

Tesis de Maestría en Biología- Subárea Genética  
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)  
Facultad de Ciencias- Universidad de la República  
Montevideo- Uruguay

# Análisis de la estructura genética de poblaciones de aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*).

Natalia Mannise

Genética de la Conservación

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientador: Dr. Jesús E. Maldonado

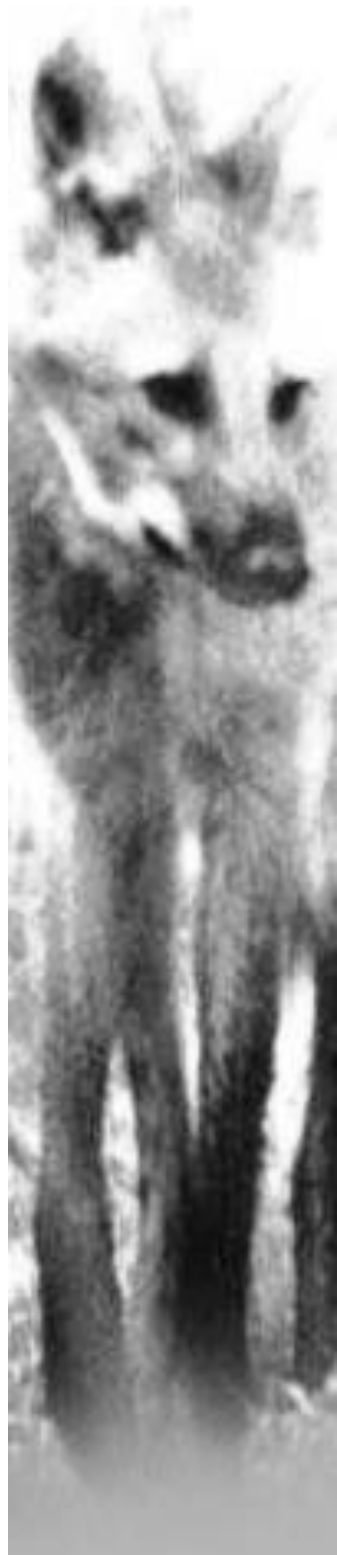
Co-orientadora: Dra. Susana González

Integrantes del Tribunal:

Presidenta: Dra. Graciela García

Vocal: Dra. Silvia Llambí

Vocal: Dr. José Carlos Guerrero



*A la memoria de mi abuelo Manolo*

## **AGRADECIMIENTOS**

Un especial reconocimiento a quienes de diversas maneras colaboraron para la realización de esta tesis:

Al PEDECIBA por la financiación de este trabajo y a la ANII por la beca de maestría, ambos me permitieron disfrutar de este proceso y dedicarle el tiempo necesario.

A mi Co-orientadora la Dra. Susana González por su orientación dedicada y comprometida, guiándome en las distintas etapas y aportando todo lo que estuviera a su alcance. A mi Orientador el Dr. Jesús E Maldonado quien me recibió en su laboratorio, aportó valiosos comentarios y que a pesar de la distancia supo hacerse presente en los momentos más difíciles. A la Dra. Mariana Cosse por su orientación no formal, su disposición para discutir diferentes aspectos y por sus valiosas correcciones, entre muchos otros aportes.

A los miembros del tribunal por sus correcciones y revisión académica de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio “humanos” y “conservacionistas” que hicieron que el trabajo fuera más divertido. A Florencia Grattarola por ayudarme con los mapas y a Sabrina Riverón por su aporte bibliográfico. En especial a Claudia Elizondo y Leticia Repetto por siempre tener una palabra y un consejo.

A todos aquellos que colectaron las muestras: Jorge Cravino, Marcelo Beccaceci, Mauricio Barbanti Duarte, Enrique González, Louise Emmons. A los zoológicos de La Plata, Buenos Aires, National Zoological Park- Smithsonian Institution, Krefeld, Praha, Africam Safari, Belo Horizonte, Riberao Preto y San Pablo.

A Sara Trusty por recibirme en su casa durante mi estancia en Washington DC. A los nuevos amigos que me llevo de este proceso.

A mis amigos de la vida por su paciencia e interés en cada una de las instancias que transcurrí. A mis amigos de la música por comprender mis ausencias y darme siempre un lugar.

A mi madre que siempre confió en mi trabajo y me apoyó en todo el proceso.

A Felipe Montenegro por comprender, confiar, ayudar y sostenerme en los momentos buenos y no tan buenos.

A todos y cada uno de ellos, muchas gracias!

## RESUMEN

El aguará guazú es el cánido más grande de América del Sur, categorizado como cercano a la amenaza por la UICN. Las técnicas de genética molecular son utilizadas para analizar las dinámicas y estructura de poblaciones de especies amenazadas. Los objetivos de nuestro trabajo fueron: i) analizar la estructura genética del aguará guazú mediante loci de microsatélites, incluyendo distintas localidades a lo largo de su distribución geográfica; ii) examinar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco dentro y entre *stocks* cautivos. Para ello se utilizaron muestras de pelo, tejido y feca depositadas en el banco de muestras de los laboratorios de Genética de la Conservación y del *Center for Conservation and Evolutionary Genetics SCBI-National Zoological Park-Smithsonian Institution*. A partir del ADN extraído se amplificaron por PCR multiplex 12 loci de microsatélites aislados para perro doméstico. En conjunto, los microsatélites analizados tienen un alto contenido de información polimórfica ( $PIC=0,699$ ) y valores de probabilidad de no exclusión adecuados ( $NE-I=3,88 \times 10^{-13}$ ,  $NE-SI=4,66 \times 10^{-5}$ ,  $NE-PP=2 \times 10^{-8}$ ). Esto sugiere que pueden ser utilizados tanto para análisis de estructura genética poblacional como para identificación individual y asignación de parentesco. Mediante el análisis Bayesiano realizado en el *software* STRUCTURE se detectó la presencia de estructura genética en poblaciones silvestres. El número más probable de grupos fue dos, uno conformado por individuos exclusivamente de Bolivia y el otro por individuos de distintas localidades (ejemplares de Uruguay, Argentina, Brasil e incluso siete animales de Bolivia). Estos resultados son congruentes con los obtenidos a partir del Análisis Factorial de Correspondencia y el índice  $F_{ST}$  que reveló diferenciación genética entre los dos grupos ( $F_{ST}= 0,19$ ). El número de migrantes por generación entre ambos grupos fue de 1,364, el cual resulta apropiado para mantener la conectividad entre ambos. Las muestras de Bolivia en su mayoría fueron de fecas (81%) por lo tanto era posible que un mismo individuo haya sido re-muestreado. Mediante el análisis de identidad se detectaron 23 individuos muestreados en Bolivia y por el método de Captura-Recaptura se estimó un tamaño poblacional de 51 animales. A través del coeficiente de parentesco se identificaron posibles grupos familiares en Argentina, Bolivia y Uruguay. Se utilizó como control positivo un grupo familiar de animales en cautiverio del *Smithsonian Conservation Biology Institute*, Front Royal, constituido por cuatro hermanos y sus respectivos padres. Los genotipos asignados para cada individuo fueron consistentes con las relaciones de parentesco entre ellos. El total de los individuos en cautiverio presentaron una alta variabilidad genética, siendo Brasil el *stock* con mayor diversidad. El grupo familiar de EUA (Front Royal) presentó una fuerte diferencia genética con los demás grupos. Se identificaron dos hembras como posibles candidatas reproductoras en cautiverio, así como también dos posibles parejas para mantener la diversidad genética y evitar la consanguinidad. Para analizar la estructura genética poblacional eliminando sesgos muestrales e identificar Unidades de Manejo se deberían aumentar los esfuerzos de muestreo tanto en las localidades incluidas en esta tesis, así como también en otros sitios de su rango de distribución.

