

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

ANÁLISIS PRELIMINAR
DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL LOBO FINO,
Arctocephalus australis, EN EL URUGUAY.

TESINA DE GRADO

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROFUNDIZACIÓN EN GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

AUTOR: FACUNDO GIORELLO

TUTOR: DR. ENRIQUE LESSA

MONTEVIDEO, URUGUAY
2010

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Enrique Lessa por haberme aceptado en su laboratorio y permitirme culminar así la licenciatura.

Agradezco también a toda la gente del laboratorio de Evolución por su buena onda y por la mano que me dieron cuando los necesitaba.

Muchas gracias a Federico Riet y a Valentina Franco por brindarme las muestras a partir de las cuales pude realizar este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer muy especialmente al M.Sc. Matías Feijoo por todo lo que me ayudó, tanto en el laboratorio como explicándome muy pacientemente los programas, y por su invaluable apoyo psicológico (gratis) cuando las cosas no salían.

Índice

Resumen	1
Introducción.....	2
El estudio de la estructura genética poblacional.....	2
Clasificación y características fundamentales de la especie de estudio en relación a su estructura poblacional	6
Reseña de la explotación comercial de <i>A. australis</i> en el Uruguay y sus posibles consecuencias.....	8
Antecedentes respecto a la estructura poblacional en pinnípedos.....	9
Justificación	10
Objetivos	12
Materiales y Métodos.....	13
Colecta de muestras, extracción de ADN y genotipado.....	13
Análisis de Datos.....	13
Resultados	17
Equilibrio Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento y F_{IS}	17
Análisis de la estructura poblacional.....	19
Examen de un evento de cuello de botella	20
Discusión	22
Trabajo de laboratorio y genotipado.....	22
Análisis de la estructura poblacional.....	23
Diversidad genética y análisis de cuello de botella.....	25
Implicancias.....	27
Conclusiones	27
Perspectivas y recomendaciones.....	28
Apéndices	30
Apéndice 1.....	30
Apéndice 2.....	31
Apéndice 3.....	31
Bibliografía.....	33

Resumen

El lobo fino sudamericano, *Arctocephalus australis*, uno de los otáridos de América de Sur más ampliamente distribuido, vio su tamaño poblacional notoriamente reducido a causa de la explotación comercial. Más de 270.000 individuos fueron sacrificados entre 1950 y 1991, hecho por el cual la población puede estar sufriendo las consecuencias de un evento de cuello de botella, capaz de comprometer el potencial evolutivo de la especie. A pesar de esto, son escasos los estudios que hayan evaluado la situación poblacional de *A. australis* a nivel genético.

Este trabajo analiza la estructura poblacional y busca evidencia de un posible evento de cuello de botella para las principales colonias uruguayas, las cuales asientan más del 80% de la población de la costa Atlántica.

Para esto se analizaron mediante 4 *loci* de microsatélites, desarrollado para otras especies, 10 y 14 individuos de Isla de Lobos e islas de Cabo Polonio respectivamente. Los estimadores Φ_{ST} y R_{ST} conjuntamente con el análisis bayesiano, indicaron que *A. australis* sería una única población panmíctica. A su vez, se encontraron indicios de una variabilidad genética moderada a alta y no se encontró evidencia a nivel genético de un evento de cuello de botella. Estos resultados son importantes para planes de manejo o conservación teniendo en cuenta la conocida presión que ejerció la actividad comercial. Análisis basados en más *loci* son necesarios para confirmar los resultados aquí constatados.

Introducción

El estudio de la estructura genética poblacional

La estructura genética poblacional es la distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones e individuos de una especie (Templeton 2006). La misma se rige por tres componentes principales: el sistema de apareamiento, la deriva génica y el flujo génico. El balance entre estos dos últimos componentes, es el determinante primario de la estructura geográfica. El flujo génico reduce la diferenciación genética entre poblaciones y puede incrementar la variabilidad genética dentro de las subpoblaciones, mientras que el efecto de la deriva génica es justamente el contrario. El sistema de apareamiento determina los patrones de variabilidad genotípica entre individuos dentro de una subpoblación. Virtualmente, todas las predicciones evolutivas, particularmente aquellas relacionadas con la adaptación, deben ser siempre consideradas en el contexto de la estructura poblacional ya que todas las fuerzas evolutivas operan con las restricciones que ésta impone (Templeton 2006).

Para el estudio de la estructura genética se han desarrollado numerosos estadísticos que, al diferir en los términos en que se definen, en los marcadores a los que están destinados y en el modelo mutacional que suponen, se debe tener especial cuidado al momento de su interpretación. Además, pueden arrojar resultados sustancialmente distintos bajo condiciones biológicas realistas (Templeton 2006) y por lo tanto, es necesario tenerlos presentes y reconocer cuales son los apropiados para el estudio a abordar. Fue Wright en 1921 quién desarrolló el primer índice de fijación para dar cuenta el efecto de la endogamia (del inglés: *inbreeding*) dentro de muestras. En 1931, Wright derivó la siguiente ecuación: $F_{ST} = 1 / (4N_{ef}m + 1)$, donde N_{ef} es el tamaño poblacional efectivo, definido evaluando la "fuerza" de la deriva génica mediante el incremento promedio de la identidad por descendencia, y m la tasa de flujo génico. Esta ecuación se presenta, porque a partir de ella se deducen dos cosas notorias en relación al balance entre flujo y deriva génica. La primera, es que basta con muy pocos migrantes efectivos ($N_{ef}m$) para que el flujo génico domine sobre la deriva. Y la segunda, es que el grado de divergencia genética está determinado por el número efectivo de migrantes y no

solamente por la tasa de flujo génico. Por lo tanto, la divergencia genética se evita con el mismo número de migrantes efectivos independientemente del tamaño poblacional. Posteriormente en 1951, Wright extendió el concepto de índice de fijación a una población subdividida en un conjunto de subpoblaciones, definiendo los estadísticos F , F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} . En 1977 Nei redefinió estos índices para múltiples alelos en términos de heterocigosis observada y esperada, volviendo los índices más aplicables. Algunas de las definiciones alternativas de F_{ST} se definen en términos de la varianza de las frecuencias alélicas (Wright 1943, 1951, 1965; Hartl & Clark 1997), de los tiempos de coalescencia (Slatkin, 1991), de la probabilidad de identidad por estado (Cockerham & Weir, 1987), de la distancia genética (Excoffier *et al.* 1992). Actualmente las estimaciones de F_{ST} no sólo se usan de la manera “habitual”, analizando la estructura poblacional entre subpoblaciones, sino que también se utilizan para identificar regiones del genoma que han sido blanco de la selección (Akey *et al.* 2002; Weir *et al.* 2005; Guo *et al.* 2009). Las comparaciones de F_{ST} a partir de diferentes regiones del genoma ayudan a proveer valiosa información sobre la historia demográfica de las poblaciones (Keinan *et al.* 2008).

La importancia de la estructura poblacional se manifiesta en su amplio *campo de aplicaciones*. Además de su rol en la genética de poblaciones y evolutiva, los estadísticos F_{ST} y sus análogos, son importantes en el mapeo de asociación de enfermedades humanas, en la ciencia forense y en la biología de la conservación. En relación a esta última, el análisis de la estructura poblacional es importante para identificar poblaciones dentro de una misma especie que requieran ser consideradas para su conservación, manejo o explotación, como distintas unidades de manejo o como unidades evolutivamente significativas en función de si el aislamiento demográfico entre las subpoblaciones es reciente o histórico (Moritz 1994, Moritz 1995). A modo de ejemplo, la intensidad de explotación, es decir, el número de animales explotados, depende entre otras cosas del tamaño poblacional, por lo tanto, definir unidades de manejo es fundamental para evitar, por ejemplo, sobreexplotación en el caso de que la población se encuentre estructurada.

El estudio de la estructura poblacional requiere de *marcadores moleculares* para detectar polimorfismos en el ADN y así constatar la variación entre y dentro de las poblaciones. Los marcadores predilectos han sido el ADN mitocondrial (ADNm) y

los microsatélites (Zhang & Hweitt 2003; Schlotterer 2004), aunque el uso de SNPs (del inglés: *single-nucleotide polymorphisms*) ha ido en aumento (Morin 2004). El ADNm entre las ventajas que presenta se encuentran: su gran variabilidad, mayores que las típicas del genoma nuclear, la ausencia de recombinación y su gran número de copias por célula que facilita su obtención para su posterior análisis (Avisé 2000). Su herencia por vía exclusivamente materna permite dilucidar solamente la estructura matrilineal y por lo tanto la inferencia sobre la estructura poblacional de la especie se encuentra sesgada (De-Xing Zhang 2003). La herencia uniparental y la haploidía también implica que el tamaño poblacional efectivo sea un cuarto que para *loci* nucleares, lo que agudiza los efectos de la deriva génica (De-Xing Zhang 2003).

