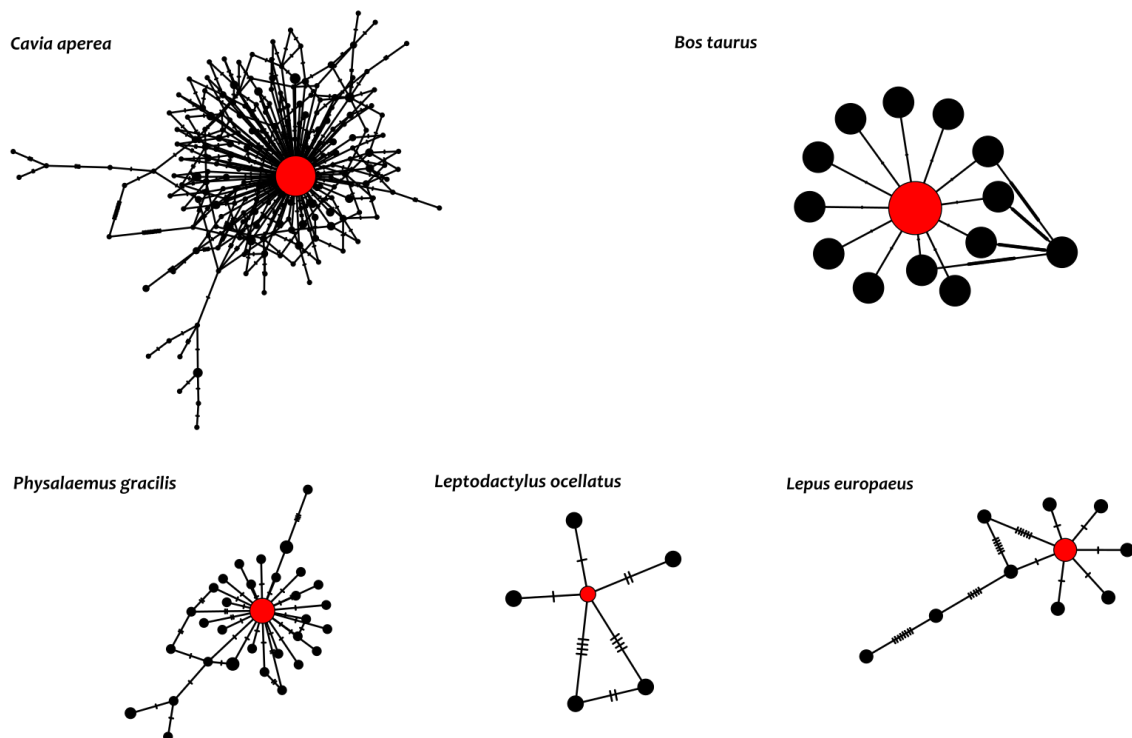
Supplementary data 2

Networks reconstructions.

A network was constructed for each food item species identified in feces of crab-eating and pampas foxes collected during cold and warm seasons. Note that the analysis is applied to species that presented more than one sequence variant. The networks were built using the minimum spanning method in the PopArt software [6] and are shown in this figure section.

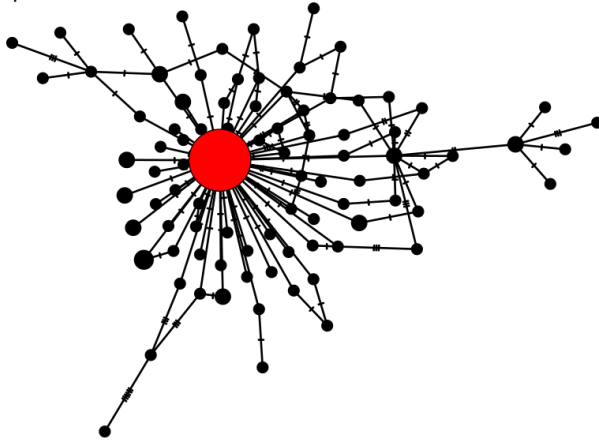
Sequences in a central position (red-colored) in the network are considered biological sequence variants; those positioned in the peripheral represent noisy variants.

Crab-eating fox- Cold season

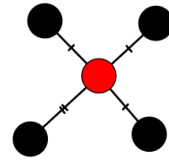


Crab-eating fox- Warm season

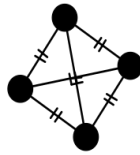
Lepus europaeus



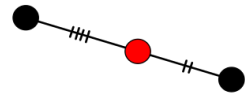
Rhinella granulosa



Turdus rifiventris

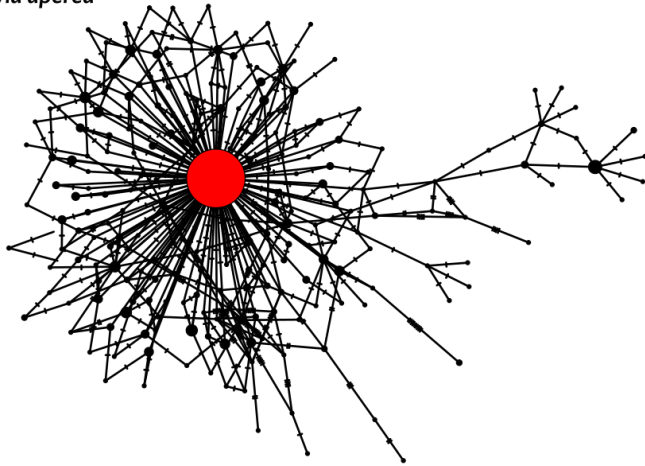


Myiopsitta monachus

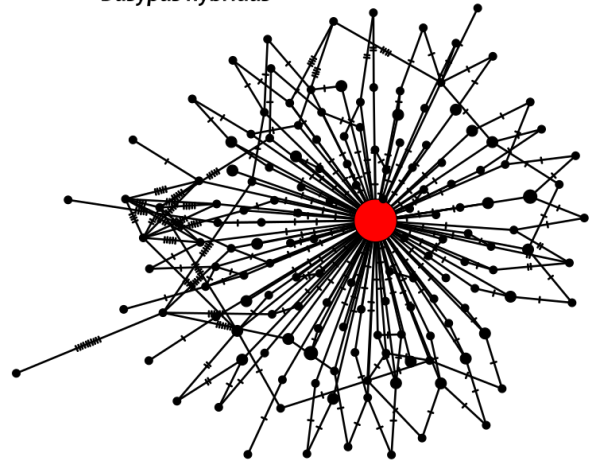


Pampas fox- Cold season

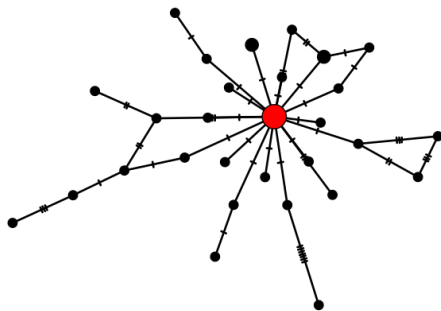
Cavia aperea



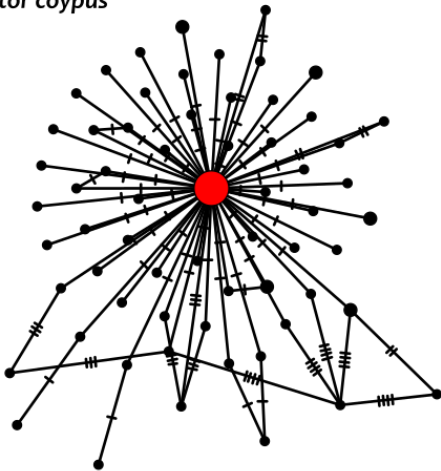
Dasypus hybridus



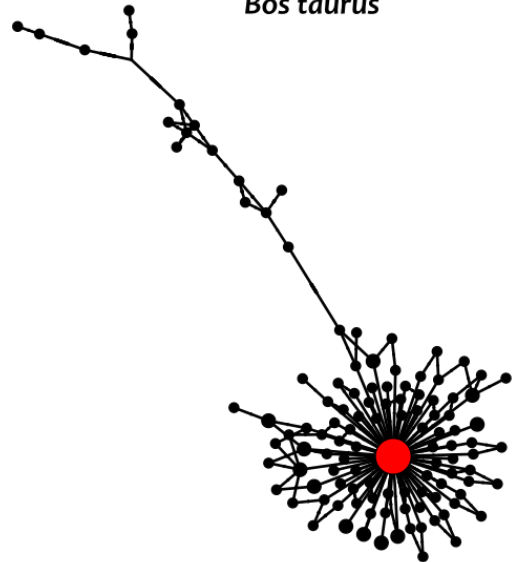
Dasypus novemcinctus



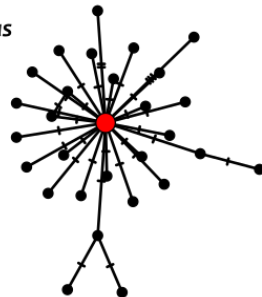
Myocastor coypus



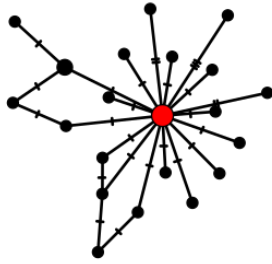
Bos taurus



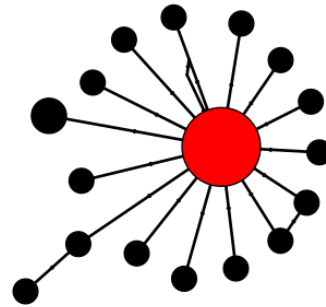
Odontophrynus americanus



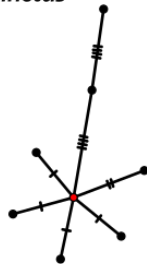
Mazama gouazoubira



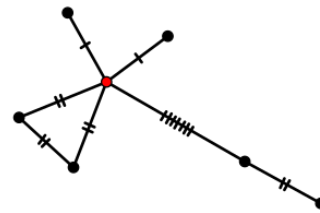
Sus scrofa



Euphractus sexcinctus

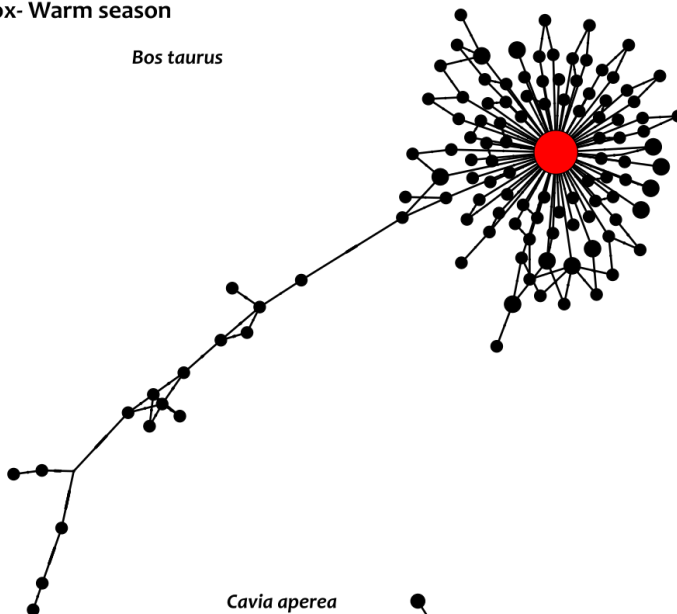


Hydrochoerus hydrochaeris

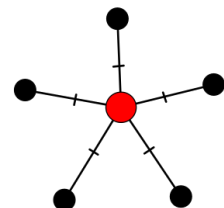


Pampas fox- Warm season

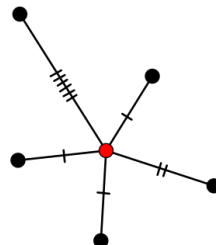
Bos taurus



Mazama gouazoubira



Cavia aperea



Network reconstructions for species detected in the feces of crab-eating and pampas fox in cold and warm seasons.