## ABSTRACT

The maned wolf is the largest South American canid species categorized as near threatened in the IUCN Red List. Molecular genetic techniques are used to analyze dynamics and structure of threatened species populations. Our objectives were: i) to analyze the genetic structure of maned wolf using microsatellite loci, including different localities along their geographical distribution, ii) to examine genetic variability and kinship relations within and between captive stocks. We used hair, tissue and feces from the samples collection of the *Conservation Genetics Laboratory* and the *Center for Conservation and Evolutionary Genetics SCBI-National Zoological Park, Smithsonian Institution*. From extracted DNA 12 microsatellite loci, isolated for domestic dog, were amplified by multiplex PCR. The set of loci showed high polymorphic information content (PIC=0.699) and appropriate values for non-exclusion probability (NE-I= $3.88 \times 10^{-13}$ , NE-SI= $4.66 \times 10^{-5}$ , NE-PP= $2 \times 10^{-8}$ ). This suggests that they have enough power to achieve studies on population genetic structure, individual identity and kinship. Genetic structuring was detected in wild populations using Bayesian analysis performed by the software STRUCTURE. The most likely number of genetic clusters was two; one of them included samples exclusively from Bolivia and the other one included samples from different localities (Uruguay, Bolivia, Argentina, Brazil). These results are congruent with those obtained from Correspondence Factor Analysis, furthermore structuring index  $F_{ST}$  revealed a strong difference between the two groups ( $F_{ST}=0.19$ ). Gene flow (1.364 migrants per generation) was found between the two clusters revealing connectivity for maintaining genetic variability, local adaptation and inbreeding avoidance. Bolivian samples were mostly feces (81%) so it would be possible that the same individual has been re-sampled. From identity analysis we detected 23 individuals sampled in Bolivia and from Capture-Recapture method we estimated a population size of 51 animals. Kinship analysis revealed family groups in the Uruguayan, Bolivian and Argentinean samples. A family group of animals in captivity in the Smithsonian Conservation Biology Institute- Front Royal, consisting of four siblings and their parents, was used as a positive control. The genotypes assigned for each individual were consistent with the relationships among them. The total number of individuals in captivity showed high genetic variability, with Brazil being the most diverse stock. The U.S. family group (Front Royal) showed strong genetic differences with the other groups. Two females were identified as potential candidates for captive breeding, as well as two possible couples to maintain genetic diversity and avoid inbreeding. It is extremely important to increase sampling efforts to deeply understand their genetic dynamics and patterns of population sub structuration.

## CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los cánidos sudamericanos	1
1.2. El aguará guazú	4
1.2.1. Características de la especie	4
1.2.2. Situación de Conservación	7
1.3. Marcadores genéticos hipervariables	8
1.4. Antecedentes genéticos	10
1.5. Unidades de conservación y manejo	13
1.6. Conservación <i>ex situ</i>	14
1.7. Justificación del problema a abordar	16
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES y MÉTODOS	19
4.1. Obtención de las muestras	19
4.2. Aislamiento de ADN y amplificación por PCR	19
4.3. Análisis de muestras de animales de poblaciones silvestres	23
4.3.1. Caracterización de los loci de microsatélites	23
4.3.2. Número de individuos muestreados en Bolivia y tamaño poblacional estimado	27
4.3.3. Estructura genética poblacional	29
4.4. Análisis de muestras de <i>stocks</i> de cautiverio	34
4.4.1. Diversidad génica y diversidad interna	35
4.4.2. Coeficientes de coancestría molecular y parentesco	35
4.4.3. Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad observada y esperada	36
4.4.4. Estadísticos $F$ y coeficiente de endogamia individual	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Análisis de poblaciones silvestres	38
5.1.1. Caracterización de loci de microsatélites	38
5.1.2. Número de individuos muestreados en Bolivia	40
5.1.3. Estructura genética y caracterización de loci de microsatélites	41
5.1.4. Estructura genética poblacional	46
5.2. Análisis de los <i>stocks</i> en cautiverio	52
5.2.1. Diversidad génica y diversidad interna	54
5.2.2. Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad observada y esperada	55
5.2.3. Coeficientes de coancestría molecular, endogamia individual y parentesco	55
5.2.4. Estadísticos $F$	61
6. DISCUSIÓN	63
6.1. Análisis de poblaciones silvestres	63
6.2. Análisis de los <i>stocks</i> en cautiverio	72
6.3. Implicancias para la Conservación	78
7. CONCLUSIONES	80
8. PERSPECTIVAS	82
9. BIBLIOGRAFÍA	84
10. ANEXOS	98

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I	22
Tabla II	39
Tabla III	40
Tabla IV	40
Tabla V	44
Tabla VI	44
Tabla VII	45
Tabla VIII	46
Tabla IX	47
Tabla X	48
Tabla XI	50
Tabla XII	50
Tabla XIII	51
Tabla XIV	52
Tabla XV	53
Tabla XVI	54
Tabla XVII	55
Tabla XVIII	57
Tabla XIX	58
Tabla XX	59
Tabla XXI	60
Tabla XXII	60
Tabla XXIII	61
Tabla XXIV	62