Los microsatélites son secuencias nucleares que se caracterizan por contener una secuencia repetida, generalmente no mayor a los 5 pares de bases, un cierto número de veces. Son marcadores predominantemente neutros que debido a su alta tasa de mutabilidad presentan gran variabilidad alélica, por lo cual permiten adquirir un grado mayor de resolución de la estructura genética de poblaciones (Schlotterer 2004; Jarne & Lagoda 1996). Las principales desventajas que presentan son, que para algunos *loci* de microsatélites su neutralidad es muy cuestionada, su alta variabilidad recae en homoplasia y su tasa de mutación varía considerablemente entre organismos (De-Xing Zhang 2003). Otra consecuencia importante de su extrema tasa de mutación es que el patrón de mutación subyacente no puede ser ignorado. De hecho, el modelo mutacional asumido tiene implicancias directas en los resultados. Tres son los principales modelos mutacionales para microsatélites: el modelo de alelos infinitos (IAM, del inglés: *infinite alleles model*) (Kimura & Crow 1964), el modelo de mutación de a pasos (SMM, del inglés: *stepwise mutation model*) (Kimura & Otha 1978) y el modelo de mutación de dos fases (TPM, del inglés: *two-phase model*) (Valdès *et al.* 1993; Di Rienzo *et al.* 1994). En el IAM, cada mutación crea un nuevo alelo a una tasa dada, μ . Consecuentemente, este modelo no permite homoplasia. En el otro extremo dentro del rango de los modelos mutacionales posibles, se encuentra el SMM. Bajo este modelo, un alelo tiene una probabilidad $\mu/2$ de mutar en ambas direcciones, con la particularidad de que cada mutación permite el agregado o la delección de una sola unidad repetitiva del alelo de microsatélite, permitiendo así, alelos

idénticos por estado. Asumiendo este escenario, Slatkin (1995) desarrolló el estadístico R_{ST} especialmente para microsatélites, el cual se basa en la diferencia de tamaño entre los alelos. Es claro que alelos de tamaños muy diferentes, estarán menos relacionados entre sí que alelos que presenten un tamaño alélico similar. El TPM es un modelo más flexible que el SMM ya que permite al momento de la mutación la adición o reducción de varias (k) unidades repetitivas con una probabilidad $(1 - p)$, k siguiendo una distribución de probabilidad dada (p sería la probabilidad de que una mutación cause el agregado o disminución de una sola unidad repetitiva) (Di Rienzo *et al.* 1994).

Los SNPs son variantes, usualmente bialélicas, de un solo nucleótido en una determinada secuencia de ADN, que se encuentran dispersas en todo el genoma (Morin 2004). Las principales ventajas de este marcador son, su potencial de ser analizado de manera automatizada, su abundancia, su baja tasa de mutación y la posibilidad de comparar análisis entre laboratorios sin la necesidad de calibrar, como es necesario para los microsatélites (Morin 2004; Schlotterer 2004). El sesgo producto del muestreo no aleatorio (del inglés: *ascertainment bias*) es una de las principales cuestiones que enfrentan los SNPs. Además, el alto costo que requiere desarrollar un conjunto de estos marcadores es otra desventaja que dificultan su implementación (Morin 2004; Schlotterer 2004). En relación al ADNm y a los microsatélites, los SNPs pueden generar a menudo la misma potencia estadística, mientras que proporcionan una cobertura más amplia del genoma y datos de una mejor calidad (Morin 2004).

Un punto no menor son los *supuestos* y las *condiciones iniciales* asumidas para el análisis de la estructura poblacional. Las dos condiciones necesarias más sobresalientes son: que la población debe estar en equilibrio Hardy-Weinberg y que no debe haber desequilibrio de ligamiento entre cada uno de los *loci* a analizar.

Clasificación y características fundamentales de la especie de estudio en relación a su estructura poblacional

Arctocephalus australis o lobo fino sudamericano (Zimmermann 1783) es un pinnípedo perteneciente a la familia Otariidae, (Tabla 1) la cual agrupa lobos marinos y leones marinos. Su clasificación tradicional en la subfamilia Arctocephalinae se presume incorrecta por los resultados arrojados por varios análisis moleculares recientes (e.g. (Dasmahapatra *et al.* 2009; Yonezawa *et al.* 2009; Higdon *et al.* 2007)) ya que dicha subfamilia, junto con Otariinae, no resultan ser grupos monofiléticos. Las 2 familias restantes de los pinnípedos son: Phocidae y Odobenidae (Berta & Adam 2001).

A. Australis es uno de los otáridos de América del Sur que se encuentra más ampliamente distribuido, presente tanto en las costas del océano Atlántico como del Pacífico. En el océano Atlántico, se encuentra desde las costas del sur de Brasil (Carvalho 1975), con colonias reproductivas en Uruguay y Argentina, hasta las Islas Falklands (Vaz Ferreira 1982; Crespo *et al.* 1999). Su distribución en el océano Pacífico es discontinua, ya que se encuentra en las costas de Perú hasta Mejillones, en el Norte de Chile y luego de una brecha de 2000 km donde se ausenta, reaparece en la Isla de Chiloé hasta Cabo de Hornos (Vaz Ferreira 1982; Guerra & Torres 1987).

Es en las costas uruguayas donde se asientan las principales colonias reproductivas y el grueso de la población de *A. australis*. Las mismas, albergan más del 80% de la población de la costa Atlántica, con una población estimada de 250 a 300 mil individuos (Vaz Ferreira 1982; Páez 2000), con colonias reproductivas en islas de Cabo Polonio e Isla de Lobos (Vaz Ferreira 1982; Páez 2006).

A. australis, como la gran mayoría de los pinnípedos, es de gran importancia ecológica dado que puede afectar la dinámica de muchas especies, al ser, generalmente, uno de los depredadores tope en la mayoría de los ecosistemas marinos (Naya *et al.* 2002; McConnell *et al.* 1999; Ochoa Acuña & Francis 1995).

Tabla 1. Taxonomía de las 34 especies de pinnípedos (incluyendo la extinta, *Monachus tropicalis*). Se resalta la especie analizada en este trabajo.

Pinípedos	Odobenidae		<i>Odobenus rosmarus</i>
	Otariidae	Callorhinae	<i>Callorhinus ursinus</i>
		Arctocephalinae/Otariinae	<i>Arctocephalus townsendi</i> <i>Arctocephalus philippii</i> <i>Arctocephalus galapagoensis</i> <i>Arctocephalus australis</i> <i>Arctocephalus tropicalis</i> <i>Arctocephalus gazella</i> <i>Arctocephalus forsteri</i> <i>Arctocephalus pusillus</i> <i>Zalophus californianus</i> <i>Phocarctos hookeri</i> <i>Neophoca cinerea</i> <i>Otaria flavescens</i> <i>Eumetopias jubatus</i>
	Phocidae	Monachinae	
		Monachini	<i>Monachus Schauinslandi</i> <i>Monachus tropicalis</i> † <i>Monachus monachus</i>
		Miroungini	<i>Mirounga angustirostris</i> <i>Mirounga leonina</i>
		Lobodontini	<i>Lobodon carcinophagus</i> <i>Leptonychotes weddellii</i> <i>Hydrurga leptonyx</i> <i>Ommatophoca rossii</i>
		Phocinae	
		Erignathini	<i>Erignathus barbatus</i>
		Cystophorini	<i>Cystophora cristata</i>
		Phocini	
		Histriophocina	<i>Histriophoca fasciata</i> <i>Pagophilus groenlandicus</i>
		Phocina	<i>Phoca largha</i> <i>Phoca vitulina</i> <i>Pusa hispida</i> <i>Pusa sibirica</i> <i>Pusa caspica</i> <i>Halichoerus grypus</i>

Su ciclo de vida se puede dividir esquemáticamente en una etapa reproductiva corta, y una etapa pelágica larga. La etapa reproductiva se desarrolla entre los meses de noviembre y diciembre, y es cuando el parto y la posterior cópula ocurren. Al momento de la reproducción, *A. australis* exhibe un sistema poligínico de leks, ya que las hembras son capaces de desplazarse entre los territorios defendidos por los machos (Franco *et al.* 2008). Después de la etapa reproductiva, comienza la etapa pelágica, donde las hembras alternan períodos de alimentación en el mar, desplazándose varios cientos de kilómetros mar adentro (Nowak 1999; Thompson *et al.* 2003), con períodos de amamantamiento de la cría en tierra. Esta etapa se extiende aproximadamente unos 10 meses (Ponce de León 1983).

Reseña de la explotación comercial de *A. australis* en el Uruguay y sus posibles consecuencias

Durante los siglos XVIII y XIX varias especies de pinnípedos sufrieron severos declives poblacionales debido a la sobreexplotación comercial (Busch 1985; Bonner & Laws 1964), y *A. australis* no fue la excepción. Su explotación, conjuntamente con el león marino, *Otaria flavescens*, se practicó por un extenso período de tiempo en el Uruguay con el fin de utilizar su piel, aceite y carne. En nuestro país, el inicio de la explotación se remonta al 1515, pero fue entre los años 1873 y 1991 cuando se desarrolló la explotación comercial. A mediados del año 1940, el Estado extremó la administración y el manejo de las poblaciones como reacción ante la notoria disminución de los tamaños poblacionales. Fue en 1992 que por resolución del INAPE (posteriormente DINARA Y MGAP) comenzó la veda (Ponce de León 2000). El número oficial registrado de animales sacrificados en la zafra solamente para el período comprendido entre los años 1950 y 1991, fue de 273.416 individuos (Ponce de León 2000) Algunos investigadores proponen que al menos 800.000 individuos fueron asesinados durante más de dos siglos (Vaz Ferreira & Ponce de León 1984, 1987). A pesar de la intensa explotación, la población se recupera lentamente ya que la tendencia poblacional estimada a partir de conteo de cachorros y simulaciones poblacionales, aumenta a un ritmo de 2% anual (Páez 2006). En la actualidad, *A. australis* está catalogada para la UICN como de *bajo riesgo*. Sin embargo, pese a la importante reducción poblacional que sufrió, no existen estudios

que hayan evaluado si la magnitud de dicha explotación fue capaz de provocar un evento de cuello de botella en las poblaciones uruguayas. Este evento puede traer como consecuencias una reducción de la variabilidad genética poblacional, una disminución en el tamaño poblacional efectivo debido al cruce inevitable que ocurre entre individuos emparentados, fijación de alelos medianamente deletéreos, y por ende una pérdida en la capacidad adaptiva y una probabilidad de extinción incrementada (Gilpin & Soulé 1986; Frankham 2002). Es común que estos perjuicios actúen de manera conjunta y retroalimentada, provocando lo que se conoce como Vórtice de extinción (Gilpin & Soulé 1986), donde la causa primera es un tamaño poblacional efectivo reducido.