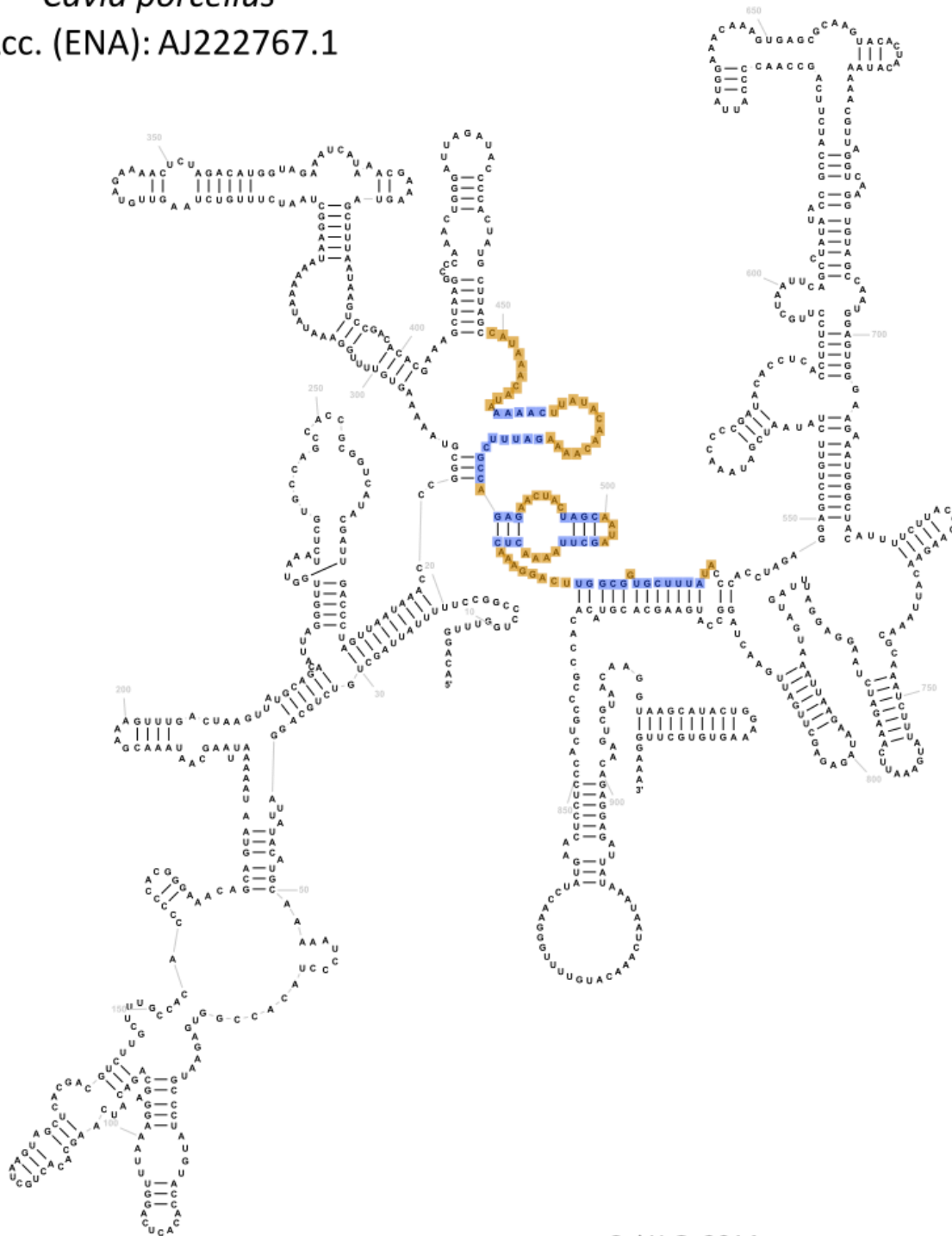
Supplementary data 3

Analysis of conserved and non-conserved sequences based on the secondary structure of the 12S rRNA.

For the main food species detected on each pool, we identified structurally conserved and non-conserved sequences in the consensus generated from reads. Then, we estimated the nucleotide distance as a proxy of variation. Secondary structure prediction was done based on the Rfam site (rfam.xfam.org) prediction server [7]. The mean p -distance was estimated in MEGA v7 [8]. The structurally conserved (helices in blue) and non-conserved (loops in orange) sequences for *Cavia porcellus* (guinea pig), *Oryctolagus cuniculus* (rabbit), and *Bos taurus* (cow) are indicated in the figure of this section (see below).

Null or marginal differences were found in the overall mean p -distance estimated in structurally conserved and non-conserved sequences (mean p -distance difference < 0.001). *Cavia aperea* sequences identified in crab-eating fox and pampas fox feces from the cold season have a mean p -distance of 0.03 (SE= 0.00) and 0.04 (SE= 0.00), respectively. The mean p -distance of *Lepus europaeus* sequences detected in crab-eating fox feces collected during the warm season was 0.04 (SE= 0.00). The mean p -distance of the consensus sequences from *Bos taurus* recovered from pampas fox feces in the warm season was 0.10 (SE= 0.00).

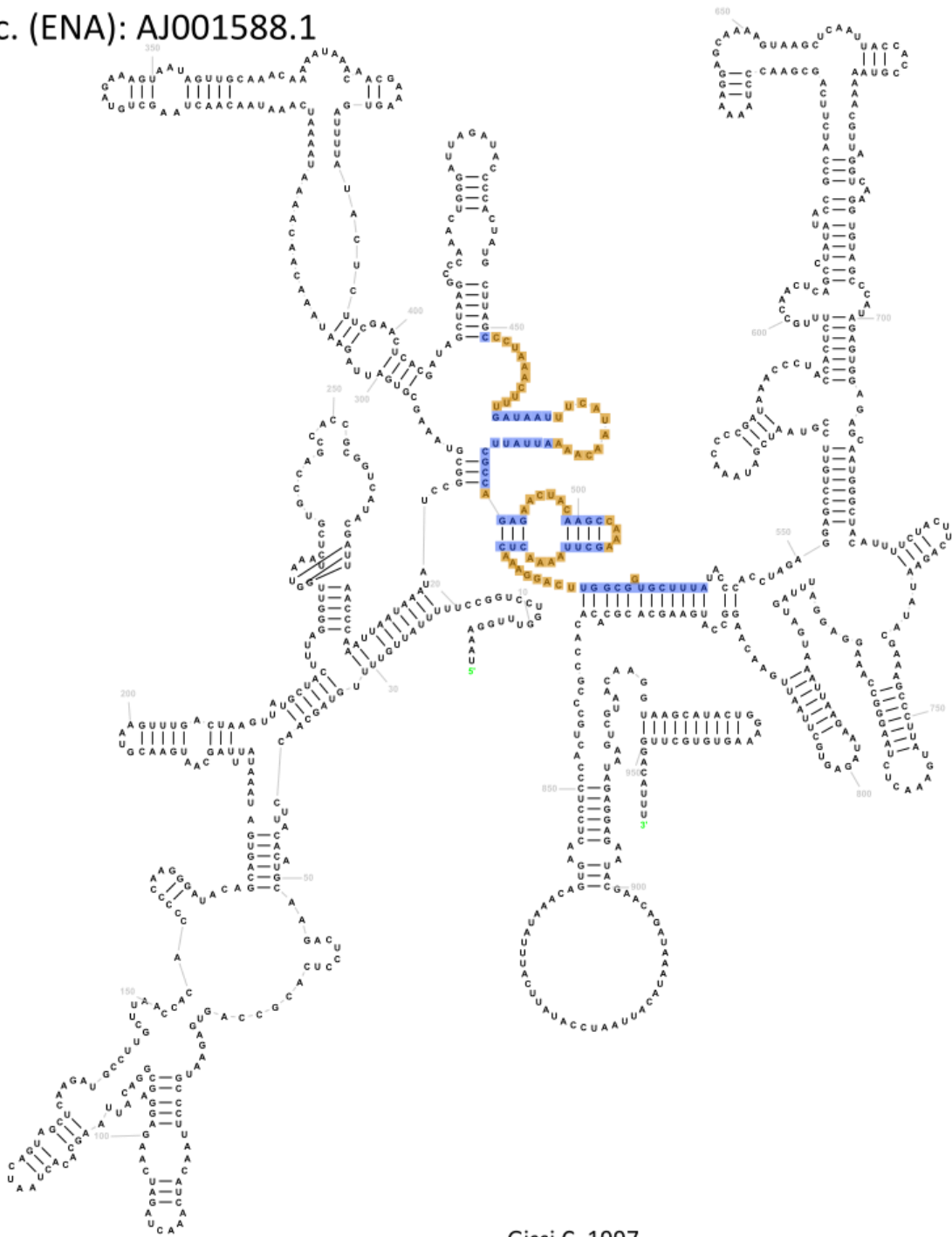
Cavia porcellus
Acc. (ENA): AJ222767.1



Cui X-G, 2014.

Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, China

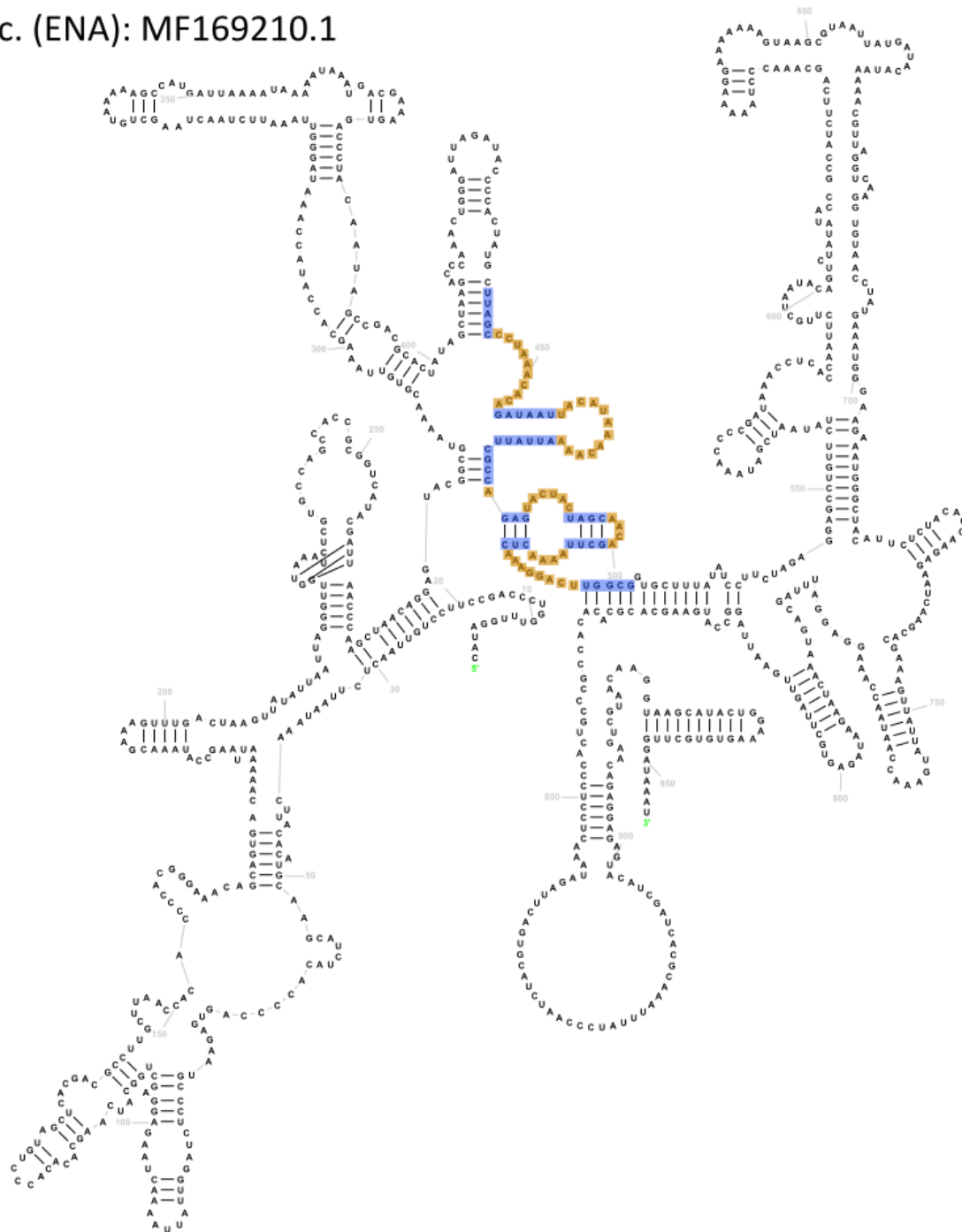
Oryctolagus cuniculus
Acc. (ENA): AJ001588.1



Gissi C, 1997

Dept. of Genetics, Division of Evolutionary Systematics, University of Lund, Sweden.

Bos taurus
Acc. (ENA): MF169210.1



Bro-Jorgensen MH, 2017
Centre for GeoGenetics, University of Copenhagen, Denmark

Secondary structurally conserved (blue) and non-conserved (orange) sequences are presented for *Cavia porcellus* (guinea pig), *Oryctolagus cuniculus* (rabbit), and *Bos taurus* (cow) downloaded from

the Rfam site. Accession numbers (Acc.) from European Nucleotide Archive (ENA) and citations are included in each scheme.

Supplementary data References

- [1] N.A. Joshi, J.N. Fass, Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software], (2011).
- [2] J. Zhang, K. Kobert, T. Flouri, A. Stamatakis, PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR, *Bioinformatics*. 30 (2014) 614–620.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.
- [3] L. Fu, B. Niu, Z. Zhu, S. Wu, W. Li, CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data, *Bioinformatics*. 28 (2012) 3150–3152.
- [4] R.C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1792–1797.
- [5] H.-J. Bandelt, P. Forster, A. Röhl, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies., *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 37–48.
- [6] J.W. Leigh, D. Bryant, Popart: full-feature software for haplotype network construction, *Methods Ecol. Evol.* 6 (2015) 1110–1116.
- [7] I. Kalvari, E.P. Nawrocki, N. Ontiveros-Palacios, J. Argasinska, K. Lamkiewicz, M. Marz, S. Griffiths-Jones, C. Toffano-Nioche, D. Gautheret, Z. Weinberg, E. Rivas, S.R. Eddy, R.D. Finn, A. Bateman, A.I. Petrov, Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families, *Nucleic Acids Res.* (2020). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1047>.
- [8] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 2731–2739.
<http://mbe.oxfordjournals.org/content/28/10/2731.abstract>.

7.4. Informe técnico

Análisis de los vertebrados presentes en la dieta de zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) en dos establecimientos de cría ovina en Uruguay.

Natalia Mannise, Mariana Cosse, Andrés Iriarte, Susana González.

Antecedentes

El zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) es una de las especies de cánidos autóctonos más abundantes y ampliamente distribuidas en Uruguay, junto con el zorro de monte (*Cerdocyon thous*) (González and Martínez- Lanfranco 2012). Si bien ambas especies presentan tamaño mediano similar (4- 7 kg.) y cohabitan en una extensa área de América del Sur, poseen rasgos distintivos que las diferencian (Berta 1982; Lucherini et al 2004; Di Bitetti et al 2009). El zorro de campo presenta un pelaje grisáceo con una banda oscura en el dorso y un punto oscuro en la porción distal de su tupida y larga cola; el vientre es gris claro o blanquecino (Lucherini et al 2004). El rango de distribución geográfica de la especie se extiende desde el este de Bolivia hasta el norte y centro de Argentina (Lucherini et al 2004). El zorro de campo ocupa áreas abiertas, encontrándose en praderas del Cono Sur y pasturas modificadas para el desarrollo de ganadería (Lucherini et al 2004).

En el territorio nacional se han desarrollado estudios previos en zorro de campo. A partir de tejidos de animales muertos atropellados en las rutas, se determinó la presencia de dos grupos genéticos que no muestran agregación geográfica ni ambiental (Juan 2019). La presencia de animales con dos grupos genéticos distintas puede sugerir que Uruguay sea una zona de intercambio. Para confirmarlo, es necesario incluir

muestras de zorro de campo de Brasil y Argentina que nos permitan tener información de su estructura genética en un rango geográfico más amplio (Juan 2019).

El zorro de campo es considerado omnívoro generalista y oportunista. Estudios en otras áreas de su distribución han revelado que su dieta varía estacionalmente y por lo tanto se adapta a la disponibilidad de recursos (Farias and Kittlein 2008; Lucherini and Luengos Vidal 2008; García and Kittlein 2005). Dentro de los ítems de la dieta se han reportado vertebrados (autóctonos y exóticos), artrópodos y frutos. Esto señala su importante rol ecológico en el control de poblaciones de sus presas y en la dispersión de semillas (Lucherini and Luengos Vidal 2008; Vieira and Port 2007; García and Kittlein 2005). Los mamíferos que predominan en la dieta son roedores y liebres (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Vieira and Port 2007). Si bien estudios recientes en Brasil registraron restos ovinos en sus fecas, los autores proponen que este hallazgo se vincula con los hábitos carroñeros descritos previamente en esta especie (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008).

La especie ha sido perseguida ya que se considera que tiene un papel importante en la depredación de corderos (Lucherini et al 2004). En este contexto, se llevó a cabo un estudio en el departamento de Colonia (Sierra de Mal Abrigo), donde se determinó que los ataques son mayormente dirigidos a corderos débiles (Cravino et al 1997). Sin embargo, las pérdidas en las majadas de ovinos siguen afectando al sector lanar y los productores plantean que los zorros de campo son uno de los depredadores que impactan sobre las mismas (Frade 2015). No obstante, los canidos silvestres cumplen un rol fundamental en la estructura y composición de los ecosistemas, por lo cual la disminución en su población o completa remoción impactaría gravemente sobre la biodiversidad y funcionalidad de los sistemas naturales (Ripple et al 2014). De esta manera, es urgente llevar a cabo estudios enfocados en la dieta de los zorros de campo y colaborar en la minimización del conflicto (Bhatia et al 2013).

Actualmente, la combinación de protocolos de secuenciación masiva y la colecta de muestras ambientales permite obtener secuencias a gran escala, posibilitando recabar información para responder preguntas de ecología trófica (Monterroso et al 2019; Wei et al 2019; Taberlet et al 2012a; Metzker 2009). El *metabarcoding* de ADN se basa en la identificación de numerosas especies o taxones superiores a partir de ADN total extraído

de muestras depositadas en el ambiente, como son las fecas y su posterior secuenciación masiva (Taberlet et al 2012b). En los últimos años, esta moderna herramienta ha sido empleada en estudios de dieta en especies omnívoras (De Barba et al 2014). La utilización de *metabarcoding* de ADN requiere la consideración de ciertos desafíos. En primer lugar, las muestras de ADN depositadas en el ambiente están expuestas a condiciones ambientales que afectan su preservación, encontrándose típicamente degradado (Taberlet et al 2012a; Taberlet and Luikart 1999). Por lo tanto, se utilizan cebadores que amplifican fragmentos de pequeño tamaño (aproximadamente 100- 250 pb) pero que a su vez permiten discriminar especies o taxones de interés (Srivathsan et al 2016; Taberlet et al 2012a). Asimismo, los cebadores deben tener una amplia cobertura taxonómica, permitiendo amplificar por PCR numerosos taxones en simultáneo para su posterior secuenciación masiva (Srivathsan et al 2016; Taberlet et al 2012a).

Objetivo

El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio comparativo en dos establecimientos dedicados a la cría ovina a lo largo de un año incluyendo la época de parición ovina. Estos establecimientos realizan un manejo diferente del stock ovino.

Metodología

Muestreos

Las muestras se colectaron durante la época de parición del 2016 (setiembre-octubre), verano (febrero- marzo) e invierno (agosto) del 2017, en dos establecimientos: San Luis (33° 56' 55,698'' S, 55° 37' 47, 499'' O; departamento de Florida) y San Ramón (31° 09' 26,6976'' S, 56° 57' 23, 9004'' O; departamento de Salto) (Fig. 1). Dichos establecimientos fueron seleccionados ya que presentan diferencias en el manejo ovino y conflictos por depredación de corderos. El establecimiento en Florida tiene un manejo del ganado de tipo más intensivo que aquel en Salto.

Se contó con tres asistentes en campo que mediante recorridos a pie de 8hs. en promedio, llevaron a cabo la búsqueda de fecas de carnívoros por tres días. Las fecas encontradas fueron georreferenciadas, fotografiadas y colectadas en bolsas estériles para su almacenamiento a 4°C para su posterior análisis en el laboratorio.