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	3
Figura 2	4
Figura 3	5
Figura 4	7
Figura 5	20
Figura 6	41
Figura 7	42
Figura 8	43
Figura 9	49

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	98
Anexo 2	99
Anexo 3	101
Anexo 4	102
Anexo 5	104
Anexo 6	105

## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

A	Amperio
ADN	Ácido Desoxiribo Nucleico
AZA	Asociación de Zoológicos y Acuarios
CITES	Convención Internacional para el Tráfico y Comercio de Especies Amenazadas
cm	Centímetro
dNTP	Desoxinucleótido Trifosfato
EUA	Estados Unidos de América
ESU	<i>Evolutionarily Significant Unit</i>
$f$	Coefficiente de coancestría molecular
$F_i$	Coefficiente de endogamia individual
$F_{IS}$	Coefficiente de endogamia de los individuos en una subpoblación
$F_{IT}$	Coefficiente de endogamia global
FS	<i>Full Sibling</i>
$F_{ST}$	Coefficiente de diferenciación genética entre subpoblaciones
$f_{prom}$	Promedio del Coeficiente de coancestría molecular de cada individuo
$f_{prom}$ Stock	Promedio del Coeficiente de coancestría molecular de cada individuo con respecto a su <i>stock</i>
GD	<i>Gene Diversity</i>
H	Heterocigosidad
HS	<i>Half Sibling</i>
H-W	Hardy- Weinberg
K	<i>Clúster</i>
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
km <sup>2</sup>	Kilómetro cuadrado
kV	Kilovoltio
ma	Millones de Años
mA	Miliamperio
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
MU	<i>Management Unit</i>
MWSSP	<i>Maned Wolf Species Survival Plan</i>
NE-I	<i>Non-Exclusion probability (identity)</i>
NE-SI	<i>Non-Exclusion probability (sib identity)</i>
NE-PP	<i>Non-Exclusion probability (parent pair)</i>
ng	Nano gramo
nm	Nanómetro
Nm	Tasa de flujo génico
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIC	<i>Polymorphic Information Content</i>
pM	Pico Molar
PO	<i>Parent-Offspring</i>
r	Coefficiente de parentesco
SCBI	<i>Smithsonian Conservation Biology Institute</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
V	Voltios
°C	Grados Centígrados
μl	Micro litro



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los cánidos sudamericanos

El origen de los cánidos ocurrió durante el Eoceno tardío en América del Norte, basado en el registro fósil. En dicho continente, ocurrieron sucesivos eventos de radiación que dieron lugar a tres subfamilias durante el Oligoceno tardío: Hesperocyoninae, Borophaginae y Caninae (Wang *et al.*, 2004; Perini *et al.*, 2010). Esta última es la única subfamilia sobreviviente y está integrada por 36 especies que se distribuyen en todo el mundo (Perini *et al.*, 2010).

En América del Sur actualmente se encuentra la mayor diversidad de Caninae incluyendo seis géneros y diez especies reconocidas (Wozencraft, 1992). La monofilia de los cánidos sudamericanos ha sido un asunto controvertido, dado que los taxa vivientes se encuentran distribuidos en cinco géneros distintos y las especies son morfológicamente muy distintas (Wayne *et al.*, 1997). En el presente, no sólo se ha confirmado la monofilia del grupo sino que se han constatado dos linajes: uno compuesto por *Chrysocyon/Speothos* y el otro integrado por los géneros *Lycalopex/Cerdocyon/Atelocynus* (Wayne *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2009; Perini *et al.*, 2010) (Fig. 1). Según Perini *et al.* (2010) la divergencia de *Chrysocyon/ Speothos* habría ocurrido hace 3 millones de años (ma), mientras que *Lycalopex/Cerdocyon/Atelocynus* se infiere que sucedió hace aproximadamente 2,4 ma (Fig. 1). Sin embargo el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus* Illigeri, 1811) y el cachorro do mato do vinagre (*Speothos venaticus* Lund, 1842) aparecen en el registro fósil del Pleistoceno de América del Sur, hace un millón de años aproximadamente (Berta, 1984; Wayne *et al.*, 1997). Por otro lado, se han encontrado fósiles asignados a los géneros *Cerdocyon* y *Chrysocyon* en Norteamérica antes de la formación del Istmo de Panamá (2,7–3,6 ma), sugiriendo que la diversificación de los cánidos sudamericanos habría ocurrido antes del Gran Intercambio Americano (Wayne *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2009; Perini *et al.*, 2010). Estos restos fósiles fragmentarios poseen una dentición más generalizada y debido a que no se conocen huesos del post-cráneo no se ha

podido evaluar la extrema adaptación que poseen las formas actuales. De esta manera, representarían miembros basales de cada linaje y podrían no estar directamente relacionados con las formas actuales de ambos géneros (Perini *et al.*, 2010). La presencia de restos fósiles en Norteamérica apoya la hipótesis de que distintos linajes habrían invadido el territorio sudamericano (Wayne *et al.*, 1997). De acuerdo a la filogenia de las especies vivientes, fueron necesarias al menos dos invasiones a América del Sur.

A su vez, el análisis de la divergencia entre las secuencias de ADN mitocondrial de *Chrysocyon* y *Speothos*, sugiere que tendrían que haber ocurrido tres invasiones (Wayne *et al.*, 1997).

Además, la filogenia construida por Perini *et al.* (2010) a partir de datos morfológicos y moleculares de las especies actuales y extintas, permite ver que el clado *Chrysocyon/Speothos* también contiene formas extintas hiper-carnívoras del Pleistoceno como lo son *Theriodictis* y *Protocyon* (Fig. 1).