Antecedentes respecto a la estructura poblacional en pinnípedos

A partir de los estudios realizados en diversas especies de pinnípedos se pueden constatar dos patrones generales en relación a la estructura poblacional. El primero, es que las hembras presentan a pesar de su gran capacidad de dispersión, una marcada filopatria, constatada en diversos trabajos que utilizaron como marcador, ADN mitocondrial (Stanley *et al.* 1996; Andersen *et al.* 1998; Slade *et al.* 1998; Burg *et al.* 1999; Goldsworthy *et al.* 2000; Hoelzel *et al.* 2001; Wynen *et al.* 2000). En cambio, a los machos se los ha considerado usualmente como menos filopátricos que las hembras, en base a estudios que han usado marcadores nucleares. Existen pocas excepciones donde este patrón se invierte, entre ellas, la más interesante debido a su parentesco con *A. australis*, y extrema, debido al grado, involucra a *Arctocephalus gazella* (Hoffman *et al.* 2006b). El segundo patrón, es que los pinnípedos de cría en tierra, tienden a presentar niveles significativos de estructura genética a lo largo de su rango de distribución (*Arctocephalus tropicalis* (Wynen *et al.* 2000); *Phoca vitulina* (Stanley *et al.* 1996; Westlake & O' Corry-Crowe 2002); *Mirounga leonina* (Hoelzel *et al.* 2001); *Halichoerus grypus*, (Boskovich *et al.* 1996)) comparado con los pinnípedos que se reproducen en capas de hielo (*Halichoerus grypus*, esta especie se reproduce en ambos sustratos (Boskovich *et al.* 1996),). Esto se debería a la inestabilidad de las capas de hielo como sustrato de apareamiento, que haría más difícil la fidelidad natal. De hecho, esta observación fue el punto de partida para un ambicioso artículo llevado a cabo por Davis *et al.*

(2008), el cual buscaba si ciertas características, entre ellas, el sustrato de apareamiento, servían para predecir su estructura poblacional. Este segundo patrón, se observó para subpoblaciones de varias especies que se encontraban distanciadas por varios cientos incluso miles de kilómetros, utilizando ADN mitocondrial como marcador molecular. Algunos resultados de varios trabajos, dejan claro que la interpretación entre la distancia de las colonias y la estructura poblacional debe ser llevada a cabo con mucha cautela (ver Wynen *et al.* 2000, en relación a *A. gazella*). En relación a esto último, algunos estudios han constatado estructura genética entre colonias distanciadas por no más de 100 kilómetros (*Leptonychotes weddellii* (Davis *et al.* 2008); *Zalophus californianus* (Schramm *et al.* 2009))

Los estudios con respecto a la estructura genética en *A. australis* distan de ser suficientes, existiendo únicamente dos trabajos. Uno de ellos muestra mediante el análisis de secuencias del citocromo b del ADNm (Túnez *et al.* 2007) una gran diferencia entre las poblaciones de Punta San Juan (Perú) y Cabo Polonio (Uruguay). El segundo trabajo (de Oliveira *et al.* 2008), integra técnicas moleculares y morfológicas, sugiriendo que las poblaciones peruanas y norte de Chile sean consideradas como distintas unidades evolutivamente significativas, diferenciándolas con respecto a las poblaciones localizadas en Uruguay, Islas Falkland y Argentina.

Justificación

Entendiendo la importancia de la estructura poblacional en el potencial evolutivo de las especies, conociendo los efectos de la explotación comercial, y teniendo en cuenta que es en Uruguay donde *Arctocephalus australis* principalmente radica, resulta difícil pensar que aún se desconozca cual es su situación poblacional a nivel genético. Conocer su estructura poblacional, así como constatar su variabilidad y determinar si efectivamente se vio afectado por un evento de cuello de botella, resulta significativo principalmente por dos motivos. Primero, porque poseer conocimiento de dichas características y acontecimiento, claramente, es necesario para definir estrategias de conservación, manejo o explotación. Y segundo, porque

dicho conocimiento complementará la escasa información existente con respecto a *A. australis*. Es por esto, que en este trabajo, se hizo uso de herramientas moleculares con el fin de ayudar a conocer la estructura genética de la población uruguaya de *A. Australis* y el impacto en la variación genética como consecuencia de un posible evento de cuello de botella.

Las herramientas elegidas fueron los microsatélites, los cuales han sido empleados exitosamente para abordar la estructura poblacional (Kretzmann *et al.* 2001; Hoffman *et al.* 2006a; Coltamn *et al.* 2007) y para estudiar la ocurrencia de eventos de cuello de botella (de Oliveira *et al.* 2009, Shultz *et al.* 2009) en varias especies de pinnípedos.

Para llevar a cabo este estudio, se analizaron 4 *loci* de microsatélites diseñados para otras especies de pinnípedos que mostraron ser polimórficos también en *A. australis* (Gemmell *et al.* 1997; Hoffman *et al.* 2007).

Objetivos

General:

Analizar mediante el uso de microsatélites la estructura genética poblacional de *Arctocephalus australis* en las principales colonias reproductivas de la costa Atlántica (Isla de Lobos e islas de Cabo Polonio).

Específicos:

- Adquirir experiencia en técnicas moleculares básicas: extracción de ADN, amplificación vía PCR y corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida.
- Optimizar las condiciones para la correcta amplificación de 4 *loci* de microsatélites en *A. australis* partiendo de protocolos ya establecidos.
- Introducirse al análisis de microsatélites mediante el uso de diversos programas.
- Determinar si existe a nivel genético, evidencia de un evento de cuello de botella asociado a la explotación comercial.

Materiales y Métodos

Colecta de muestras, extracción de ADN y genotipado

Se utilizaron un total de 24 muestras de tejido, de las cuales 10 fueron de individuos de Isla de Lobos (IL) (35°02'S. 52°55'W) y las otras 14 de la zona de Cabo Polonio (CP) (34°24'S. 53°46'W). Las muestras fueron colectadas a partir de tejido de animales varados muertos (piel, músculo, e hígado) encontrados en la costa en la zona de Cabo Polonio y a partir de un pequeño corte en una de las aletas de cachorros vivos en la Isla de Lobos. Todas las muestras fueron guardadas individualmente en alcohol 95%. La extracción de ADN total se realizó siguiendo el protocolo modificado a partir de Miller *et al.* (1988) (Apéndice 1).

Los 4 *loci* de microsatélites (Tabla 2) fueron amplificados por PCR (del inglés: *polymerase chain reaction*) ajustando las condiciones de Gemmell *et al.* (1997). Los PCRs fueron llevados a cabo en un volumen de reacción de 10µl conteniendo, 1 X buffer (Invitrogen), 0,5mM dNTPs, 0,25mM para cada oligonucleótido, 3,5mM de MgCl₂ y 0,1 U de *Taq* (Invitrogen) (Apéndice 2). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% (Apéndice 3) para verificar la amplificación del locus deseado. Los oligonucleótidos directos fueron marcados con fluorocromos para su posterior análisis en secuenciador automático de capilares, ABI3130 (Applied Biosystems). Posteriormente se utilizó el programa PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) para asignar tamaños alélicos y genotipar los individuos.

Análisis de Datos

Las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg y de desequilibrio de ligamiento se examinaron utilizando el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Para el primero de los test se analizó locus por locus sin tener en cuenta aquellos individuos que no pudieron ser genotipados para el locus en cuestión, considerando las dos poblaciones juntas y por separado. Se ajustaron 200.000 pasos en la cadena de Markov más 3000 iteraciones de depuración (del inglés:

dememorization), necesarias para alcanzar un punto de partida aleatorio. Para analizar el desequilibrio de ligamiento de los 4 *loci* de microsatélites, se compararon todos los pares de *loci* entre sí, ignorando aquellos individuos para el cual no fue posible el genotipado de los *loci* involucrados. Se ajustaron 16.000 permutaciones y el número de diferentes condiciones iniciales para el algoritmo EM (del inglés: *expectation-maximization*) se estableció en 10.