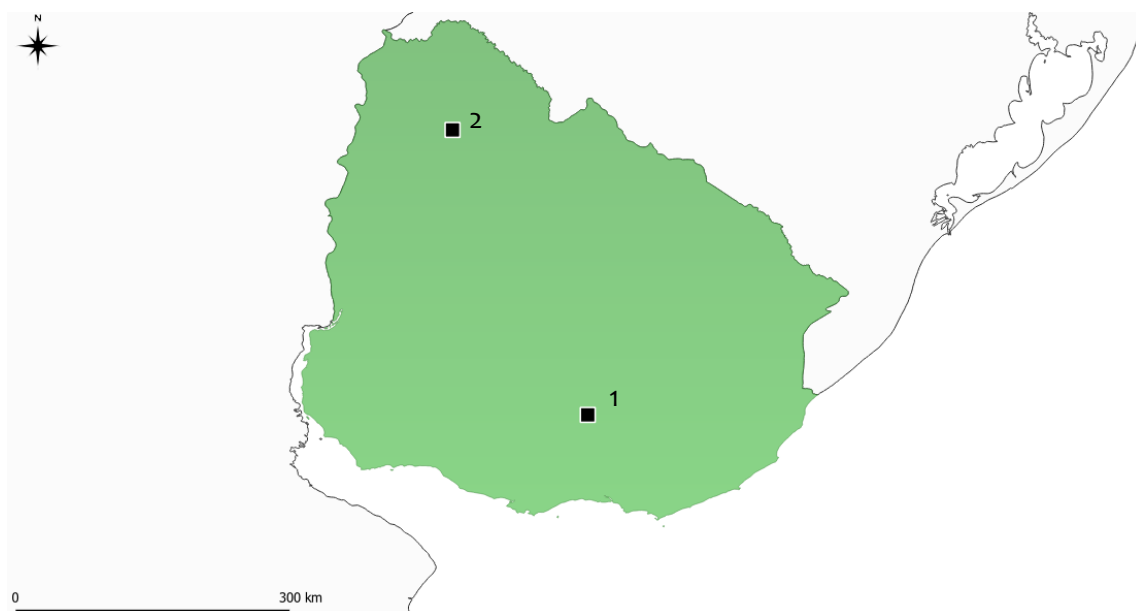


Figura 1: Mapa de Uruguay con las localizaciones de los sitios de muestreo: 1- Establecimiento San Luis (Florida), 2- Establecimiento San Ramon (Salto).

Diseño experimental

Se aisló ADN total a partir de las fecas, utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit – QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad y cantidad del ADN extraído fue verificada mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000).

El ADN extraído contiene tanto ADN del depositario de la feca como de los ítems de su dieta. Para la identificación de la especie de cánido depositario de la feca, se amplificó por PCR en tiempo real un fragmento de 154 pb. del gen citocromo oxidasa II del ADN mitocondrial. En esta reacción se utilizaron tres sondas TaqMan™ especie-específicas para la asignación de fecas pertenecientes a zorro de monte, zorro de campo y perro doméstico (Cosse et al 2017). Para ello se siguieron las condiciones de reacción y ciclado descritas por Cosse et. al. (2017). En aquellos casos donde no se identificaron especies de cánidos depositarios de las fecas, se determinó la especie de mamífero a la que pertenecían mediante la amplificación por PCR anidado de un fragmento de la región

control del ADN mitocondrial (Grattarola et al 2014). Esta región permite la determinación de especie mediante la diferencia en el tamaño del amplicón que se detecta por electroforesis en gel de agarosa al 2%. El protocolo utilizado para PCR anidado fue el previamente descrito por Grattarola et. al. (2014).

Para aquellas fecas que pertenecían a zorro de campo se procedió a la identificación de los taxones vertebrados presentes en la dieta. Se amplificó por PCR en tiempo final un fragmento (98pb.) del lazo V5 del gen 12S del ADN mitocondrial, utilizando cebadores universales para vertebrados (Riaz et al 2011). Para minimizar la amplificación del depositario de la feca, se incluyó en la reacción un oligonucleótido bloqueador específico para zorro de campo (descrito en la sección anterior de este capítulo). La reacción de PCR contenía en un volumen final de 10 µl: 0.04 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 1X Taq Buffer, 1. 5mM de MgCl, 0.2mg/mL de BSA (Suero Albumina Bovino), 0.05mM de dNTPS, 0.1 µM de cada cebador, 1.6 µM del oligonucleótido bloqueador y 4- 8ng/µl de concentración final de ADN. Los cebadores utilizados (forward y reverse) contenían secuencias adaptadoras para su secuenciación masiva en la plataforma Illumina™. Las condiciones del ciclado consistieron en una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 35- 45 ciclos (dependiendo de la calidad y cantidad del ADN fecal) de 94°C -30 segundos y 58°C -90 segundos. El éxito de la amplificación fue corroborado por electroforesis en gel de agarosa al 2% usando Goodview™ (SBS Genetech) para tinción de ADN. Los productos amplificados fueron purificados por el método enzimático FastAP- ExoI (ThermoFisher) y posteriormente cuantificados en espectrofotómetro UV/Vis (Nanodrop 1000). Los productos de PCR obtenidos fueron agrupados en conjuntos (*pools*) de muestras de acuerdo al sitio y época de muestreo. Se generaron 6 conjuntos equimolares de productos de PCR: i- zcFP (zorro de campo Florida Parición), ii- zcFV (zorro de campo Florida Verano), iii- zcFI (zorro de campo Florida Invierno), iv- zcSP (zorro de campo Salto Parición), v- zcSV (zorro de campo Salto Verano), vi- zcSI (zorro de campo Salto Invierno). Los distintos conjuntos se secuenciaron *paired- ends* (2x 100) en plataforma MiSeq Illumina en el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea).

Las lecturas obtenidas fueron recortadas (*trimmeadas*) en base a su calidad (*phred score* ≥ 30) usando el programa SICKLE (Joshi et al 2011). Los cebadores del PCR

fueron removidos mediante un programa (*Bash script*) desarrollado localmente y las secuencias consenso fueron generadas con el programa PEAR (Zhang et al 2014).

Se desarrollaron una serie de programas (*Bash scripts*) locales que permitieron determinar los taxones presentes en la dieta. Brevemente, las secuencias consenso únicas fueron retenidas y comparadas mediante la herramienta informática *Blast* con secuencias disponibles públicamente (Altschul et al 1990). Para ello se construyó una base de referencia conteniendo aquellas secuencias disponibles en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de USA (NCBI, por sus siglas en inglés, disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov). La base incluye genomas completos y secuencias parciales. Las secuencias más similares son aquellas con mejor *Blast score*, para las cuales se extrajo su información taxonómica. El valor mínimo de % de identidad considerado fue en todos los casos mayor a 75%. En los casos en donde las secuencias más similares no pertenecían a especies presentes en el área de estudio, se determinó el ítem a niveles taxonómicos superiores de Género, Familia y Orden. Las gráficas de los taxones presentes en la dieta fueron construidas para aquellos taxones con al menos 10 secuencias no redundantes. El detalle de la estrategia bioinformática utilizada se encuentra disponible en el esquema de trabajo presentado en el apartado anterior (Fig.1 Supplementary Data 1).

Mediante el test estadístico Test Exacto de Fisher (Fisher 1922), se analizó si existían diferencias significativas en la presencia de restos ovinos entre la época de parición, verano e invierno en un mismo establecimiento muestreado.

Resultados y discusión

En total se colectaron 141 fecas, 75 procedentes del establecimiento San Luis (Florida) y 66 de San Ramón (Salto). Un 55,3 % de las fecas fueron identificadas como zorro de campo y un 6,7% fueron asignadas como pertenecientes a otras especies. En Florida se determinó la presencia de fecas de zorro de monte en invierno (N= 1), zorrillo en verano (N= 1) y tatú peludo en la época de parición ovina (N= 3). En Salto se encontraron fecas de perro doméstico en verano (N= 1) y zorro de monte en invierno (N= 1). Finalmente, para un 38% de las fecas no fue posible determinar la especie depositaria.

Esta dificultad es propia de las condiciones de preservación del ADN presente en las fecas, el cual se encuentra degradado y en baja cantidad (Taberlet et al 1999).

En ambos establecimientos el número de muestras de zorro de campo colectadas en la época de parición ovina fue menor en comparación con aquellas colectadas en invierno y verano (Tabla I). Sin embargo, éstas fueron las primeras salidas de campo que se realizaron a cada uno de los establecimientos y por tanto, no puede descartarse que la disminución en los números colectados se relacione con falta de conocimiento del área de muestreo.

Tabla I: Número de fecas por especie identificada molecularmente, en cada período de muestreo (Parición, Invierno, Verano) y establecimiento (San Luis- Florida, San Ramón- Salto).

San Luis- Florida							
	Lg	Cf	Ct	Cc	Es	Indet	Total
Parición	6	-	-		3	8	18
Invierno	22	-	1	-	-	14	37
Verano	18	-	-	1	-	1	20
Total							75
San Ramón- Salto							
	Lg	Cf	Ct	Cc	Es	Indet	Total
Parición	8	-	-	-	-	14	23
Invierno	13	-	1	-	-	8	22
Verano	11	1	-	-	-	9	21
Total							66

Lg: *L. gymnocercus* (zorro de campo), Cf: *C. lupus familiaris* (perro doméstico), Ct: *C. thous* (zorro de monte), Cc: *C. chinga* (zorrillo), Es: *E. sexcinctus* (tatú peludo), Indet: indeterminado.

Los grupos de muestras generados para su secuenciación masiva contenían muestras exclusivamente de zorro de campo. Para Florida, contenían 6 muestras de la época de parición, 22 de invierno y 18 de verano; mientras que para Salto se contó con 8 para la época de parición, 13 en invierno y 11 en verano.

La aproximación de *metabarcoding* de ADN empleada en este estudio permitió asignar de manera precisa la presencia de especies y taxones superiores presentes en la

dieta de zorro de campo en ambos establecimientos en los períodos muestreados. Dicha metodología ha sido ampliamente utilizada para analizar la dieta de otras especies de omnívoros, en donde a través de múltiples fragmentos de ADN detectaron vertebrados, invertebrados y plantas (De Barba et al 2014; Galan et al 2012). Por ejemplo, en el oso pardo europeo, se analizaron fragmentos de la misma región del gen 12s del ARN ribosomal del ADN mitocondrial que empleamos en este estudio para la detección de vertebrados presentes en las fecas (De Barba et al 2014). En dicho trabajo asignaron los taxones presentes en la dieta de oso pardo encontrándose restos de mamíferos (bovinos, ovinos, cabras, chancho jabalí, ciervos y liebres) y aves (gallinas) (De Barba et al 2014). En el presente estudio se detectaron taxones mamíferos, aves, anfibios, reptiles y peces en las fecas de zorro de campo colectadas en ambos establecimientos en los distintos períodos muestreados (Fig. 2A). De esta manera, los resultados obtenidos son consistentes con estudios previos en donde se aplica la misma estrategia experimental (De Barba et al 2014).