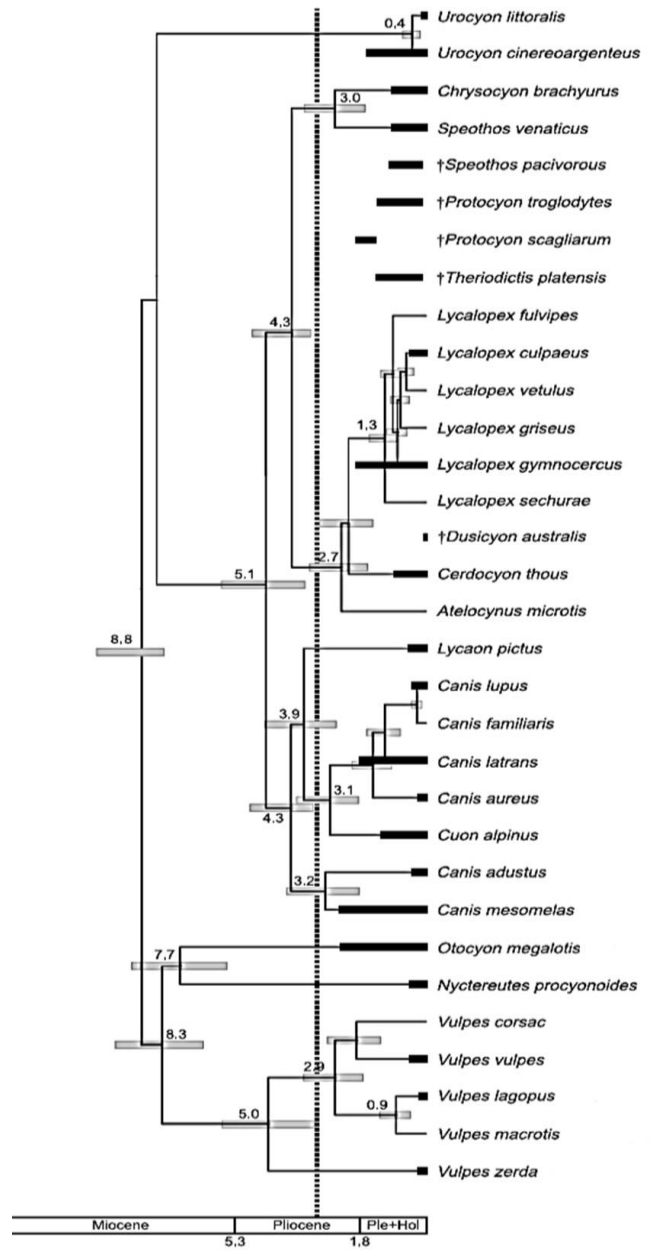


Figura 1: Escala de tiempo de diversificación de Canidae y filogenia del grupo modificada de Perini *et al.* (2010). Las barras en los nodos indican el 95% de probabilidad de la densidad más alta en el intervalo de tiempo estimado. La barra gruesa representa la ventana temporal del registro fósil para la especie estudiada. La línea punteada indica la formación del Istmo de Panamá.

## 1.2. El aguará guazú

### 1.2.1. Características de la especie

Existen diversas leyendas indígenas acerca de los poderes inexplicables de este animal (Azara, 1802; Dietz, 1984). Variadas partes de su anatomía servían como ingredientes en la medicina popular de algunas culturas nativas (Azara, 1802; Dietz, 1984). Entre los mitos sudamericanos sobre cómo el hombre entró en posesión del fuego aparece la leyenda del pescador desposeído. Ésta cuenta que en las nacientes del río Xingú (Mato Grosso, Brasil) el dueño del fuego es, en algunos casos, el aguará guazú (Blixen, 1992). Estos relatos lo cargan de valor cultural en los legajos de los pueblos sudamericanos originarios.

El aguará guazú *Chrysocyon brachyurus* es el cánido más grande de América del Sur ya que puede alcanzar aproximadamente 90 cm de altura a la cruz (Dietz, 1985). Los individuos adultos pueden pesar 20-30 kg y presentar un largo total de 147 cm, incluyendo la cola (Dietz, 1985; Paula *et al.*, 2008). Se diferencia de otros cánidos por sus patas largas y delgadas, así como también por su pelaje dorado-rojizo, presentando coloración negra en la parte inferior de sus patas y en la porción dorsal de su lomo (Dietz, 1984) (Fig. 2). La región interna de cuello y orejas así como también la parte distal de su cola son de color blanco (Paula *et al.*, 2008). Su cabeza es similar a la de un zorro, con un hocico puntiagudo y orejas extraordinariamente largas (Emmons, 2012).



Figura 2: Ejemplares de aguará guazú. Las imágenes fueron tomadas de internet.

Estos cánidos poseen hábitos nocturnos con picos de actividad durante el crepúsculo (Dietz, 1984; Bandeira de Melo *et al.*, 2007). Presentan un sistema de apareamiento de tipo monogamia facultativa (Rodden *et al.*, 2004). Los individuos de la pareja defienden territorios de aproximadamente 27 km<sup>2</sup> (Dietz, 1985) permaneciendo espacialmente relacionados durante el día y evitándose durante la caza nocturna (Bandeira de Melo *et al.*, 2007). El celo de las hembras es anual y se extiende por aproximadamente unos cinco días. La época reproductiva va de abril a junio y el período de gestación generalmente tiene una duración de 65 días. La mayoría de los nacimientos ocurren de junio a setiembre y el tamaño de la camada es de tres cachorros en promedio. Las crías son de color oscuro y permanecen en el área de vida de la madre hasta el año de vida, momento en el cual comienzan a dispersar. Al mismo tiempo los juveniles alcanzan la madurez sexual, pero usualmente no se reproducen hasta el segundo año (Rodden *et al.*, 2004).

Otro rasgo distintivo de la especie son sus huellas, en las cuales las almohadillas del tercer y cuarto dígito están unidas en su extremo proximal formando una figura única (Fig. 3). Su modo de caminar tan particular está dado por sus piernas largas y espalda corta, además las piernas del mismo lado del cuerpo se mueven juntas en el mismo sentido (Dietz, 1985; Emmons, 2012).



Figura 3: Detalle de la almohadilla plantar delantera (izquierda) y de la huella (derecha). Fotografías tomadas de internet.

Los principales componentes de su dieta van desde frutos hasta pequeños mamíferos y aves, de esta manera se lo considera omnívoro generalista (Dietz, 1984). Los diversos estudios indican que en su dieta se encuentra una amplia variedad de material vegetal y animal, siendo ambos consumidos en igual proporción (Rodden *et al.*, 2004; Queirolo & Motta-Junior, 2007). Se ha constatado que el fruto *Solanum lycocarpum* (conocido como lobeira) es una fuente primaria de alimento para ellos (Rodrigues, 2002; Rodden *et al.*, 2004; Queirolo & Motta-Junior, 2007). El éxito de germinación de las semillas de la lobeira es significativamente mayor cuando pasa por el tracto digestivo del aguará guazú, además éstas son dispersadas largas distancias. Dado que al parecer sus compuestos secundarios son antihelmínticos, el fruto tiene otro beneficio además del nutricional para este cánido (Courtenay, 1994). Por otro lado, entre los ítems animales más frecuentes están los roedores, marsupiales y aves (Rodrigues, 2002; Rodden *et al.*, 2004). Si bien los animales mayormente consumidos son de pequeño y mediano porte, eventualmente se puede alimentar de venados y oso hormiguero grande (Dietz, 1984; De Almeida Jácomo, 1999; Rodrigues, 2002; Rodden *et al.*, 2004).