Para saber cómo se encuentra distribuida la variación genética dentro y entre cada una de las poblaciones examinadas y determinar así su estructura genética, se realizó un AMOVA (del inglés: *Analysis of Molecular Variance*) locus por locus (Excoffier *et al.* 1992) utilizando el programa ARLEQUIN 3.11. El análisis AMOVA considera las posibles diferencias cuantitativas entre haplotipos, es decir su *distancia genética*, lo que incrementa su poder y sensibilidad para detectar subdivisión poblacional (Hudson *et al.* 1992), y subdivide la variación genética total y la explica mediante la variación genética dentro y entre las demes. Este abordaje es preferible cuando existen niveles altos de variación genética como la que se espera con microsatélites (Templeton 2006). El análisis locus por locus es necesario cuando se desconoce la fase gamética y preferible cuando hay datos faltantes (Excoffier *et al.* 1992). La diferenciación genética entre las dos colonias de estudio se estimó mediante los análogos a F_{ST} , Φ_{ST} (Excoffier *et al.* 1992) y R_{ST} (Slatkin 1995). El estadístico Φ_{ST} estima la distancia genética mediante la *distancia euclidiana*. Ésta, toma en cuenta la diferencia en las frecuencias alélicas entre los mismos alelos de una y otra población. En cambio, el estadístico R_{ST} estima la distancia genética especialmente para microsatélites, mediante *la suma de la diferencia de los tamaños* (número de repetidos del microsatélite) *al cuadrado*, asumiendo el modelo mutacional paso a paso. Ambos análogos de F_{ST} , si no hay subdivisión poblacional, tenderán a cero, mientras que si las subpoblaciones se encuentran diferenciadas, tenderán a 1. Se ajustaron tanto para el Φ_{ST} como para R_{ST} 16000 permutaciones. Para calcular cómo se distribuye la variación dentro de una subpoblación se calculó el estadístico F_{IS} . Mediante AMOVA, F_{IS} corresponde a la variación entre individuos, luego de dividir la variación total de la subpoblación en dicha variación y dentro de individuos. En otras palabras, F_{IS} estima si la subpoblación presenta falta o exceso de heterocigotas debido al apareamiento no aleatorio. Si existe un exceso de heterocigotas en la subpoblación, F_{IS} tiende a -1,

en cambio, si existe un exceso de homocigotas, tiende a 1. Si la subpoblación presenta apareamiento al azar, F_{IS} no difiere significativamente de cero. Se realizaron para el cálculo de dicho estadístico, 16000 permutaciones.

También se realizó un análisis bayesiano para inferir la estructura poblacional utilizando el programa Structure v2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000). Este programa a diferencia de todos los estimadores nombrados previamente, no asume *a priori* ningún tipo de estructura genética, sino que asume un modelo de K poblaciones de manera tal que sin utilizar un modelo mutacional en particular y maximizando el equilibrio Hardy-Weinberg y el equilibrio de ligamiento, arroja un valor de verosimilitud para cada K asumida. Luego se calcula la probabilidad de la K obtenida (Pritchard *et al.* 2000). En este trabajo se realizó para cada K asumida (1, 2 y 3) entre 2 y 3 corridas independientes usando 3 millones de iteraciones después de 100.000 iteraciones de depuración (del inglés: *burn-in*). No se asumió mezcla (del inglés: *admixture*) de ambas localidades a pesar de que representaría una situación más real, debido a que para el correcto agrupamiento se requieren muchos *loci* (más de 15 *loci*) (Pritchard *et al.* 2000).

Se buscó evidencia de un posible evento de cuello de botella mediante el programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Este programa calcula para cada población y para cada locus, la diversidad génica esperada (o heterocigosis en el sentido de Nei (1978)) a partir del número de alelos (o diversidad alélica), dado el tamaño de la muestra bajo la asunción de equilibrio entre deriva génica y mutación. Cuando un evento de cuello de botella ocurre, causa una reducción más rápida del número de alelos que de la diversidad génica y, por lo tanto, cuando se compara la heterocigosis esperada con la observada, la primera resulta menor. En este programa, se pueden asumir los tres modelos mutacionales mencionados previamente: IAM (Kimura & Crow 1964), SMM (Kimura & Otha 1978) o TPM (Di Rienzo *et al.* 1994). En este trabajo, sólo se utilizó el modelo TPM para evaluar la ocurrencia de un evento de cuello de botella en ambas poblaciones agrupadas y por separado, ya que se ha propuesto que la mayoría de los microsatélites se ajustan mejor a este modelo que a los restantes (Di Rienzo *et al.* 1994). Bajo este modelo, se analizaron varios escenarios combinando dos parámetros: la proporción de mutaciones que se rigen por SMM y la varianza en el número de cambios de

unidad repetida por evento mutacional. Al combinar dichos parámetros, se analizan numerosas opciones mutacionales dentro del rango que imponen los modelos extremos IAM y SMM, lo que permite evitar errores tipo I (detectar evidencia de un evento de cuello de botella cuando realmente dicho evento no ocurrió) y tipo II (no detectar dicha evidencia cuando realmente el evento ocurrió) (Williamson-Natesan 2005). A medida que los escenarios mutacionales se acercan a IAM, es más probable cometer un error tipo I, mientras que, a medida que lo hacen hacia SMM, se puede incurrir en uno tipo II. Se consideran por tanto, escenarios mutacionales más estrictos a aquellos que poseen una mayor proporción de mutaciones paso a paso con una menor varianza en el tamaño de las mutaciones. Para determinar si la población exhibe un número significativo de *loci* con exceso de diversidad génica (hipótesis alternativa), se utilizó sólo uno de los 3 test presentes en el programa, el test Wilcoxon (de una cola). Este es el más apropiado ya que es potente incluso utilizando pocos *loci* polimórficos, como los cuatro presentes en este trabajo, y con cualquier número de individuos. Se realizaron 1000 iteraciones para cada uno de los escenarios.

Tabla 2. Información sobre los 4 loci de microsatélites utilizados en este trabajo. Se muestran para el número de alelos e individuos genotipados para este estudio, la colonia de CP, IL y para las dos colonias juntas en ese orden.

Locus	Número de acceso al GenBank	Rango alélico	Referencia:	Número de alelos	Número de ind. genotipados
ZcwE04	DQ836324	(128–140)	Hoffman <i>et al.</i> 2007	9-9-11	7-10-17
ZcwG04	DQ836328	(170–186)	Hoffman <i>et al.</i> 2007	9-7-10	7-10-17
Hg4.2	G2090	(144-196)	Allen <i>et al.</i> 1995	9-9-10	8-10-18
Hg8.10	G02093	(180-198)	Allen <i>et al.</i> 1995	3-5-5	4-10-14

Resultados

Equilibrio Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento y F_{IS}

Se analizaron 4 *loci* de microsatélites polimórficos para genotipar 24 lobos finos muestreados de las 2 colonias uruguayas. Para los 10 individuos provenientes de Isla de Lobos, todos los *loci* amplificaron y fueron genotipados, en cambio, se excluyeron 3 de los 14 individuos de islas de Cabo Polonio ya que no pudieron ser genotipados para ninguno de los *loci*.

Ambas poblaciones mostraron una diversidad alélica similar, siendo el número total de alelos para cada locus entre 5 y 11 (Tabla 2). La heterocigosis esperada (H_e) dentro de cada población, varió entre 0,679 a 0,925 para la población de CP y desde 0,758 a 0,894 para la población de IL (Tabla 3). Tanto la heterocigosis esperada como la diversidad alélica constada, sugieren una variabilidad genética moderada a alta (ver discusión). El locus G04 para la población de CP, mostró estar desviado significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg. Aunque dicha desviación no fue consistente entre las colonias, igualmente este *loci* se removió de los análisis subsecuentes de estructura poblacional. Sin embargo, los análisis de estructura poblacional que incluyeron este *loci*, dieron resultados idénticos a los obtenidos excluyéndolo. Todos los *loci* analizados se encontraron en equilibrio de ligamiento para ambas poblaciones así como para la población total (Tabla 4).

El estimador F_{IS} obtenido marginando el locus G04 del análisis, fue de 0,212 y significativo para la colonia de CP (Tabla 5). Esto estaría indicando un exceso importante de homocigotas en esta localidad. Para la colonia de IL y para ambas poblaciones agrupadas, no se hallaron valores significativamente distintos de cero.

Tabla 3. Heterocigosis esperada y observada para los 4 loci de microsatélites con su valor P correspondiente, calculado para la población total como para ambas colonias por separado. Los valores significativos ($P < 0,05$) se resaltan en negro.

Locus	Total			Is. de Cabo Polonio			Isla de Lobos		
	Heterocigosis esperada (He)	Heterocigosis observada (Ho)	valor P	Heterocigosis esperada (He)	Heterocigosis observada (Ho)	valor P	Heterocigosis esperada (He)	Heterocigosis observada (Ho)	valor P
E04	0,910	0,765	0,077	0,835	0,714	0,269	0,895	0,800	0,618
Hg4.2	0,852	0,823	0,443	0,879	0,714	0,129	0,847	0,900	0,202
G04	0,894	0,778	0,112	0,925	0,625	0,049	0,874	0,900	0,760
Hg8.1	0,722	0,643	0,598	0,679	0,500	1	0,758	0,700	0,616

Tabla 4. Test de desequilibrio de ligamiento para los 4 loci de microsatélites. Se muestran los valores P calculados para is. de Cabo Polonio e Isla de Lobos (tabla superior; por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente) y para la población total (tabla inferior; por encima de la diagonal). Ningún valor P resultó significativo ($P < 0,05$).