En el presente estudio se identificaron numerosos taxones vertebrados presentes en la dieta de zorro de campo en los dos establecimientos de cría de ganado muestreados. Este resultado afirma que se trata de un depredador generalista y oportunista capaz de explotar una amplia variedad de vertebrados (Garcia and Kittlein 2005). Otros estudios de dieta realizados para la especie no sólo demuestran que consumen vertebrados, sino también frutos e invertebrados. Los taxones mamíferos fueron registrados en mayor proporción, mientras que aves, reptiles, anfibios y peces se encontraron en menor porcentaje (Fig. 2A). En todos los casos los peces fueron los menos frecuentes, excepto para el muestreo de invierno en Salto en donde los reptiles fueron los que se registraron en menor porcentaje (Fig.2). Análisis tróficos en otras áreas donde habita la especie también revelaron que los mamíferos son los componentes dietarios más frecuentes dentro de los vertebrados (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Vieira and Port 2007; Garcia and Kittlein 2005). Algunos estudios reportan la presencia de aves y reptiles en segundo lugar y en similar proporción (Bossi et al 2019; Vieira and Port 2007; Garcia and Kittlein 2005). La presencia de anfibios y peces es descrita en solo un trabajo, siendo los peces aquellos en menor proporción (Bossi et al 2019). Los estudios tróficos previos fueron realizados a partir de la observación de restos

en fecas y contenido intestinal, dicha metodología presenta limitantes en el nivel de asignación taxonómica alcanzado que pueden afectar la detección de anfibios y peces (Bossi et al 2019). En este sentido, la aproximación de *metabarcoding* de ADN utilizada aquí implica un avance respecto a la metodología clásica ya que permitió la identificación de los distintos taxones vertebrados, incluso alcanzando niveles de asignación de Genero y Especie (Anexo 1).

Los componentes de la dieta de zorro de campo variaron estacionalmente para un mismo establecimiento. En el establecimiento San Luis (Florida) predominó la presencia de mamíferos en los tres períodos muestreados, durante el invierno no se detectaron ni reptiles ni peces (Fig.2). Durante el verano y el invierno, el segundo grupo taxonómico más representado fueron las aves, mientras que en la parición ovina fueron los anfibios. Para el área de muestreo de Salto en el establecimiento San Ramón, también se registraron mamíferos como los taxones presentes en mayor proporción en las tres épocas de muestreo. Si bien se identificaron aves en las tres estaciones, la presencia de reptiles, anfibios y peces fue muy baja (Fig.2, Anexo1). Estos resultados se relacionan con los hábitos alimenticios generalistas y adaptables que poseen los zorros de campo. De hecho, se ha determinado que existen variaciones geográficas en la composición de la dieta de la especie, incluso a escala relativamente pequeña (Farias and Kittlein 2008; Lucherini and Luengos Vidal 2008). En el presente estudio se observan diferencias en la dieta entre las áreas muestreadas para una misma época (Fig.2, Anexo1). En Florida se determinó la presencia de distintas Familias de anfibios, mientras que en Salto se registró sólo Leptodactylidae y exclusivamente en invierno (Fig. 2, Anexo 1). A su vez, en Salto se registró únicamente la presencia de reptiles de la Familia de lagartos Gymnophthalmidae y en Florida también se encontraron reptiles de las Familias Teiidae, Anguidae y Gekkonidae (Anexo 1). Asimismo, la diversidad de taxones de peces encontrados en el ADN fecal proveniente de Florida fue mayor que la reportada para Salto (Anexo 1). Respecto a las aves, durante la parición se detectaron exclusivamente aquellas del Orden Passeriformes en ambos establecimientos. Durante el verano, en Florida se detectaron en mayor medida Passeriformes y en Salto Charadriiformes; mientras que en el invierno se reportaron en mayor porcentaje Galliformes y Charadriiformes en Florida y Salto, respectivamente (Fig. 2, Anexo 1). Los resultados aquí presentados refuerzan la

existencia de variaciones geográficas-locales y estacionales en la dieta de zorro de campo previamente descrita.

Estudios previos de ecología trófica en zorro de campo describen que los mamíferos del Orden Rodentia y Orden Lagomorpha (liebres) son los más frecuentes (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Vieira and Port 2007; Garcia and Kittlein 2005). Sin embargo, en el presente estudio los mamíferos que se encontraron en mayor porcentaje fueron aquellos del Orden Artiodactyla y dentro de éstos los más frecuentes fueron *Bos taurus* y *Ovis aries* en ambos establecimientos en los tres períodos muestreados (Fig.2, Anexo1). El hallazgo de ADN de ovino y bovino presente en las fecas de zorro de campo es consistente con sus hábitos carroñeros y de consumo de restos de desechos descritos en la literatura (Bossi et al 2019; Lucherini and Luengos Vidal 2008).

En ambos establecimientos durante la época de parición se registró mayor presencia de ADN de *Ovis aries* que de *Bos taurus* (Anexo 1). El Test exacto de Fisher reveló que existen diferencias estadísticamente significativas en la presencia de ADN ovino entre las distintas épocas de muestreo para los establecimientos de Florida y Salto. De hecho, la diferencia en la presencia de ovinos no sólo es significativa entre parición-invierno y parición- verano, sino también entre verano- invierno (en todos los casos $p\text{-valor} < 0,00001$). En base a las diferencias significativas de ADN ovino obtenidas a partir del Test de Fisher entre todas las épocas muestreadas, se puede inferir que éstos no sólo se registran en el momento de la parición y por tanto la presencia de ADN ovino en las fecas de los zorros no estaría exclusivamente relacionada con el evento de parición. El registro de ADN ovino presente en las fecas de ambas áreas de estudio puede estar dado por consumo de desechos, animales muertos, placenta o eventos de caza. Los análisis de dieta en zorro de campo llevados a cabo en otras áreas de su distribución geográfica han reportado una baja presencia de restos de ganado; los autores proponen que los mismos fueron ingeridos como carroña (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Garcia and Kittlein 2005). Sin embargo, en la literatura consultada se plantea que es esperable un elevado consumo de carroña en áreas rurales y suburbanas (Farias and Kittlein 2008; Garcia and Kittlein 2005). A través de la estrategia utilizada en este estudio es posible detectar la presencia de ADN de los vertebrados consumidos, pero no permite discernir acerca del estado en que éstos fueron ingeridos (animales muertos o presas vivas). Para

ello es necesario incluir otras metodologías como el empleo de cámaras trampa o incluso desarrollar herramientas que permitan diferenciar eventos de caza del consumo de carroña. Asimismo, incluir análisis sobre las majadas de ovinos que permitan estimar pérdidas por depredación no sólo por zorros sino también por jabalíes y otros carnívoros nativos y domésticos resulta necesario para una mejor comprensión de la problemática. En Uruguay, se realizaron necropsias y análisis de signos de depredación en corderos hallados muertos y se determinó que sólo el 0,4% de la mortalidad de corderos es causada por ataques a animales sanos; siendo más frecuentes aquellos dirigidos a corderos débiles (Cravino et al 1997). Dicho trabajo fue realizado hace más de 20 años en un único establecimiento ganadero. Estudios actualizados sobre las majadas de distintos establecimientos brindarían información sobre el impacto de la depredación en las mismas.

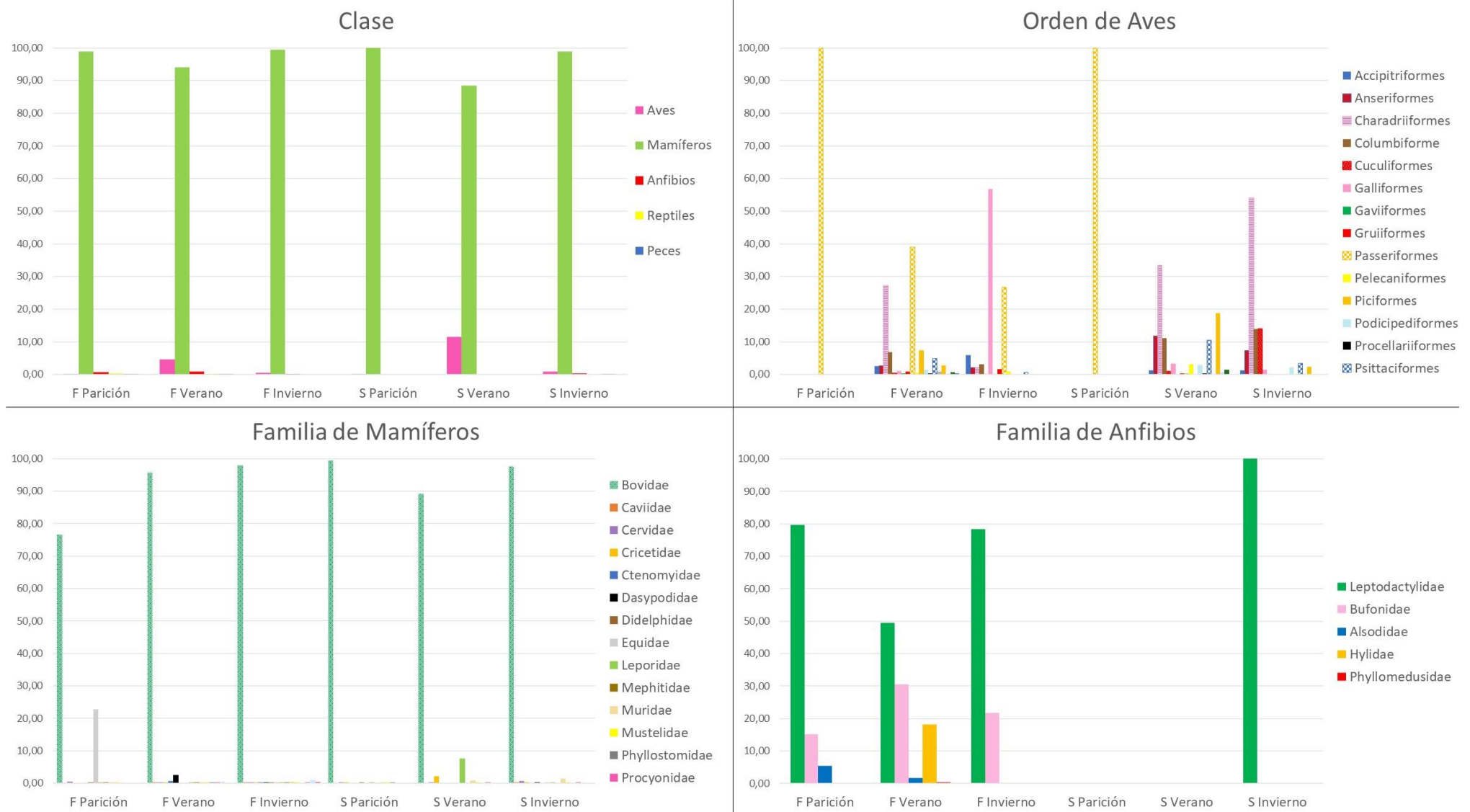


Figura 2: Se muestran las proporciones de secuencias pertenecientes a las distintas Clases de vertebrados encontrados en las fecas de zorro de campo en los establecimientos de Florida (F) y Salto (S) para la época de parición ovina, verano e invierno. También se exhiben los porcentajes de secuencias identificadas con los diferentes Órdenes de aves y Familias de mamíferos y anfibios hallados.