La especie habita áreas abiertas caracterizadas por pastizales, malezales y bosques de galería en las regiones de Cerrado, Chaco y Pampa (Dietz, 1985; Queirolo *et al.*, 2011). La longitud de sus patas es un rasgo adaptativo al ambiente en el que vive ya que le permite una eficiente visión y traslado en vegetaciones altas (Dietz, 1984). La distribución actual de la especie incluye regiones de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay (Fig. 4B), aunque actualmente debido a presiones antrópicas ha sufrido una gran retracción en su límite sur (Paula *et al.*, 2008; Queirolo *et al.*, 2011). A su vez, se ha documentado una reciente expansión poblacional en el límite este de su área de distribución, posiblemente debido a la deforestación de la selva atlántica (Paula *et al.*, 2008; Queirolo *et al.*, 2011).

Se han realizado estudios de su distribución histórica, actual potencial y futura (Fig. 4). Durante la colonización europea el rango de la especie alcanzaba hasta los 37°-39° Sur en Argentina, estaba presente en la mayor

parte de Rio Grande do Sul (Brasil) y ocupaba todo el territorio uruguayo (Queirolo *et al.*, 2011). Hacia el oeste se extendía hasta los departamentos de Beni y Santa Cruz en Bolivia, mientras que alcanzaba el sureste de Perú (Queirolo *et al.*, 2011). Mediante el uso de distintos modelos se ha identificado que la temperatura y la precipitación son las variables climáticas que influyen en mayor medida a la distribución de esta especie (Prevosti *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2013). De esta manera, su distribución potencial abarca la región centro-este de Brasil, noreste de Bolivia y Argentina, centro de Paraguay, oeste de Uruguay, este y centro de Perú (Torres *et al.*, 2013). Por otro lado, según las predicciones, dentro de 40 años el área que ocuparía el aguará guazú sería muy similar a la actual, con una zona estable localizada en el centro de América del Sur con retracciones ubicadas principalmente en el norte de la misma (Torres *et al.*, 2013).

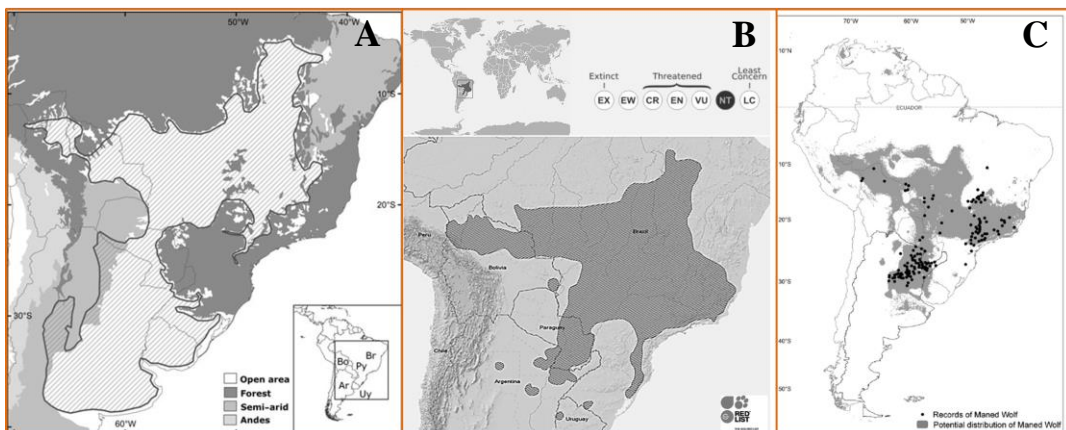


Figura 4: Distribuciones histórica (A), actual (B) y potencial (C) para el aguará guazú. Los mapas de la distribución histórica y potencial fueron tomados de Queirolo *et al.* (2011) y Torres *et al.* (2013) respectivamente; mientras que el actual fue modificado de Rodden *et al.* (2008).

### 1.2.2. Situación de Conservación

En la actualidad, se ha identificado que el principal riesgo para su conservación es la drástica reducción de ambientes naturales favorables para la supervivencia de sus poblaciones. Esta amenaza se vuelve aún mayor al observar que grandes áreas de su distribución se han convertido en zonas agropecuarias (Paula *et al.*, 2008). De esta manera ha sido clasificado como

“Cercano a la amenaza” por la UICN, con un número estimado de ~13, 000 individuos maduros en la población global, la cual probablemente sufra una reducción del 10% durante la próxima década (Rodden *et al.*, 2008). También está incluida en el Apéndice II de CITES (González & Martínez, 2010).

En Uruguay existen pocos registros actuales y es considerada amenazada (Achaval *et al.*, 2004; González & Martínez, 2010). En nuestro país, uno de sus límites sur de su distribución, *C. brachyurus* estaba considerado extinto hasta la captura de manera casual en 1989 de un ejemplar macho adulto en el departamento de Río Negro (Mones & Olazarri, 1990). A su vez, en el 2006, en el departamento de Cerro Largo, se constató su último registro (Queirolo *et al.*, 2011; Mannise *et al.*, 2012). Por otro lado, se han encontrado huellas características de la especie en el departamento de Rocha (Prigioni & Sappa, 2003).

En Argentina y Paraguay se considera que el declive poblacional de la especie fue debido a la persecución y caza, mientras que en Brasil la mortalidad potencial debida a atropellamientos es la amenaza más importante (Paula *et al.*, 2008). Por lo tanto se la cataloga como En Peligro en Argentina y Vulnerable en Brasil, estimándose la presencia de 660 y 21746 individuos en cada país respectivamente (Soler *et al.*, 2005; Paula *et al.*, 2008; González & Martínez, 2010).