	E04	Hg4.2	G04	Hg8.1
E04	*	0,066	0,996	0,715
Hg4.2	0,981	*	0,097	0,365
G04	0,677	0,298	*	0,398
Hg8.1	0,533	0,811	0,486	*
E04	*	0,381	0,499	0,977
Hg4.2		*	0,301	0,375
G04			*	0,824
Hg8.1				*

Tabla 5. Valores F_{IS} obtenidos analizando 3 y 4 loci de microsatélites para las poblaciones de is. de Cabo Polonio, Isla de Lobos y para la total. Los valores F_{IS} significativos, asociados a valores P menores a 0,01 y a 0,05 se diferencian por dos (**) y un (*) asterisco, respectivamente.

Poblaciones	4 loci	3 loci
	F_{IS}	F_{IS}
Is. de CP	0,247**	0,212*
Isla de Lobos	0,023	0,042
Total	0,113*	0,105

Análisis de la estructura poblacional

Los análisis llevados a cabo para estudiar la estructura poblacional indicaron que la variación genética total se explica principalmente por la variación existente dentro de ambas colonias y no entre colonias. Los valores hallados para los estimadores Φ_{ST} y R_{ST} , desarrollado especialmente para microsatélites asumiendo SMM, fueron de 0,012 y 0,001, respectivamente (Tabla 6). Ninguno de los valores de ambos estimadores fue significativamente distinto de cero, indicando que las 2 colonias de *A. australis* en el Uruguay, conformarían en conjunto una población panmíctica sin estructura poblacional.

Tabla 6. Valores obtenidos para el AMOVA locus por locus para los estimadores Φ_{ST} y R_{ST} (tabla superior e inferior respectivamente) promediando los 3 loci de microsatélites utilizados para analizar la estructura poblacional. Ningún valor *P* resultó ser significativo.

Fuente de variación	Suma de los cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de Fijación	Valor P
Entre poblaciones	1,570	0,015	1,222	0,012	0,340
Dentro de poblaciones	37,268	1,234	98,778		
Total	38,838	1,249			
Entre poblaciones	207,329	0,194	0,096	0,001	0,413
Dentro de poblaciones	6436,100	202,294	99,904		
Total	6643,387	202,488			

El resultado obtenido mediante el análisis bayesiano, concordó con los mencionadas anteriormente. El mayor valor de verosimilitud obtenido por el programa Structure v2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) fue cuando se asumió una sola población (K=1), lo que corresponde a una probabilidad cercana a 1 (Tabla 7). El valor de verosimilitud asumiendo K=2 y K=3 siempre resultó menor.

Tabla 7. Resultados para 3 corridas independientes utilizando el programa Structure v2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) para cada número hipotético de poblaciones (K) usando 3 loci. A partir del valor de verosimilitud obtenida ($\ln P(x \setminus K)$) se calcula la probabilidad posterior ($P(K \setminus x)$), la cual indica cual de las poblaciones asumidas es más consistente con los datos.

Corrida	Número de poblaciones (K)	$\ln P(x \setminus K)$	Promedio $\ln P(x \setminus K)$	$P(K \setminus x)$
1	1	-195	-195,4	0,964
2		-195,5		
3		-195,7		
1	2	-199,1	-198,7	0,036
2		-197,7		
3		-199,3		
1	3	-205,1	-205,4	~0
2		-206		
3		-205		

Examen de un evento de cuello de botella

Mediante el programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996), no se hallaron desviaciones significativas ($P < 0,05$) del equilibrio mutación-deriva genética agrupando ambas colonias ni analizando la colonia de IL por separado. Esto se obtuvo para los siete escenarios mutacionales asumidos (Tabla 8). Sin embargo, para IL varios valores P resultaron marginales, incluso bajo modelos mutacionales que consistían en un 88% en mutaciones paso a paso. Para el análisis de las colonias agrupadas, se marginó el locus G04 perteneciente a la colonia de CP. No se hicieron los análisis correspondientes para esta última colonia, debido a que se requieren como mínimo 4 *loci* para que el test Wilcoxon sea válido (Cornuet & Luikart 1996).

Tabla 8. Evaluación de un evento de cuello de botella mediante el programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Se muestran los resultados del test Wilcoxon para Isla de Lobos y para ambas colonias agrupadas, asumiendo diversos escenarios mutacionales bajo TPM. Los valores marginales se resaltan en negro.

Porcentaje de SMM asumiendo TPM	Varianza TPM	Valor <i>P</i>	
		Isla de Lobos	Ambas Poblaciones
95	2	0,437	0,562
88	2	0,437	0,562
	4	0,437	0,562
	16	0,062	0,562
70	4	0,094	0,156
	16	0,062	0,156
	30	0,062	0,156

Discusión

Trabajo de laboratorio y genotipado

Los procesos de extracción de ADN, amplificación y genotipado, resultaron ser notoriamente más dificultosos para las muestras provenientes de CP con respecto a las procedentes de IL. La dificultad presentada por las muestras de CP, se refleja en el bajo número de individuos genotipados para cada locus con respecto a los 14 iniciales. La recolección de las muestras de tejido para la posterior obtención de ADN a partir de técnicas no invasivas, como las realizadas para este trabajo, presenta un serie de desventajas en contrapeso a los beneficios que representa para la especie de estudio (Waits *et al.* 2005). En este sentido, el avanzado estado de degradación del ADN, representa la principal dificultad al momento de su extracción y de su posterior amplificación (Taberlet *et al.* 1996). A su vez, la reacción de amplificación puede verse inhibida por la presencia de interferentes y de contaminantes presentes en el tejido descompuesto. Fue probablemente debido a dichas dificultades, que para gran parte de las muestras pertenecientes a la colonia de CP, se necesitó disminuir la rigurosidad de la reacción de PCR para lograr la amplificación del *locus* deseado (incluso así, no todos los *loci* pudieron ser amplificados para todos los individuos). Al momento del genotipado, debido al efecto de tartamudeo (Litt *et al.* 1993; Ginot *et al.* 1996; Johansson *et al.* 2003) y al de las amplificaciones inespecíficas, causadas por la especificidad reducida de la reacción de PCR, definir los alelos presentes en un individuo resultaba una tarea más que arriesgada en algunos casos. Fue por esto, que los *loci* que presentaron gran dificultad fueron excluidos de los análisis de este trabajo.

La presencia de alelos nulos para algunos *loci* de microsatélites es otro problema que posiblemente haya afectado a los análisis, ya que es capaz de dar cuenta del exceso de homocigotas en la población de CP (Tabla 5) y de explicar el desvío significativo del locus G04 del equilibrio H-W (Tabla 3). Cuando se amplifica mediante PCR un solo alelo de los dos presentes en un individuo (diploide y heterocigota), el alelo no amplificado, se denomina alelo nulo. Esto puede deberse a varios factores: (i) la cantidad de ADN inicial del cual se parte para la amplificación es muy baja, (ii) una mutación en el sitio de apareamiento del

oligonucleótido impide la amplificación, (iii) ocurre una amplificación diferencial de los alelos debido a su tamaño (Dakin & Avise 2004). Para todas aquellas muestras de CP que pudieron ser afectadas por la presencia de alelos nulos, parece improbable que la presencia de los 2 últimos factores expliquen una proporción significativa de lo acontecido, ya que a todos los individuos de IL se les pudo determinar su genotipo.

Por lo tanto, la escasa cantidad de ADN presente en las muestras producto de la degradación, parece ser el principal factor que originó tanto la presencia de alelos nulos, como los problemas asociados al genotipado.

En este trabajo se utilizó indistintamente un único protocolo básico para ambas tipos de muestras, lo que explica, en parte, las dificultades posteriores para llevar a cabo el análisis de la colonia de CP. Otros métodos de extracción de ADN más eficientes y sensibles como el fenol-cloroformo (ver Sambrook *et al.* 1989) o los basados en columnas de sílica gel para ADN degradado (Alda *et al.* 2007), podrían brindar una solución parcial a este problema. Algunos procedimientos que se podrían efectuar para disminuir los efectos de la presencia de alelos nulos son: reamplificar todos los individuos homocigotas y/o mediante software, identificarlos y corregir los errores de genotipado (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Análisis de la estructura poblacional

Para estudiar la estructura poblacional de *A. australis* en el Uruguay, lugar donde se encuentra el 80 % de la población, se analizaron individuos de las localidades de CP e IL, para 3 *loci* de microsatélites. Para estimar la estructura genética, se hizo uso de un AMOVA, utilizando los estadísticos Φ_{ST} y R_{ST} , y de un análisis bayesiano.

Los resultados obtenidos tanto en el AMOVA, con los 2 estadísticos, como mediante el análisis bayesiano fueron concordantes. Ambos indican que no existiría estructura poblacional. Los estadísticos Φ_{ST} y R_{ST} (que se diferencian en como ponderan la distancia genética, siendo el segundo desarrollado especialmente para microsatélites), dieron valores no significativamente distintos de cero (Tabla 6). Esto

último indicaría, que la variabilidad total de *A. australis* está representada en su totalidad dentro de cada una de las colonias y no entre ellas. Por lo tanto, es claro que el flujo génico entre ambas localidades predominaría ante la deriva genética.

El análisis bayesiano llevado a cabo, el cual utiliza una aproximación complementaria al del análisis anterior, ya que a partir de los genotipos presentes estima el número más probable de poblaciones (k), arrojó como resultado más probable que la población uruguaya de *A. australis* se trate de una única población panmíctica (Tabla 7).