Dentro de los mamíferos, se detectó la presencia de roedores principalmente en invierno en ambos establecimientos muestreados (Anexo 1). Las mulitas y tatúes fueron registrados mayormente en Florida durante el verano; mientras que las liebres lo fueron en el verano en Salto (Anexo 1). Diversas especies de ciervos tanto nativos como exóticos fueron reportadas, incluso en Salto se encontró ADN de venado de campo. Dicha especie de ciervo autóctono está categorizado como amenazada y una de sus dos poblaciones descritas para nuestro país habita en Arerunguá (Salto), una localidad cercana al área de muestreo de Salto (González et al 1998) (Anexo 1). Asimismo, se halló ADN de jabalí, carnívoros y murciélagos los cuales al igual que los ciervos, posiblemente fueron consumidos como carroña (Bossi et al 2019). El registro de los distintos mamíferos es consistente con los estudios previos de ecología trófica realizados previamente para la especie (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Vieira and Port 2007; Garcia and Kittlein 2005); sin embargo, este es el primer estudio en donde se identifican murciélagos en las fecas de zorro de campo.

Los hábitos tróficos de zorro de campo indican que posee un rol ecológico importante en la dispersión de semillas, control de las poblaciones de sus presas e incluso participa en el ciclo de descomposición de la materia por su comportamiento carroñero (Bossi et al 2019; Farias and Kittlein 2008; Lucherini and Luengos Vidal 2008; Vieira and Port 2007; Garcia and Kittlein 2005). En este contexto, la remoción o disminución del zorro de campo en nuestro territorio nacional podría desencadenar alteraciones irreversibles en el funcionamiento de los ecosistemas naturales, siendo más que relevante el desarrollo de medidas que permitan la mitigación del conflicto de depredación y la conservación de la especie.

Conclusiones

La aproximación molecular de *metabarcoding* de ADN utilizada en este trabajo permitió detectar diversos taxones vertebrados presentes en la dieta. Los mamíferos fueron los taxones más representados y dentro de éstos los bovinos y ovinos, seguido de roedores, liebres, mulitas y tatúes. A partir de los resultados del Test estadístico de Fisher se infiere que la presencia de ADN bovino y ovino exhibió diferencias significativas entre las distintas épocas muestreadas. Las diferencias son significativas no sólo entre parición-verano y parición-invierno, sino también entre verano e invierno. Estas diferencias significativas en la presencia de ovinos entre verano e invierno (momento en donde no hay disponibilidad de corderos), sumado a la detección de bovinos, sugeriría que el consumo de dichos taxones podrían ser por carroña, hábito ampliamente descrito en estudios previos para la especie. Sin embargo, la estrategia experimental empleada aquí no permite discernir entre la forma de consumo de los taxones detectados en las fecas y por tanto otros abordajes son necesarios. La inclusión de cámaras trampa en los predios y análisis de signos de depredación sobre las majadas brindarían información en este sentido. Asimismo, la detección mediante *metabarcoding* de ADN de artrópodos coprófagos (descomponedores de animales muertos) en las fecas no solo implicaría un novedoso abordaje sin explorar al momento, sino también aportaría información sobre el tipo de consumo de los taxones. Los resultados obtenidos apoyan que el zorro de campo es una especie generalista y oportunista, y en su dieta se hallan una amplia variedad de vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces). Esto destaca el papel que tiene la especie en la regulación de los sistemas naturales en los que habita, siendo de gran relevancia tenerlo en cuenta al momento de recomendar medidas que mitiguen el conflicto carnívoro- humano.

Referencias Bibliográficas:

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). 'Basic local alignment search tool' *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Berta, A. (1982). '*Cerdocyon thous*'. *Mammal Species*. 1–4.
- Bhatia, S., Athreya, V., Grenyer, R., Macdonald, D.W. (2013). 'Understanding the role of representations of human–leopard conflict in Mumbai through media-content analysis', *Conservation Biology* 27: 588–594.
- Bossi, M.A.S., Migliorini, R.P., Santos, T.G., Kasper, C.B. (2019). 'Comparative trophic ecology of two sympatric canids in the Brazilian Pampa' *Journal of Zoology* 307(3):215-22.
- Cosse, M., Grattarola, F., Mannise, N. (2017). 'A novel real-time TaqMan PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II' *Mammal Research* 62:405-411.
<https://doi.org/10.1007/s13364-017-0328-y>.
- Cravino, J. L., M. E. Calvar, M. A. Berruti, N. A. Fontana, and J. C. Poetti (1997), 'American southern cone foxes: predators or prey? An Uruguayan study case', *Journal of Wildlife Research*, 2:2, 107–14
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., Taberlet, P. (2014), 'DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet' *Molecular Ecology Resources* 14: 306–323.
- Di Bitetti, M.S., Di Blanco, Y.E., Pereira, J.A., Paviolo, A., Perez, I.J. (2009). 'Time Partitioning Favors the Coexistence of Sympatric Crab-Eating Foxes (*Cerdocyon thous*) and Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*)' *Journal of Mammalogy* 90: 479–490. <https://doi.org/10.1644/08-mamm-a-113.1>.
- Farias, A.A., and Kittlein, M.J. (2008). 'Small-scale spatial variability in the diet of pampas foxes (*Pseudalopex gymnocercus*) and human-induced changes in prey base' *Ecology Research* 23: 543–550.

- Fisher, R.A. (1922). 'On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P' Journal of the Royal Statistical Society 85 (1): 87-94
<https://doi.org/10.2307/2340521>.
- Frade, J. (2015), 'Experiencias exitosas en el control de predadores', Lana: Noticias Sul, 169, 21–25
- Galan, M., Pages's, M., Cosson, J.-F. (2012). 'Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples' PlosOne 7(11): e48374. <https://doi.org/10.5061/dryad.1j6v6>.
- García, V.B., and Kittlein, M.J. (2005). 'Diet, habitat use, and relative abundance of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) in northern Patagonia, Argentina'. Mammalian Biology 70: 218–226.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2004.11.019>.
- González, S., Maldonado, J.E., Leonard, J.A., Vilà, C., Duarte, J.M.B., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., Wayne, R.K. (1998). 'Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)' Molecular Ecology 7:47–56.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00303.x>.
- González, E.M., and Martínez- Lanfranco, J.A. (2012). 'Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación.' Ediciones de la Banda Oriental, Montevideo, Uruguay.
- Grattarola, F., González, S., Cosse, M. (2014) 'A novel primer set for mammal species identification from feces samples' Conservation Genetics Resources 7(1):57-59
- Joshi, N.A., and Fass, J.N. (2011). 'Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)' [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Juan, H. (2019), 'Caracterización de la estructura genética poblacional del zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) en Uruguay', Departamento de Biodiversidad y Genética- IIBCE (Tesina de grado. Facultad de Ciencias- UdelaR. Orientador: Mannise, N.)
- Lucherini, M., Pessino, M., Farias, A.A. (2004). 'Pampas fox *Pseudalopex gymnocercus*'. Canids Foxes, Wolves, Jackals Dogs Status Survey Conservation Action Plan.

- Lucherini, M., and Luengos Vidal, E.M. (2008). 'Lycalopex gymnocercus (carnivora: canidae)' Mammal Species. 1–9.
- Metzker, M. L. (2009), 'Sequencing technologies- the next generation', Nature Reviews Genetics, 11:1, 31–46
- Monterroso, P., R. Godinho, T. Oliveira, P. Ferreras, M. J. Kelly, D. J. Morin, et al. (2019), 'Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis', Mammal Review, 49:2, 97–112, <https://doi.org/10.1111/mam.12144>.
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., Coissac, E. (2011). 'ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis' Nucleic Acids Research 39(21): e145.
- Ripple, W. J., J. A. Estes, R. L. Beschta, C. C. Wilmers, E. G. Ritchie, M. Hebblewhite, et al. (2014), 'Status and ecological effects of the world's largest carnivores', Science, 343:6167, 1241484.
- Srivathsan, A., Ang, A., Vogler, A.P., Meier, R. (2016). 'Fecal metagenomics for the simultaneous assessment of diet, parasites, and population genetics of an understudied primate' Frontiers in Zoology 13: 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0150-4>.
- Taberlet, Pierre, E. Coissac, M. Hajibabaei, and L. H. Rieseberg (2012a), 'Environmental DNA', Molecular Ecology, 21:8, 1789–93, <http://10.0.4.87/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet, Pierre, E. Coissac, F. Pompanon, C. Brochmann, and E. Willerslev (2012b), 'Towards next generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding', Molecular Ecology, 21:8, 2045–50
- Taberlet, P., and Luikart, G. (1999), 'Non-invasive genetic sampling and individual identification', Biological Journal of the Linnean Society, 68:1–2, 41–55, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01157.x>
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G. (1999). 'Noninvasive genetic sampling: look before you leap' Trends in Ecology and Evolution 14: 323–327.

bhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10407432.

Vieira, E.M., and Port, D. (2007). 'Niche overlap and resource partitioning between two sympatric fox species in southern Brazil' *Journal of Zoology* 272: 57–63.

Wei, F., Q. Wu, Y. Hu, G. Huang, Y. Nie, and L. Yan (2019), 'Conservation metagenomics: a new branch of conservation biology', *Science China Life Sciences*, 62:2, 168–78, <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9423-3>.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. (2014). 'PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR' *Bioinformatics* 30: 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.

Anexo 1: Información detallada de los taxones identificados a partir de las secuencias obtenidas en este estudio. Para cada establecimiento en Florida (F) y Salto (S) y época muestreada (parición ovina, verano e invierno) se muestran el número de secuencias reportadas para cada grupo taxonómico.