### 1.3. Marcadores genéticos hipervariables

Los microsatélites son marcadores genéticos nucleares de locus simple, que consisten en repetidos en tándem de secuencias entre dos y seis pares de bases de largo. Análisis genealógicos han revelado que son co-dominantes y de herencia mendeliana (Jarne & Lagoda, 1996). Están presentes tanto en regiones codificantes como no codificantes y usualmente se caracterizan por un alto grado de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002). Sus alelos difieren en el número de estas unidades repetidas, siendo los repetidos de di, tri y tetranucleótidos los más utilizados (Queller *et al.*, 1993; Jarne & Lagoda, 1996). El reino animal es rico en repetidos CA mientras que en genomas vegetales son más frecuentes GA y TA. Los trinucleótidos han sido estudiados



en relación a algunas enfermedades humanas y pueden ser encontrados en exones (Jarne & Lagoda, 1996). Esto hace que los repetidos de tres nucleótidos sean menos utilizables en estudios de genética poblacional. Se destaca la presencia de GATA y GACA en los tetranucleótidos, que son altamente polimórficos (Jarne & Lagoda, 1996). Si bien aún está en debate el origen de tales repetidos (polimorfismos), parece más probable que ocurran por el deslizamiento (*slippage*) de la polimerasa durante la replicación del ADN (Schlötterer & Tautz, 1992). Algunos errores son corregidos por la maquinaria de reparación del ADN, pero otros escapan de estos mecanismos generándose mutaciones. La inestabilidad de estos repetidos simples representaría el balance entre errores que ocurren durante la replicación y la corrección de los mismos (Eisen, 1999; Li *et al.*, 2002).

Su alta tasa mutacional ( $10^{-2}/10^{-6}$  eventos por locus por generación) posibilita que se encuentren múltiples alelos por locus, este alto nivel de polimorfismo permite que puedan ser empleados para realizar inferencias acerca de eventos genético poblacionales recientes. En la bibliografía se pueden encontrar diversos modelos mutacionales que subyacen a la evolución de los microsatélites (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). En un extremo se encuentran el modelo de alelos infinitos (IAM), en el cual cada evento mutacional genera un alelo nuevo (cuyo tamaño es independiente del alelo del progenitor). En el otro el modelo de mutación de un paso (SMM), en donde la adición o pérdida de repetidos crea un alelo nuevo (Selkoe & Toonen 2006). A su vez el modelo de dos fases (TPM) deriva del SMM y fue desarrollado para considerar una mayor proporción de eventos mutacionales (Di Rienzo *et al.*, 1994; Balloux & Lugon-Moulin, 2002). El debate sobre cuál modelo prevalece continúa aun vigente (Ellegren, 2004).

Los loci de microsatélites se caracterizan por ser rápida y fácilmente tipificables mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), para la mayoría de las especies que son examinadas por primera vez es necesario aislarlos *de novo* (Zane *et al.*, 2002). Esto último implica la construcción y análisis de librerías genómicas, secuenciación de ADN y diseño de cebadores, lo cual puede ser obviado utilizando cebadores diseñados en especies filogenéticamente

relacionadas. La amplificación cruzada o interespecífica (*cross-amplification*) de microsatélites es posible gracias a la existencia de regiones conservadas flanqueantes a la región hipervariable, sobre las cuales se diseñan los cebadores (Moore *et al.*, 1991).

En la bibliografía se han encontrado varios trabajos de *C. brachyurus* en los que utilizaron loci de microsatélites aislados para perro doméstico (Franco Berriel, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006; Bruzzi Lion, 2007; Salim *et al.*, 2007; Da Fontoura-Rodrigues *et al.*, 2008; Bruzzi Lion *et al.*, 2011; do Passo Ramalho, 2011). La mayoría de los loci testeados en aguará guazú resultaron polimórficos, excepto CSSM-038 que exhibió un único alelo (Anexo 1). Incluso algunos loci fueron utilizados en más de un estudio de genética de poblaciones para la especie, reflejando el poder de éstos (Anexo 1).

Dado que los microsatélites presentan una alta variabilidad intraespecífica, proveen una elevada resolución en análisis de estructura y dinámica poblacional (Lacey *et al.*, 1999). Son apropiados para estudios de parentesco, endogamia, jerarquías genealógicas, migración, flujo génico, biología forense, mapeo genético y para identificar unidades de conservación (Wayne & Morin, 2004).

#### 1.4. Antecedentes genéticos

El número de cromosomas de *C. brachyurus* es  $2n=76$ , el cual es muy cercano a aquél que exhiben los ejemplares del género *Canis* ( $2n=78$ ) (Rodden *et al.*, 2004). Por otro lado, un estudio filogenético reveló que esta especie constituye un clado monofilético junto con el cachorro do mato vinagre (*Speothos venaticus*) y el zorro-lobo extinto de las islas Malvinas (*Dusicyon australis*), que se diferencia de los restantes cánidos sudamericanos (Slater *et al.*, 2009). Esto refleja cuán singular y distinto genéticamente es el aguará guazú en comparación con otros cánidos sudamericanos.

Se evaluó la variabilidad genética de la especie utilizando dos fragmentos de ADN mitocondrial (*citocromo b* y *D-loop*) en muestras de distintas localidades abarcando gran parte de su distribución geográfica (Franco Berriel, 2004). La escasa diversidad genética encontrada en la región de *citocromo b* (*Cit. b*)

está dada por la baja tasa de mutación que presenta la misma (Franco Berriel, 2004), sin embargo, para el fragmento de la región control (*D-loop*) se encontró una mayor diversidad. Los resultados en el fragmento *D-loop* sugieren que la población de Argentina sería la más variable (Franco Berriel, 2004). En otro trabajo, se encontró que la especie exhibió el índice de diversidad nucleotídica más bajo entre los carnívoros para la región control del ADN mitocondrial (Prates, 2008). A partir de los resultados obtenidos en cinco intrones y dos regiones codificantes del ADN mitocondrial, se comprobó que la baja diversidad genética se encuentra distribuida en todo el genoma y, por consiguiente, refleja un evento demográfico (Prates, 2008). A pesar de ello, la variabilidad genética encontrada utilizando microsatélites en muestras colectadas en Brasil es comparable a la hallada en otros cánidos (Rodrigues *et al.*, 2006; Salim *et al.*, 2007). Esto refleja la presencia de dos escenarios, uno del pasado reciente dado por las secuencias de ADN mitocondrial y otro actual representado por los loci de microsatélites (Prates, 2008).