Los resultados obtenidos en este trabajo son los que se podrían esperar de antemano si se tiene en cuenta la capacidad de dispersión de *A. australis* y la escasa distancia (aproximadamente 120km) que separa ambas localidades, pero no es un resultado trivial si se revisan los antecedentes de otras especies. La relación entre la distancia geográfica entre poblaciones y la estructura poblacional, no siempre se encuentran relacionados directamente entre especies, e incluso dentro de las mismas especies. Con respecto a esto último, estudios llevados a cabo en *A. gazella* y *A. tropicalis* por Wynen *et al.* (2000), hallaron para la primera especie un patrón difícil de explicar. Mientras 2 poblaciones separadas por miles de kilómetros mostraban ser una única población panmíctica, otra colonia separada por tan solo 400 kilómetros de una de ellas, no compartía ningún haplotipo y por tanto, no podía considerarse como parte dicha población. Fue para los machos de esta misma especie, para los cuales se constató una extrema filopatría (Hoffman *et al.* 2006b), la cual podría ayudar a entender este patrón.

También se ha constatado estructura para especies distanciadas por centenares de kilómetros. Para *Leptonychotes weddellii* (Davis *et al.* 2008) y *Zalophus californianus* (Schramm *et al.* 2009) se halló estructura poblacional entre colonias separadas por menos de 100 km, utilizando como marcadores, microsatélites y ADNm.

Diversidad genética y análisis de cuello de botella

A pesar de la dura explotación comercial a la cual *A. australis* se vio sometida, el número de alelos para cada *loci* resultó ser importante para los pocos individuos analizados (Tabla 2), sugiriendo una moderada a alta variabilidad, si se las compara con otras especies de pinnípedos con historias demográficas similares (e.g. *Mirounga angustirostris* (Bonnell & Selander 1974; Hoelzel *et al.* 1993) y en *Monachus schauinslandi* (Schultz *et al.* 2009). Más aún, la variabilidad alélica encontrada en este trabajo para la población uruguaya, es acorde con la hallada por de Oliveira *et al.* (2009) en donde se analizaron otras poblaciones de *A. australis* del Atlántico, más precisamente del sur de Brasil, y del Pacífico. Para las poblaciones del Atlántico, encontraron un amplio número de alelos (entre 11 y 7), aunque para otros *loci* (lo que impide la directa comparación), excepto para el Hg8.1, analizando 48 individuos.

No sería el primer caso donde luego de una intensa explotación no se observa una variabilidad genética disminuida. Efectivamente, ya en varias especies de pinnípedos se ha visto con sorpresa éstos resultados (*Arctocephalus philippii* (Goldsworthy *et al.* 2000); *Arctocephalus tropicalis* (Wynen *et al.* 2000); *A. gazella* (Wynen *et al.* 2000); *Arctocephalus townsendi* (Weber *et al.* 2004); *Mirounga leonina* (Hoelzel *et al.* 1993); población del Pacífico de *A. australis* (de Oliveira *et al.* 2009); *Otaria flavescens* (Feijoo 2009)). Es necesario aclarar que, más allá de que no se encuentre una variabilidad neutral reducida en las especies de pinnípedos luego de haber sufrido una intensa explotación comercial, esto no quiere decir que mantienen los niveles de variabilidad preexistentes o que éstos no se vean muy afectados. De hecho, el conjunto de individuos analizados de *A. townsendi* previos a la explotación, mostraron tener una diversidad genética sustancialmente mayor a los individuos existentes de dicha especie (Weber *et al.* 2004).

Cuando se analizó la posibilidad de un evento de cuello de botella, no se encontraron valores *P* significativos ($P < 0,05$) agrupando ambas colonias, ni para la colonias de IL por separado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por de Oliveira *et al.* (2009) para la población Atlántica de *A. australis*. En relación a los valores marginales de *P* obtenidos para la colonia de IL, no creemos que se traten de evidencia de un evento de cuello de botella, a pesar de que uno de ellos se

obtuvo estableciendo un modelo mutacional estricto, por varios motivos. Primero, porque de lo contrario se debería haber obtenido valores P significativos al asumir escenarios menos rigurosos, donde incluso se es propenso a errores tipo I (ver Materiales y Métodos). Segundo, porque cuando se agrupan ambas poblaciones, no se obtiene ningún valor P marginal bajo ninguno de los escenarios mutacionales. Y Finalmente, si se revisa la bibliografía (ver Piry *et al.* 1999; Williamson-Nateson 2005; Garza & Williamson 2001), las condiciones para evaluar el equilibrio entre mutación y deriva génica son aun más rigurosas, bajo las cuales, naturalmente, no se hallaría evidencia sobre un evento de cuello de botella. Hasta el momento, sólo se ha encontrado evidencia de un evento de cuello de botella para las poblaciones de *A. australis* que se encuentran en el Pacífico (de Oliveira *et al.* 2009). Estas poblaciones se vieron afectadas por los efectos de El Niño conjuntamente con los de la explotación comercial.

Una de las posibles explicaciones que puede dar cuenta de la poca reducción en la diversidad alélica, y por tanto de la ausencia de evidencia de un evento de cuello de botella, puede ser la manejada por de Oliveira *et al.* (2009). Ésta sostiene que debido a que la explotación comercial a la cual se vio sometida la población de *A. australis*, no fue igual de intensa en todas las colonias Atlánticas, concentrándose en varios sitios, principalmente en Uruguay, dejó sitios ilesos, lo que pudo haber proporcionado mayores oportunidades para que éstas poblaciones se recuperen sin perder sustancialmente su variabilidad genética. Ésta es un explicación factible, pero que asume de antemano que no existe estructura poblacional entre las colonias de *A. australis* del Atlántico, ya que sería el flujo génico el responsable de conectar dichas poblaciones. A partir de este trabajo, tenemos evidencia de que por lo menos, las poblaciones uruguayas de *A. australis* no se encuentran estructuras, por lo que dicha explicación podría resultar viable.

A modo de especulación, si su sistema de apareamiento poligínico de leks es semejante al de *A. gazella*, para la cual se ha visto que las hembras seleccionan los machos menos relacionados al momento de la reproducción (Hoffman *et al.* 2007), también podría explicar en parte, tanto la variabilidad observada, como lo constatado para el evento de cuello de botella. Por lo tanto, dicho sistema, dada la posible participación activa de las hembras en la reproducción, ocasionaría que el

número poblacional efectivo no sea tan reducido con respecto al tamaño poblacional real. Como consecuencia de esto último, las implicancias de la deriva genética se ven reducidas y por tanto la variabilidad no se vería tan afectada.

Algo a tener en cuenta es que, más allá de las explicaciones puntuales que puedan existir para todas aquellas especies de pinnípedos que no vieron comprometida su variabilidad genética después de haber sufrido explotación comercial, es que dado el número de dichas especies, es posible que existan factores o características en común para éstas, que expliquen de manera conjunta su supuesta recuperación.

Implicancias

Las implicancias de los resultados obtenidos en este trabajo son importantes para planes de manejo o conservación, dado que sugieren que a pesar de la conocida presión que ejerció la actividad comercial, la población de *A. australis* no sufrió un evento de cuello de botella, ni vio sus niveles de variabilidad reducidos. Además, según lo constatado en este trabajo para la estructura poblacional, es posible que el hecho de que la población no se encuentre estructurada geográficamente haya ayudado a la aparente recuperación de *A. australis*.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que la población uruguaya de *Arctocephalus australis* no se encuentra estructurada genéticamente, lo que significa que ambas poblaciones, la de islas de Cabo Polonio y la de Isla de Lobos, conformarían en conjunto una única población panmíctica. Se encontraron indicios de una variabilidad genética de moderada a alta y no se encontró evidencia a nivel genético de un evento de cuello de botella causado por la explotación comercial. Para llevar a cabo éstos análisis fue necesario hacer uso de técnicas moleculares básicas, ajustar las condiciones para amplificar los *loci* de microsatélites para *A. australis*, e introducirse mediante diversos programas al análisis de microsatélites.

Perspectivas y recomendaciones

Futuras investigaciones que utilicen un mayor número de *loci* de microsatélites como de individuos, serían necesarias para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El uso de otros marcadores genéticos, además de los microsatélites, como por ejemplo, el ADN_m y SNPs, enriquecerían tanto el análisis de estructura poblacional como el de variabilidad genética, ya que juntos podrían actuar de manera sinérgica salvando los perjuicios que cada uno de ellos tiene por separado.

En miras a la explotación comercial, es de vital importancia analizar la estructura poblacional de *A. australis* a nivel regional, para así establecer su resistencia o vulnerabilidad a tal actividad. Si las poblaciones del atlántico de *A. australis* se encuentran conectadas mediante flujo génico, su capacidad de repoblar como de recuperase en los sitios donde sufra explotación va a ser, naturalmente, mayor que si las poblaciones se encuentran estructuradas.

Con respecto a si existe o no evidencia a nivel genético de un evento de cuello de botella, sería importante integrar al análisis programas que utilicen una aproximación complementaria al utilizado en este trabajo para evaluar dicho evento. Esto puede ser de gran utilidad ya que se ha corroborado que dependiendo de las características del evento de cuello de botella, algunos programas presentan una mayor probabilidad de identificar dicho evento correctamente. También sería útil incluir al análisis programas capaces de arrojar una fecha estimada de dicho evento, y así comparar si el resultado obtenido, se condice con lo que se conoce sobre la historia demográfica de *A. australis*.