Clase	Orden	Familia	Genero	Especies	F parición	F verano	F invierno	S parición	S verano	S invierno
Anfibios	Anura	Leptodactylidae	<i>Pleurodema</i>	<i>Pleurodema bibroni</i>	461	873	50		3	344
					459	869	50		1	344
					331	397	36			343
					67	58				110
					3	4				2
					8	10	6			50
					23	23	30			14
							12			
							2			
							8			
		Bufonidae	<i>Rhinella</i>	<i>Pseudopaludicola</i>	2	4				
					63	246	10		1	
		Alsodidae	<i>Limnomedusa</i>	<i>Limnomedusa macroglossa</i>		1				
					22	13				
						2				
		Hylidae	<i>Pseudis</i>	<i>Scinax</i>		2				
					9		4			1
					1	167	2			1
						104				
						1				
						73				
		<i>Dendropsophus</i>	<i>Dendropsophus minutus</i>		1	1	1			
						1				

			<i>Argenteohyla</i>		1					
				<i>Argenteohyla siemersi</i>	1					
		Phyllomedusidae			3					
			<i>Phyllomedusa</i>		1					
	Gymnophiona				2	4		2		
Mamíferos					82306	86317	357540	146985	35868	142547
	Artiodactyla				67491	82699	352123	146496	31823	139482
		Bovidae			67162	82128	348090	145839	31736	138592
			<i>Bos</i>		23140	74962	277557	56305	25789	67994
				<i>Bos taurus</i>	21846	71052	262400	53597	24354	63993
			<i>Ovis</i>		44022	6109	49252	74168	4990	60367
				<i>Ovis aries</i>	40016	5539	44596	67154	4529	54615
		Cervidae			329	94	270	444	45	818
			<i>Mazama</i>		159	41	28	17	24	39
				<i>Mazama gouazoupira</i>	153	39	18	6	24	12
			<i>Axis</i>				4	10		150
				<i>Axis axis</i>			2	4		142
			<i>Dama</i>				4	10		16
				<i>Dama dama</i>			2	4		8
			<i>Ozotoceros</i>					4	16	8
				<i>Ozotoceros bezoarticus</i>				4	16	8
		Suidae				451	3595			
			<i>Sus</i>			451	3595			
				<i>Sus scrofa</i>		451	3595			
	Carnivora				42	240	564	7	32	114
		Mephitidae			10	64	184	4		6
		Mustelidae			30	158	356	3	102	91
			<i>Lontra</i>				1		2	2
				<i>Lontra longicaudis</i>					1	1

Chiroptera	Procyonidae	<i>Pteronura</i>			4		2	
		<i>Pteronura brasiliensis</i>			4		2	
			2	18	24		19	15
		<i>Nasua</i>	2	4	10		4	
		<i>Nasua nasua</i>	2	4	10		4	
		<i>Procyon</i>		14	14		15	15
			92	205	644	39	118	99
	Molossidae		1	7	2	1		
		<i>Otomops</i>		1				
		<i>Otomops martiensseni</i>		1				
		<i>Eumops</i>		2	2			
		<i>Eumops auripendulus</i>		1				
		<i>Eumops perotis</i>		1				
		<i>Nyctinomops</i>		2				
		<i>Nyctinomops macrotis</i>		2				
		<i>Promops</i>		1				
		<i>Promops centralis</i>		1				
	Phyllostomidae	<i>Sauromys</i>		1				
		<i>Sauromys petrophilus</i>		1				
			3	14	4	15	1	
		<i>Desmodus</i>	3					
		<i>Desmodus rotundus</i>	3					
		<i>Lionycteris</i>		2				
		<i>Lionycteris spurrelli</i>		2				
		<i>Phylloderma</i>		1				
		<i>Phylloderma stenops</i>		1				
		<i>Anoura</i>		3				
		<i>Anoura caudifer</i>		3				
		<i>Choeroniscus</i>		1				
		<i>Choeroniscus minor</i>		1				

Cingulata	Vespertilionidae	Choeronycteris	1					
		Choeronycteris mexicana	1					
		Hsunnycteris	1					
		Hsunnycteris thomasi	1					
		Hylonycteris	1					
		Hylonycteris underwoodi	1					
		Leptonycteris	1					
		Leptonycteris nivalis	1					
		Micronycteris	1					
		Micronycteris hirsuta	1					
		Musonycteris	1					
		Musonycteris harrisoni	1					
		Uroderma	1					
		Uroderma bilobatum	1					
			1	7	150	4	2	4
		Myotis	1	5	73	1	2	1
		Myotis elegans		5				
		Myotis nigricans		2				
		Submyotodon		2				
		Submyotodon latirostris		2				
		Eptesicus			13			
		Eptesicus diminutus			4			
		Eptesicus furinalis			4			
		Histiotus			4			
		Antrozous			2			
		Cistugo			1			
			2091	349	47	35	76	
	Dasypodidae		2091	13	4	8	38	
		Cabassous	127					
	Cabassous tatouay	18						

Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Euphractus</i>	81				30		
		<i>Euphractus sexcinctus</i>	81				30		
		<i>Dasypus</i>	1811	13	4	8	8		
		<i>Dasypus hybridus</i>	798	2	2	2	2		
		<i>Dasypus novemcinctus</i>	168	5		2	2		
			92	337	341	3			
			92	337	341	3			
		<i>Didelphis</i>	87	315	321	3			
		<i>Monodelphis</i>		3					
		Lagomorpha		36	156	309	73	2709	95
	Leporidae			15	141	289	65	2679	85
		<i>Lepus</i>		140	284	65	2634	79	
	Perissodactyla	Equidae	<i>Lepus europaeus</i>		12	58		986	4
				14532	183	468	14	25	31
				14521	8	58		17	
			<i>Equus</i>	14521	8	58		17	
			<i>Equus asinus</i>	11					
			<i>Equus caballus</i>	13548					
					2				
	Pilosa								
	Rodentia	Cricetidae		21	743	2744	41	1123	2650
				67	479	17	755	275	
<i>Akodon</i>				34	2	10	2	8	
Muridae			3	38	1303	10	273	1898	
		<i>Mus</i>		6	376			29	
<i>Mus musculus</i>				302			23		
		<i>Rattus</i>			150		204	103	
		<i>Rattus norvegicus</i>			68				
		<i>Rattus rattus</i>			11		27	5	
Caviidae			47	30		4	9		
		<i>Cavia</i>	47	8		4	3		

			<i>Cavia aperea</i>	47	8		3
		Hydrochoerus			22		3
			<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>		22		3
	Ctenomyidae			476	413	1	5
		Ctenomys		476	413	1	5
	Myocastoridae				1		
		Myocastor			1		
			<i>Myocastor coypus</i>		1		
Aves				30	4261	1808	22
	Accipitriformes				112	105	
		Accipitridae			96	105	
			<i>Buteo</i>		30	50	
			<i>Buteo brachyurus</i>		2		
			<i>Buteo magnirostris</i>		2	2	
			<i>Buteo swainsoni</i>			2	
			<i>Buteo albicaudatus</i>			2	
			<i>Buteo polyosoma</i>			2	
			<i>Rostrhamus</i>			1	
			<i>Rostrhamus sociabilis</i>			1	
			<i>Buteogallus</i>			20	
			<i>Buteogallus meridionalis</i>			4	
			<i>Buteogallus urubitinga</i>			4	
			<i>Accipiter</i>			4	
			<i>Busarellus</i>			2	
			<i>Geranoaetus</i>			2	
	Pandionidae			16			24
		<i>Pandion</i>		16			24
			<i>Pandion haliaetus</i>	16			24

Anseriformes	Anatidae	Oxyura	Oxyura vittata	113	37	539	86
				110	37	539	86
Anseriformes	Anatidae	Anas	Netta	11		33	5
				3		7	1
		Chloephaga	Cygnus	33		198	33
				2		12	1
		Amazonetta	Amazonetta brasiliensis	1	16	6	1
				1		6	1
		Cairina	Cairina moschata	3		18	3
				3		18	3
		Callonetta	Callonetta leucophrys	1		6	1
				1		6	1
		Nomonyx	Nomonyx dominica	3		7	1
				3		7	1
		Sarkidiornis	Sarkidiornis melanotos	1		6	1
				1		6	1
Apodiformes	Trochilidae	Florisuga	Lophornis	4	13	6	
				4	6		
		Apodidae		4			
					2		
Charadriiformes	Laridae	Larus	Larus atricilla	5	1163	37	1521
				3		4	628
		Chroicocephalus	Larus	1			
				1			
		Haematopodidae				2	
						2	
				2	6	716	284

		<i>Haematopus</i>	2	6		716	284
		<i>Haematopus ater</i>		2		34	6
	Jacanidae		167	5			5
		<i>Jacana</i>	167	5			5
		<i>Jacana jacana</i>	66	2			2
			101				
	Stercorariidae		2				
		<i>Stercorarius</i>	2				
	Charadriidae			7		168	32
		<i>Vanellus</i>		5		165	32
		<i>Charadrius</i>		2		3	
	Scolopacidae			10		616	307
		<i>Arenaria</i>		2			
		<i>Arenaria interpres</i>		2			
		<i>Phalaropus</i>				6	1
		<i>Phalaropus tricolor</i>				6	1
		<i>Tringa</i>				123	11
		<i>Tringa melanoleuca</i>				35	3
		<i>Actitis</i>				7	1
		<i>Actitis macularia</i>				7	1
		<i>Gallinago</i>				36	5
	Rynchopidae			1			
		<i>Rynchops</i>		1			
		<i>Rynchops niger</i>		1			
				2			
	Cathartiformes			2			
		<i>Cathartes</i>		2			
		<i>Cathartes aura</i>		2			
	Columbiforme		291	57	2	510	161
	Columbidae		291	57	2	510	161

		<i>Columba</i>		28	13		62	20
			<i>Columba livia</i>	25	9		53	20
		<i>Zenaida</i>		46	20	2	106	40
			<i>Zenaida auriculata</i>		20	2		
		<i>Leptotila</i>			2			
			<i>Leptotila verreauxi</i>		2			
		<i>Patagioenas</i>			2			
	Coraciiformes						2	
Cuculiformes				15			42	164
	Cuculidae			15			42	3
Falconiformes				8	4			
	Falconidae			8	4			
		<i>Falco</i>			4			
		<i>Phalcoboenus</i>		8				
Galliformes				46	1008		153	16
Gaviiformes				15				
Gruiiformes				41	29		14	2
	Rallidae			14	5		12	2
		<i>Porphyrio</i>			4			
	Aramidae			2			2	
		<i>Aramus</i>		2			2	
			<i>Aramus guarauna</i>	2			2	
Passeriformes				10	1663	475	20	113
	Troglodytidae			8		2		
		<i>Henicorhina</i>				2		
			<i>Henicorhina leucosticta</i>			2		
	Tyrannidae			2	3		1	
		<i>Cnemotriccus</i>		2				
			<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	2				
		<i>Tyrannus</i>					1	

Pelecaniformes	Emberizidae		2	45			
	Fringillidae		350	301	20	33	
	Motacillidae			2			
	Thraupidae		74	34			
		<i>Poospiza</i>	72	6			
		<i>Poospiza cabanisi</i>	24				
	Corvidae		16	6			
	Hirundinidae		12	4			
		<i>Hirundo</i>		2			
		<i>Hirundo rustica</i>		1			
		<i>Tachycineta</i>	12				
	Icteridae		286	29		4	
		<i>Amblyramphus</i>	2	2		2	
		<i>Amblyramphus holosericeus</i>	2	2		2	
		<i>Agelaius</i>	36	3			
		<i>Chrysomus</i>	120	10			
		<i>Chrysomus ruficapillus</i>	24	2			
		<i>Gnorimopsar</i>	2				
		<i>Gnorimopsar chopi</i>	2				
		<i>Molothrus</i>	48	4			
		<i>Molothrus badius</i>	24				
	Turdidae		26	3		34	
		<i>Turdus</i>	26	1		32	
		<i>Turdus rufiventris</i>				4	
	Sturnidae		2	2		2	
Ardeidae			20	15		140	4
			20	13		139	4
		<i>Ardea</i>		8			
		<i>Bubulcus</i>		1		97	