Estudios de genética poblacional en aguará guazú empleando el marcador *D-loop* evidenciaron una rápida expansión poblacional luego de la glaciación pleistocénica (Prates, 2008; González *et al.*, 2009). Durante este período glacial, fueron detectadas fluctuaciones de temperatura y humedad (Salgado-Labouriau *et al.*, 1997) y por lo tanto cambios en el ambiente, generando así pérdida de hábitat para la especie. Esto habría producido extinciones, desencadenando un cuello de botella en las poblaciones de este cánido (Prates, 2008; González *et al.*, 2009). A finales del Pleistoceno- comienzos del Holoceno se registra un aumento de la temperatura, tornando el hábitat asequible, en donde las poblaciones habrían experimentado una rápida expansión (Prevosti *et al.*, 2004; González *et al.*, 2009). Durante el Holoceno se registran al menos tres eventos que podrían ser favorables para la expansión del área de distribución de esta especie (Prevosti *et al.*, 2004). El período previo al actual pudo representar el último episodio de expansión en la distribución del aguará guazú (Prevosti *et al.*, 2004).

Cuando una especie sufre un proceso de retracción y posterior expansión se registra una pérdida de variabilidad genética como aquella detectada en el análisis realizado con *D-loop* en poblaciones de aguará guazú (Prates, 2008; González *et al.*, 2009).

Da Fontoura-Rodrigues *et al.* (2008) examinaron el potencial de un conjunto de 9 loci de microsatélites aislados para perro doméstico (Francisco *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 2000), con la finalidad de visualizar su utilidad en estudios poblacionales y evolutivos en cánidos neotropicales. Por otro lado, Bruzzi Lion (2007) y Bruzzi Lion *et al.* (2011), analizaron la diversidad genética y estructuración poblacional analizando muestras de fecas y sangre colectadas en 3 de las principales Unidades de Conservación del Distrito Federal de Brasil (Brasilia), empleando cinco loci microsatelitales aislados para perro doméstico (FH2004, FH2010, FH2054, FH2088 y FH2132). En este último estudio no se encontró estructuración poblacional (Bruzzi Lion, 2007; Bruzzi Lion *et al.*, 2011). Incluso se llevó a cabo un trabajo en San Pablo (en la Estación Ecológica de Jataí) a partir de muestras no invasivas (do Passo Ramalho, 2011). En este último se identificó el número de individuos de aguará guazú muestreados por el método de captura-recaptura, mediante la amplificación de siete loci de microsatélites diseñados para perro doméstico (do Passo Ramalho, 2011). Por otro lado, el trabajo de De Mattos *et al.* (2004) utilizando marcadores proteicos reveló la ausencia de endogamia y estructuración genética en un área al noreste del estado de San Pablo.

Recientemente se han utilizado marcadores moleculares (*Cit. b* y *D-loop*) para analizar las muestras colectadas en Uruguay. Dos muestras corresponden a ejemplares cazados en Cerro Largo y Río Negro y una feca colectada en el sitio de caza del ejemplar de Cerro Largo. Los resultados que obtuvimos con *D-loop* revelaron que estas muestras retienen diversidad genética, ya que se encontraron haplotipos distintos para las tres muestras (Mannise *et al.*, 2012).

### 1.5. Unidades de conservación y manejo

El empleo de marcadores neutrales ha sido un foco de interés y desarrollo para la genética de la conservación de los últimos años (Hedrick, 2001). Han sido utilizados para identificar especies, unidades evolutivas significativas (ESUs), unidades de manejo (MUs; del inglés Management Units) e individuos. Marcadores genéticos altamente variables, como los microsatélites, han permitido la cuantificación de patrones que no son aparentes con otros marcadores (Hedrick, 2001).

Para diseñar planes de conservación es esencial conocer detalladamente la estructura genealógica de una población y cómo influyen aspectos comportamentales y demográficos en la misma (Wayne & Morin, 2004). En una aproximación primaria para definir unidades de conservación es apropiado el uso de datos moleculares, ya que proveen información acerca de la historia poblacional y de la distribución actual de diversidad genética (Moritz, 1995). Las unidades de manejo (MUs) representan poblaciones demográficamente independientes, que son diagnosticadas como tales presentando divergencia en sus frecuencias alélicas (Moritz, 1999).

Las MUs son los componentes ecológicos de las unidades evolutivas significativas (ESUs) y pueden ser manejadas (Moritz, 1999). Las ESUs representan un mayor elemento de diversidad dentro de especies siendo de interés para la conservación (Moritz, 1999). Dado que pueden ser usadas para abordar cuestiones de estructura poblacional actual, el reconocimiento de las MUs es fundamental para un manejo a corto plazo de las más inclusivas unidades evolutivas significativas (Moritz, 1994). Ambos aspectos no deben ser considerados como entidades separadas cuando se busca conservar la mayor Unidad Evolutiva Significativa (Moritz, 1999).

La delimitación de MUs requiere la estimación de la tasa de dispersión entre poblaciones. Durante la última década, ha aumentado sustancialmente el uso de análisis genéticos de poblaciones para inferir si las mismas constituyen una única MU (Palsbøll *et al.*, 2006). La divergencia genética entre poblaciones está dada por el número de migrantes por generación, o sea flujo génico. Estas estimaciones de dispersión pueden realizarse por métodos

genéticos de captura-recaptura de individuos o a través del análisis de la distribución de organismos cercanamente emparentados. Otros métodos dividen las muestras colectadas en *clústers* eludiendo así la necesidad de una separación *a priori*. Sin embargo, antes de asignar MUs a cada *clúster* se debe estimar el grado de divergencia entre los grupos de muestras resultantes (Palsbøll *et al.*, 2006).

#### 1.6. Conservación *ex situ*

Es creciente el número de taxones amenazados, teniendo éstos que sobrevivir en ambientes cada vez más modificados por el hombre. Dado el escenario actual no será posible asegurar la supervivencia de especies amenazadas sin la utilización de diversas técnicas y aproximaciones (IUCN, 2002). En consecuencia, el rol de los zoológicos ha cambiado y actualmente contribuyen a la conservación, investigación científica y educación (Witzenberger & Hochkirch, 2011).

Una de las principales metas de los programas de cría en cautiverio es la preservación de la máxima variabilidad genética dentro de una especie. La disponibilidad de marcadores altamente variables, en particular los microsatélites, ha llevado a un creciente número de estudios sobre la estructura genética de las poblaciones en cautiverio (Witzenberger & Hochkirch, 2011).