También sería interesante estudiar mediante marcadores genéticos la filopatría tanto de machos como de hembras de *A. australis*, así como estudiar más profundamente otras características, como por ejemplo su sistema de apareamiento y si presentan repertorios vocales variables geográficamente, para entender el posible rol de dichas características en la estructura poblacional. Éstos estudios, además de proveer una visión más cabal de este grupo, ayudarían a reconocer las

características que hacen a algunas especies de pinnípedos, según varios artículos científicos, animales robustos ante la explotación, de modo tal que arrojaría pistas sobre cuáles son los principales factores a tener en cuenta al momento de proteger especies en peligro de extinción.

Apéndices

Apéndice 1

Extracción de ADN

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA ph 8, 1 % de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X ph. 8 (autoclavado), Etanol o isopropanol absolutos a -20 °C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 o 2 ml.
2. Opcional: Enjuagar brevemente con agua destilada.
3. Agregar 500 µl de buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K.
4. Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, por un mínimo de 2 horas o hasta toda la noche.
5. Opcional: una hora antes de finalizar, agregar 5 µl de RNasa A.
6. Centrifugar al máximo (por ej., 15.000 rpm) por 15 min.
7. Pipetear 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo, así como la capa superficial oleosa (si existiese).
8. Agregar 300 µl de cloruro de sodio, agitar brevemente y centrifugar al máximo por 15 min.
9. Pipetear 500-600 µl del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol a -20°C o el doble de volumen de etanol a -20°C. Agitar lentamente primero, luego mezclar completamente.
10. Opcional: para recuperar mayor cantidad de ADN, colocar a -20°C por dos horas o toda la noche.
11. Centrifugar al máximo por 15 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
12. Lavar breve y cuidadosamente con unos 750 µl de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.
13. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C (lleva unas dos horas).
14. Resuspender en 100 µl 1xTE. Agitar, y opcionalmente incubar a 55°C por 2 horas (o menos).

15. Guardar a -20°C

Apéndice 2

Condiciones para la amplificación de la mayoría de los *loci* de microsatélites:

PCR#:			Ciclado	Temp.	Tiempo
Fecha:			Desnat. inicial	94	3:00
	Ciclos:	5, 5, 30	Desnat.	94	0:30
			Asociación	54-52-50	0:30-0:30-0:30,
No. tubos:	12		Extensión	72	0:30
Vol. /tubo:	9		Ext. final	72	3:00
Reactivo	Conc. de stock	unidad	Conc. final deseada	Vol./tubo	Vol. en mezcla
agua dest				1.04	12.42
Buffer 10X			1X	1.13	13.50
dNTPs	10	mM c/u	0.5	0.45	5.40
oligoMarcado	10	uM	0.25	0.23	2.70
oligoR	10	uM	0.25	0.23	2.70
MgCl ₂	25	mM	3.5	1.26	15.12
Taq	5	u/ul	0.10	0.18	2.16
otros					0.00
			verif. vol. mezcla /tubo	4.5	54.00
4,5 ml de dilución de ADN					

Apéndice 3

Electroforesis de los productos de PCR

Preparación:

1. Se limpian bien las placas de vidrio con etanol 95 %, y se colocan los espaciadores de 0.8 mm entre ellos, sujetando los extremos con pinzas.
2. Se mezclan 10 µl de la solución de acrilamida 5% (sin urea) con 10 µl de TEMED y 100ul de APS. Se agita brevemente la mezcla y se coloca entre los dos vidrios.

3. Rápidamente se coloca el peine de 0.8 mm en el extremo, y se deja polimerizar por unos 20 minutos.
4. Una vez polimerizado, se limpia bien y se coloca en el aparato de electroforesis, el cual se rellena con Buffer TBE 1X.

Electroforesis:

5. Se mezclan 5 µl de producto de PCR y 2ul de "Loading buffer"
6. Se cargan en los pocillos del minigel, y en el último se coloca el estándar de tamaño (100pb generalmente).
7. Se corren los productos a 150V por 25 minutos.

Tinción con plata de geles de acrilamida

Soluciones necesarias:

FIJADOR: 100 ml de Etanol 95°, 5 ml de ácido acético, y completar a 1 litro con agua.

PLATA: 2 g por litro. Esta solución puede reciclarse muchas veces, y antes de descartarla se neutraliza con sal de cocina.

REVELADOR: 30 gr de NaOH por litro (antes de ser utilizado se agrega el formaldehído)

Procedimiento:

1. Sumergir el gel en fijador por 3-5 minutos (mínimo) con agitación, o 10 segundos en microondas a máxima potencia.
2. Remover el fijador y guardar para usarlo al final.
3. Sumergir el gel en plata por 5 minutos (mínimo) con agitación, o 10 segundos en microondas a máxima potencia (si la plata ha sido utilizada muchas veces antes, se recomienda dejar más tiempo)
4. Sumergir el gel en revelador, agregar unas gotitas de formaldehido comercial cada 150 ml. Agitar fuerte al principio para evitar que el exceso de la plata precipite sobre el gel, y luego revelar con agitación hasta que se observen las bandas. En microondas no dejar más de 15 segundos, y luego continuar con agitación.
5. En caso de que el gel haya quedado muy oscuro, y como opcional, se puede dar un baño de agua con un poco de ac. acético para aclarar el color del gel.

6. Repetir el paso 1, con el fijador que se guardó en el paso 2.
7. Sobre vidrio mojado, estirar celofán poroso mojado. Colocar el gel y una segunda capa de celofán mojado bien estirado. Dejar secar toda la noche como mínimo.

Bibliografía

Akey J, Zhang G, Zhang K, Jin L, Shriver M (2002) Interrogating a High-Density SNP Map for Signatures of Natural Selection. *Genome Research*, **12**, 1805-1814.

Alda F, Rey I, Doadrio I (2007) An improved method of extracting degraded DNA samples from birds and other species. *Ardeola*, **54**, 331-334.

Allen P, Amos W, Pomeroy P, Twiss S (1995) Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology*, **6**, 653-662.

Andersen L, Born E, Gjertz I, Wiig O, Holm L, Bendixen C (1998) Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, **7**, 1323-1336.

Avice J (2000) *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Cambridge, Harvard University Press.

Berta A, Sumich J, Kovacs K (2006) *Marine mammals: Evolutionary biology*, 2da ed. California, Academic Press.

Bonnell M, Selander R (1974) Elephant Seals: Genetic Variation and Near Extinction. *Science*, **184**, 908-909.

Bonner W (1968) The fur seal of South Georgia. *British Antarctic Survey Scientific Report*, **56**, 1-81.

Bonner W, Laws R (1964) Seals and sealing, en Priestley R, Adie RJ, Robin GDQ *Antarctic Research* (163-190). London, Butterworths.

Boskovic R, Kovacs K, Hammill M, White B (1996) Geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, **74**, 1787-1796.

Burg T, Trites A, Smith M (1999) Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of harbour seal population structure in the northeast Pacific Ocean. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, **77**, 930-943.

Busch B (1985) *The war against the seals: a history of the North American seal fishery*. Kingston & Montreal, McGill-Queen's University Press.

Campagna, C. 2008. *Arctocephalus australis*. En: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <www.iucnredlist.org>. Bajado el 16 de Diciembre de 2009.

Carvalho C (1975) Ocorrência de mamíferos marinhos no Brasil. *Boletim Técnico do Instituto Florestal*, **16**,13-32.

Cockerham C, Weir B (1987) Correlations, descent measures: Drift with migration and mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **84**, 8512-8514.

Coltman W, Stenson G, Hammill M, Haug T, Davisand C, Fulton T (2007) Panmictic population structure in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Molecular Ecology*, **16**, 1639-1648.

Cornuet J, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.

Crespo E, Schiavini A, Pérez F, Cappozzo H (1999) Distribution, abundance and seasonal changes of South American fur seals, *Arctocephalus australis*, along the coasts of Argentina. En: *Proceedings of the 13th Annual Conference of the European Cetacean Society* (26-27). European Cetacean Society. Valencia. España, 6-8 de abril de 1999.

Dakin E, Avise J (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**, 504-509.

Dasmahapatra K, Hoffman I, Amos W (2009) Pinniped phylogenetic relationships inferred using AFLP markers. *Heredity*, **103**, 168-177.

Davis C, Stirling I, Strobeck C, Coltman W (2008) Population structure of ice-breeding seals. *Molecular Ecology*, **17**, 3078-3094.

de Oliveira L, Meyer D, Hoffman J, Majluf P, Morgante J (2009) Evidence of a genetic bottleneck in an El Niño affected population of South American fur seals, *Arctocephalus australis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **89**, 1717-1725.

de Oliveira L, Hoffman J, Hingst-Zaher E, Majluf P, Muelbert M, Morgante J, Amos W (2008) Morphological and genetic evidence for two evolutionarily significant units (ESUs) in the South American fur seal, *Arctocephalus australis*. *Conservation Genetics*, **9**, 1451-1466.

Di Rienzo A, Peterson A, Garza J, Valdès AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat *loci* in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 3166-3170.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software

package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Feijoo M (2009) Estructura Genética del León marino (*Otaria flavescens*) e implicancias para su conservación en el Atlántico Sur. Tesis de Maestría, Univ. de la República, Facultad de Ciencias, 52 pp.

Franco Trecu V, Bóveda A, Tassinio B, Páez E (2008) Sistema de Apareamiento del Lobo Fino (*Arctocephalus australis*) en Isla de Lobos-Uruguay: Consecuencias en su Conservación. En: *Primer Congreso Latinoamericano de Etología Aplicada* (36). Reunión Regional de la International Society for Applied Ethology América Latina. Montevideo. Uruguay, 6-7 de junio de 2008.