		<i>Bubulcus ibis</i>		1	97	
		<i>Butorides</i>		2		
		<i>Butorides striata</i>		2		
	Threskiornithidae			2		
Perciformes			3			
	Sciaenidae		3			
Piciformes				314		
	Picidae			313		
		<i>Picumnus</i>		15		
Podicipediiformes				59	130	25
	Podicipedidae			59	130	25
		<i>Podilymbus</i>		59	122	23
		<i>Podilymbus podiceps</i>		59	122	23
		<i>Podiceps</i>			6	2
Procellariiformes				11	6	12
	Procellariidae			5		
		<i>Procellaria</i>		2		
		<i>Procellaria cinerea</i>		2		
	Diomedidae				6	12
Psittaciformes			4	205	12	481
	Psittacidae		4	110	10	238
		<i>Brotogeris</i>		6		12
		<i>Myiopsitta</i>		10		30
		<i>Myiopsitta monachus</i>				30
Strigiformes				39		
	Tytonidae			39		
		<i>Tyto</i>		19		
Struthioniformes				118	3	853
	Rheidae			25	3	596
		<i>Rhea</i>		15	3	564

		<i>Rhea americana</i>	15	3	564	6
					72	
	Suliformes	Struthionidae	4	4	28	2
		Fregatidae	4		28	2
		<i>Fregata</i>	4		28	2
		<i>Fregata magnificens</i>	2		14	1
		Phalacrocoracidae		3		
		Anhingidae		1		
		<i>Anhinga</i>		1		
	Tinamiformes		26		70	6
		Tinamidae	26		70	6
	Trogoniformes		13			
		Trogonidae	13			
		<i>Trogon</i>	13			
Reptiles			161	207	1	1
	Squamata		161	207	1	1
		Teiidae	1			
		Gymnophthalmidae	159	13	1	1
		Anguidae		59		
		Gekkonidae		95		
Peces			13	94	3	1
	Cyprinodontiformes		11			43
		Poeciliidae	11			
	Zeiformes		2			
	Atheriniformes			13		
	Characiformes			1		43
		Lebiasinidae				8
	Gadiformes			58		

	Gadidae		58		
Gymnotiformes			3	1	
	Rhamphichthyidae		2		
	Gymnotidae		1		
		Gymnotus	1	1	
	Hypopomidae			1	
		Brachyhypopomus			
Scorpaeniformes			2	2	
	Cottidae			2	
		Clinocottus		2	
		Clinocottus analis		2	
Siluriformes			1		1
Perciformes			4		
	Percoidei		2		
Pleuronectiformes			12		
	Paralichthyidae		12		

8. CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se desarrollaron herramientas moleculares para utilizar a partir de muestras depositadas en el ambiente, como son las fecas y animales encontrados muertos por atropellamiento. Por un lado, se llevó a cabo una aproximación que mediante la amplificación en tiempo real y sondas TaqManTM para examinar la presencia de parásitos protozoarios Coccidea Apicomplexa. El tamaño del fragmento y la combinación de las sondas TaqManTM demostró ser efectivo para utilizar en muestras ambientales en donde el ADN está presente en baja cantidad y calidad. Por otro lado, se puso a punto una aproximación de *metabarcoding* de ADN para analizar los taxones vertebrados que componen la dieta de los zorros de campo y de monte. Si bien se emplearon cebadores para vertebrados previamente descritos, se diseñó un oligonucleótido que inhibe la amplificación por PCR del ADN de los zorros depositarios de las fecas. A su vez, se desarrollaron estrategias bioinformáticas y Bash Scripts que posibilitaron un análisis adecuado de las lecturas recuperadas por secuenciación masiva. El uso de *metabarcoding* de ADN permitió determinar los taxones presentes en la dieta hasta nivel de especie, de manera objetiva y precisa. Adicionalmente, fue posible examinar la variabilidad genética de los taxones presentes en la dieta mediante construcciones de redes de haplotipos. Esto posibilita analizar aspectos genético-poblacionales de los taxones de manera indirecta, un insumo importante para estudios de biodiversidad.

A partir del análisis de la transmisión de parásitos que afectan al ganado, se detectó por primera vez la presencia de ADN de *Neospora caninum* en una feca de zorro de campo. La estrategia desarrollada en el presente trabajo fue exitosa ya que posibilitó la detección de *N. caninum*, *T. gondii* y *Hammondia spp.* en tejidos de animales atropellados de zorro de campo y zorro de monte. En un país ganadero como Uruguay,

resulta necesario discriminar la presencia de estos parásitos en cánidos nativos ya que *N. caninum* es el único que causa enfermedades que afectan al ganado y a su vez los hospederos definitivos son cánidos. Nuestros resultados señalan que ambas especies de zorros han estado expuestas a *N. caninum*, *T. gondii* y *H. triffittae*. No obstante, el bajo porcentaje de muestras en las que se detectaron (2,5%) indica un reducido riesgo de transmisión hacia el ganado.

El estudio de los vertebrados presentes en la dieta de los zorros de campo y de monte mediante *metabarcoding* de ADN reveló que los mamíferos son los taxones hallados en mayor porcentaje en los distintos sitios y épocas muestreadas. Sin embargo, se encontraron diferencias interespecíficas e intraespecíficas (geográficas- locales y estacionales). El estudio de dieta de zorros de monte y de campo en la Reserva Natural Parque Salus, reveló que dentro de los mamíferos el Orden Rodentia es el más consumido en dicha área. Sin embargo, se encontraron variaciones interespecíficas. En zorro de monte se detectaron diversos Órdenes de anfibios y aves, y en zorro de campo se identificaron diversas especies de armadillos (tatú, mulita y peludo). Por otro lado, en los dos establecimientos de cría ovina, los mamíferos más frecuentes en las fecas de zorros de campo fueron los del Orden Artiodactyla, en particular ADN vacuno y ovino. Estos resultados se encontraron tanto en el momento de la parición ovina como fuera de ésta, con diferencias estadísticamente significativas entre todas las épocas muestreadas (parición- verano, parición- invierno, verano- invierno). Si bien con la metodología empleada aquí no es posible realizar inferencias sobre el tipo de consumo, la presencia de ADN ovino a lo largo del año podría señalar que el consumo puede estar dado por la ingesta de desechos, animales muertos o placenta y no exclusivamente por eventos de caza durante la parición. A su vez, fueron reportados ADN de diversos mamíferos (roedores, ciervos, murciélagos, carnívoros y jabalí) y otros vertebrados (aves, anfibios, reptiles y en menor porcentaje peces) en los zorros de campo de los establecimientos de cría ovina. Diferencias geográficas de tipo local se detectaron entre las muestras del establecimiento de Florida y el de Salto, registrándose tatúes y mulitas exclusivamente en el de Florida. Entre las épocas muestreadas también se reportaron diferencias en cada uno de los sitios del SUL. Por ejemplo, en Florida, las aves fueron el segundo grupo taxonómico más frecuente durante verano e invierno; mientras que los anfibios lo fueron

en la parición ovina. El registro de numerosos taxones de vertebrados presentes en la dieta de los zorros de campo y de monte, son consistentes con los hábitos alimenticios generalistas, adaptables y oportunistas que poseen, siendo capaces de explotar una amplia variedad de vertebrados.

El análisis de la dieta y de parásitos protozoarios que causan enfermedades en ganado realizado en la presente tesis, aporta información necesaria para comprender el rol de estas especies en el ecosistema, así como también acerca del conflicto que poseen con las actividades ganaderas. El bajo porcentaje de detección de ADN de protozoarios parásitos Coccidea Apicomplexa nos indicaría que no implica un riesgo para la transmisión de estos al ganado. Los resultados obtenidos son auspiciosos para que las especies de zorros sean consideradas especies centinelas de la salud ecológica. En lo que refiere al estudio de la dieta de los zorros, estos explotan una vasta diversidad de taxones vertebrados, destacando el importante rol ecológico que poseen estas especies en la regulación de las poblaciones de animales que consumen. Adicionalmente, en base a la presencia de ADN ovino a lo largo del año, se propone que el consumo de ganado estaría dado por la ingesta de carroña y restos de animales. Esto debería ser confirmado mediante otros enfoques que permitan examinar en profundidad el tipo de consumo (carroña o eventos de caza). De confirmarse el consumo de carroña por parte de los zorros, les otorgaría un rol destacado en la descomposición de la materia. En este contexto, se destaca el papel que tienen los zorros de campo y de monte en la funcionalidad de los sistemas naturales y es fundamental su consideración al momento de desarrollar medidas que mitiguen los conflictos con actividades agropecuarias.

9. PERSPECTIVAS

Resulta necesario continuar profundizando en los análisis de otras especies de parásitos circulantes en fauna silvestre, en particular en aquellos que causan enfermedades en ganado y en humanos. Para ello es fundamental desarrollar herramientas de vigilancia epidemiológica que permitan un diagnóstico preciso de diversos taxones parásitos presentes en una misma muestra. Las aproximaciones por *metabarcoding* de ADN utilizando cebadores universales para los parásitos de interés y que amplifiquen un fragmento que permita una asignación taxonómica eficiente, podría ser utilizado a partir de fecas de zorros. Esto posibilitará la detección de múltiples parásitos protozoarios ó helmintos en paralelo, aportando información sobre el rol de los zorros como especies centinelas de la salud ecológica. El desarrollo de estudios de vigilancia epidemiológica en fauna silvestre es de utilidad para prevenir y mitigar enfermedades emergentes en ganado y humanos. Las herramientas moleculares confieren un valioso aporte para este tipo de monitoreos.

Los zorros de campo y de monte son especies omnívoras que también consumen frutos e invertebrados. Para realizar un análisis de nicho trófico, es necesario realizar estudios que incluyan los taxones vegetales e invertebrados que componen su dieta. Un abordaje por *metabarcoding* de ADN permitirá examinar la presencia de dichos componentes, siendo necesario un análisis previo sobre los marcadores moleculares y las secuencias disponibles para su identificación taxonómica. Para conocer los vegetales que consumen los zorros, hemos iniciado un estudio que permitirá generar secuencias de especies nativas vegetales analizando distintos marcadores moleculares. Esta

información posibilitará una mejor resolución en la asignación de dichos taxones mediante *metabarcoding* de ADN. A su vez, las secuencias generadas aportarán a la construcción de una base de secuencias de referencia de especies vegetales nativas para Uruguay como parte de una iniciativa nacional que incluye diversos investigadores e Instituciones. Otro aspecto trófico que es importante comprender, son las formas de consumo de los vertebrados identificados a partir de ADN fecal. Diferenciar consumo por eventos de caza o carroña resulta urgente para evaluar el conflicto por depredación, siendo necesario la combinación de diferentes aproximaciones. Por un lado, estudiar los artrópodos coprófagos presentes en ADN fecal de zorros por *metabarcoding* de ADN posibilitará comprobar el consumo por carroña. Por otro lado, la colocación de cámaras trampa en potreros con corderos y evaluación de signos de depredación sobre corderos muertos conferirá información sobre los ataques en las majadas. De esta manera, se examinaría no sólo el consumo por eventos de caza o carroña por parte de los zorros sino también permitirá evaluar otros potenciales depredadores de ganado.

Conocer en profundidad los parásitos presentes en las fecas de los zorros, así como los hábitos tróficos de dichas especies permitirá una mejor comprensión tanto del conflicto con actividades humanas como de sus roles ecológicos.