Frankham R, Jonathan D. Ballou DJ, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. New York, Cambridge University Press.

Garza J, Williamson E (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite *loci*. *Molecular Ecology*, **10**, 305-318.

Gemmell N, Allen P, Goodman S, Reeds J, Peter J (1997) Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. *Molecular Ecology*, **6**, 661-666.

Gilpin M, Soulé M (1986) Minimum viable populations: processes of species extinction, en Soulé M *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (19-34). Sunderland, MA, Sinauer Associates.

Ginot F, Bordelais I, Nguyen S, Gyapay G (1996) Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Research*, **24**, 540-541.

Goldsworthy S, Francis J, Boness D, Fleischer R (2000) Variation in the mitochondrial control region in the Juan Fernandez fur seal (*Arctocephalus philippi*). *Journal of Heredity*, **91**, 371-377.

Guerra C, Torres D (1987) Presence of South American fur seal, *Arctocephalus australis*, in northern Chile, en Croxal J, Gentry R *Status, biology and ecology of fur seals. Proceedings of an International Symposium and Workshop. Cambridge, England, 23-27 de april de 1984* (169-176). National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report NMFS 51.

Guo F, Dey D, Holsinger K (2009) A Bayesian hierarchical model for analysis of SNP diversity in multilocus, multipopulation samples. *Journal of the American Statistical Association*, **104**, 142-154.

Hartl D, Clark A (1997) *Principles of Population Genetics*, 3ra ed. Sunderland, Sinauer Associates.

- Higdon J, Bininda-Emonds O, Beck R, Ferguson S (2007) Phylogeny and divergence of the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 216.
- Hoelzel A, Campagna C, Arnborn T (2001) Genetic and morphometric differentiation between island and mainland southern elephant seal populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**, 325-332.
- Hoelzel A, Halley J, O'Brien S, Campagna C, Arnborn T, Boeuf B, Ralls K, Dover G (1993) Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity*, **84**, 443-449.
- Hoffman J, Forcada J, Trathan P, Amos W (2007) Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. *Nature*, **445**, 912-914.
- Hoffman J, Matson C, Amos W, Loughlin T, Bickham W (2006a) Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology*, **15**, 2821-2832.
- Hoffman J, Steinfartz S, Wolf J (2007) Ten novel dinucleotide microsatellite *loci* cloned from the Galápagos sea lion (*Zalophus californianus wollebaeki*) are polymorphic in other pinniped species. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 103-105.
- Hoffman J, Trathan P, Amos W (2006b) Genetic tagging reveals extreme site fidelity in territorial male Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. *Molecular Ecology*, **15**, 3841-3847.
- Hudson R, Boos D, Kaplan N (1992) A statistical test for detecting geographical subdivision. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 138-151.
- Jarne P, Lagoda P (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 424-429.
- Johansson A, Karlsson P, Gyllenstein U (2003) A novel method for automatic genotyping of microsatellite markers based on parametric pattern recognition. *Human Genetics*, **113**, 316-324.
- Kimura M, Crow J (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**, 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1975) Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **72**, 2761-2764.
- Kretzmann M, Gemmill J, Meyer A (2001) Microsatellite Analysis of Population Structure in the Endangered Hawaiian Monk Seal. *Conservation Biology*, **15**, 457-466.
- McConnell B, Fedak M, Lovell O, Hammond P (1999) Movements and foraging areas of grey seals in the North Sea. *Journal of Applied Ecology*, **36**, 573-590.

Miller S, Dikes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.

Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 208-216.

Moritz C (1994) Defining "Evolutionary significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.

Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **349**, 113-118.

Naya D, Arim M, Vargas R (2002) Diet of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay. *Marine Mammal Science*, **18**, 734-745.

Nei M (1977) *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, **41**, 225-233.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 533-590.

Nowak, R (1999) *Walker's mammals of the world*, 6ta ed. Baltimore, John Hopkins U. Press.

Ochoa Acuña H, Francis J (1995) Spring and summer prey of the Juan Fernandez fur seal, *Arctocephalus philippii*. *Canadian Journal of Zoology*, **73**, 1444-1452.

Páez E (2000) Utilización del Bootstrap y análisis de poder en estimaciones de abundancia de cachorros de *Arctocephalus australis*, en Rey M, Amestoy F *Sinopsis de la biología y ecología de las poblaciones de lobos finos y leones marinos de Uruguay. Pautas para su manejo y administración* (55-75). Montevideo, Proyecto URU/92/003, INAPE.

Piry S, Luikart G, Cornuet J (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.

Ponce de León A (2000) Explotación de las loberías en Uruguay, en Rey M, Amestoy F, *Sinopsis de la biología y ecología de las poblaciones de lobos finos y leones marinos de Uruguay. Pautas para su manejo y administración* (28-35). Montevideo, Proyecto URU/92/003, INAPE.

Ponce de León A (1983) Aspectos de la Reproducción, crecimiento intrauterino y desarrollo postnatal del lobo de dos pelos sudamericano, *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1873) en islas de la República Oriental del Uruguay. Tesis Licenciatura, Univ. de la República, Facultad de Humanidades y Ciencias, 93 pp.

Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

Raymond M, Rousset F (1995) genepop (version 1.2): population genetics software

- for exact tests of ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlotterer C (2004) The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, **5**, 63–69.
- Schramm Y, Mesnick S, de la Rosa J, Palacios D, Lowry M, Auriolles-Gamboa D, Snell H, Escorza-Treviño S (2009) Phylogeography of California and Galápagos sea lions and population structure within the California sea lion. *Marine Biology*, **156**, 1375-1387.
- Schultz J, Baker J, Toonen R, Bowen B (2009) Extremely Low Genetic Diversity in the Endangered Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *Journal of Heredity*, **100**, 25-33.
- Slade R, Moritz C, Hoelzel A, Burton H (1998) Molecular population genetics of the southern elephant seal *Mirounga leonina*. *Genetics*, **149**, 1945–1957.
- Slatkin M (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research*, **58**, 167-175.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Stanley H, Casey S, Carnahan J, Goodman S, Harwood J, Wayne R (1996) Worldwide patterns of mitochondrial DNA differentiation in the harbor seal (*Phoca vitulina*). *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 368-382.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits L, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, **24**, 3189-3194.
- Templeton A (2006) *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. New Jersey, Wiley-Liss.
- Thompson D, Moss S, Lovell P (2003) Foraging behaviour of South American fur seals *Arctocephalus australis*: extracting fine scale foraging behaviour from satellite tracks. *Marine Ecology Progress Series*, **260**, 285-296.
- Litt M, Hauge X, Sharma V (1993) Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats — some causes and cures. *Biotechniques*, **15**, 280 et seq.
- Túnez J, Centrón D, Capozzo H, Cassini M (2007) Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mammalian Biology*, **72**, 193-203.

- Valdès A, Slatkin M, Freimer N (1993) Allele frequencies at microsatellite *loci*: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, **133**, 737-749.
- Van Oosterhout C, Hutchinson W, Wills D, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Vaz-Ferreira R (1982) *Arctocephalus australis* Zimmerman, South American fur seal. Mammals in the Seas, FAO, *Fisheries Series*, **4**, 497-508.
- Vaz Ferreira R, Ponce de León A (1984) Estudios sobre *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) lobo de dos pelos sudamericano en el Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Humanidades y Ciencias. *Contribuciones*, **1**, 1-18.
- Vaz Ferreira R, Ponce de León A (1987) South American fur seal, *Arctocephalus australis* in Uruguay, en Croxal J, Gentry R *Status, biology and ecology of fur seals. Proceedings of an International Symposium and Workshop. Cambridge, England, 23-27 de abril de 1984* (29-32). National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report NMFS 51.
- Wahlund S (1928) Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Stadtpunkt der Verebungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, **11**, 65-106.
- Waits L, Paetkau D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, **69**, 1419-1433.
- Weber D, Stewart B, Lehman N (2004) Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). *Journal of Heredity*, **95**, 144-153.
- Weir B, Cardon L, Anderson A, Nielsen D, Hill W (2005) Measures of human population structure show heterogeneity among genomic regions. *Genome Research*, **15**, 1468-1476.
- Weir B, Cockerham C (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Westlake R, O'Corry-Crowe G (2002) Macrogeographic structure and patterns of genetic diversity in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Alaska to Japan. *Journal of Mammalogy*, **83**, 1111-1126.
- Williamson-Natesan E (2005) Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite *loci*. *Conservation Genetics*, **6**, 551-562.
- Wright S (1921) Systems of mating, I-V. *Genetics*, **6**, 111-178.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114-138.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.

Wright S (1965) The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, **19**, 395-420.

Wynen L, Goldsworthy S, Guinet C, Bester M, Boyd IL, Gjertz I, Hofmeyr G, White R, Slade R (2000) Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*). *Molecular Ecology*, **9**, 299-314.

Yonezawa T, Kohno N, Hasegawa M (2009) The monophyletic origin of sea lions and fur seals (Carnivora; Otariidae) in the Southern Hemisphere. *Gene*, **441**, 89-99.

Zhang D, Hweitt G (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, **12**, 563-584.

Zimmerman E Von (1783) Geographische Geschichte des Menschen, und der Allgemeiss Verbreiteten Vierfüssigen Thiere. *Leipzig*, **3**, 1778-1783.