En una reciente revisión acerca de genética de la conservación *ex situ*, se desarrollaron una serie de recomendaciones para los estudios moleculares en programas de cría en cautiverio de animales amenazados. En primer lugar, para obtener información acerca de la variabilidad genética y sobre la identidad de unidades de manejo, se sugiere la ejecución de análisis genéticos en poblaciones silvestres (Witzenberger & Hochkirch, 2011). Por otro lado, si bien los análisis estadísticos dependen de los objetivos de la investigación, algunas medidas estándar deberían estar presentes en cualquier estudio genético *ex situ*. Esto es particularmente cierto para la heterocigosidad observada y esperada, así como también los coeficientes de endogamia tanto a partir de datos moleculares como a partir de genealogías

(Ruiz-López *et al.*, 2009; Witzemberger & Hochkirch, 2011). Otras medidas que deberían ser tenidas en consideración incluyen el tamaño de la población en cautiverio y el número de individuos fundadores. También es recomendable calcular el tamaño efectivo poblacional (Witzemberger & Hochkirch, 2011).

En 1985 el aguará guazú fue incorporado al programa de supervivencia de especies de la asociación de zoológicos y acuarios (AZA). Las metas del plan para *C. brachyurus* (MWSSP; del inglés Maned Wolf Species Survival Plan) son: mantener una población cautiva auto sostenible en Norteamérica, potenciar el bienestar y la salud de los animales alojados en zoológicos de América del Norte y promocionar la conservación de la especie a través de iniciativas educativas y conservacionistas. Desde su creación, el MWSSP y sus instituciones asociadas han participado u otorgado financiamiento para apoyar estudios sobre dieta y biología reproductiva del aguará guazú. En este sentido, se ha recabado información relevante para comprender aspectos de la biología de la especie y cómo ésta responde a cambios ambientales relacionados con las actividades humanas en los ambientes que ocupa. Sin embargo, restan abordar los siguientes desafíos: formular una dieta adecuada para los animales en zoológicos, mejorar el éxito reproductivo en cautiverio, evaluar la importancia de las enfermedades en poblaciones silvestres, promocionar y apoyar los esfuerzos para reducir el conflicto con los humanos y preservar la especie en los países que ésta habita (Songsasen & Rodden, 2010).

### 1.7. Justificación del problema a abordar

El aguará guazú se encuentra amenazado en todo su rango de distribución geográfica debido a la fragmentación del hábitat que ocupa y a la reducción del número de individuos a nivel global. Esto se ve agravado por el vacío de información acerca de su estructura genética y flujo génico en distintas localidades de su distribución geográfica. Por otro lado, existen ejemplares alojados en distintos zoológicos y hasta el momento no se han realizado estudios genéticos comparativos dentro y entre poblaciones cautivas.

Este trabajo generará un importante aporte para el establecimiento de unidades de manejo de las poblaciones en vida libre y recomendaciones acerca del manejo *ex situ* de esta especie amenazada.



## 2. HIPÓTESIS

A partir de la problemática que afronta el aguará guazú, se plantean las siguientes hipótesis:

1. Existe estructuración genética en la distribución geográfica de la especie, lo cual es congruente con los datos obtenidos a partir del análisis de ADN mitocondrial (*D- loop*).
2. Los índices de variabilidad y estructura genética intrapoblacional resultan diferentes en distintas localidades de su distribución.
3. Los *stocks* cautivos de *C. brachyurus* retienen niveles de variabilidad genética que permiten la viabilidad de las mismas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Generales:

- Analizar la estructura genética de aguará guazú mediante loci de microsatélites, a partir de distintas localidades a lo largo de su distribución geográfica.
- Examinar la variabilidad genética y las relaciones de parentesco dentro y entre *stocks* cautivos de aguará guazú.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar el patrón de amplificación de cada uno de los loci para la especie.
- Establecer el número de poblaciones genéticamente más probables para el conjunto de muestras de animales en vida libre.
- Identificar el número de migrantes entre poblaciones silvestres, para asignar unidades de manejo.
- Determinar el grado de variabilidad y estructuración genética intrapoblacional en las distintas localidades de su distribución, así como también en las poblaciones cautivas.
- Estimar el número de individuos muestreados y el tamaño poblacional en Bolivia.
- Explorar el grado de diferenciación genética entre *stocks* en cautiverio.

## 4. MATERIALES y MÉTODOS

### 4.1. Obtención de las muestras

La colecta de las muestras se realizó bajo condiciones de esterilidad, utilizando guantes descartables y etiquetas indelebles. Las muestras de pelo, tejido y fecas fueron conservadas en alcohol 95%, mientras que las de sangre contenían el anticoagulante EDTA. Todas fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN. Se analizaron un total de 86 muestras colectadas entre 1989-2011, depositadas en el banco de tejidos de los laboratorios de Genética de la Conservación (Montevideo, Uruguay) y del *Center for Conservation and Evolutionary Genetics Smithsonian Conservation Biology Institute-National Zoological Park-Smithsonian Institution* (Washington DC, EUA).

De distintas localidades de poblaciones silvestres se obtuvieron muestras de Brasil (n=9), Argentina (n=12), Bolivia (n=37) y Uruguay (n=3) (Anexo 2, Fig. 5).

A su vez, se contó con 25 muestras de animales de *stock* cautivos de zoológicos de Argentina (cinco), Brasil (once), Europa (dos), Estados Unidos (seis) y México (uno) (Anexo 3). Las muestras de Estados Unidos (Front Royal) pertenecen a un grupo familiar constituido por cuatro hermanos totales y sus parentales.

### 4.2. Aislamiento de ADN y amplificación por PCR

#### *Extracción de ADN*

Se utilizaron diferentes protocolos de extracción en función del origen de la muestra. Para tejidos y pelos se extrajo ADN total siguiendo el protocolo propuesto por Medrano *et al.* (1990) con modificaciones (González, 1998); se utilizó entre 25-30 mg de muestra en el caso de tejidos y aproximadamente 40 pelos con bulbo piloso. Por otro lado, se aisló ADN total de fecas (unos 30 mg) utilizando el *kit* de extracciones QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Para efectuar las extracciones a partir de sangre, se usó 100 µl de sangre y el

kit comercial DNeasy®Tissue Kit (QIAGEN). En aquéllas donde se manipularon kit comerciales, se siguieron los protocolos sugeridos por los fabricantes. La pureza y cantidad de ADN aislado fueron cuantificadas mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000). El *software* del espectrofotómetro estima la concentración de ADN utilizando la ecuación de Beer-Lambert y calcula su pureza a partir del cociente entre las medidas de absorbancia a 260 nm-280 nm (Termo 12 Fisher Scientific, 2008). Cuando este último se encuentra entre 1,8-1,9 se consideran muestras puras de ADN. Para las extracciones de ADN fecal, también se verificó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 100 mL de TBE), usando como agente intercalante GoodView™ (SbS).

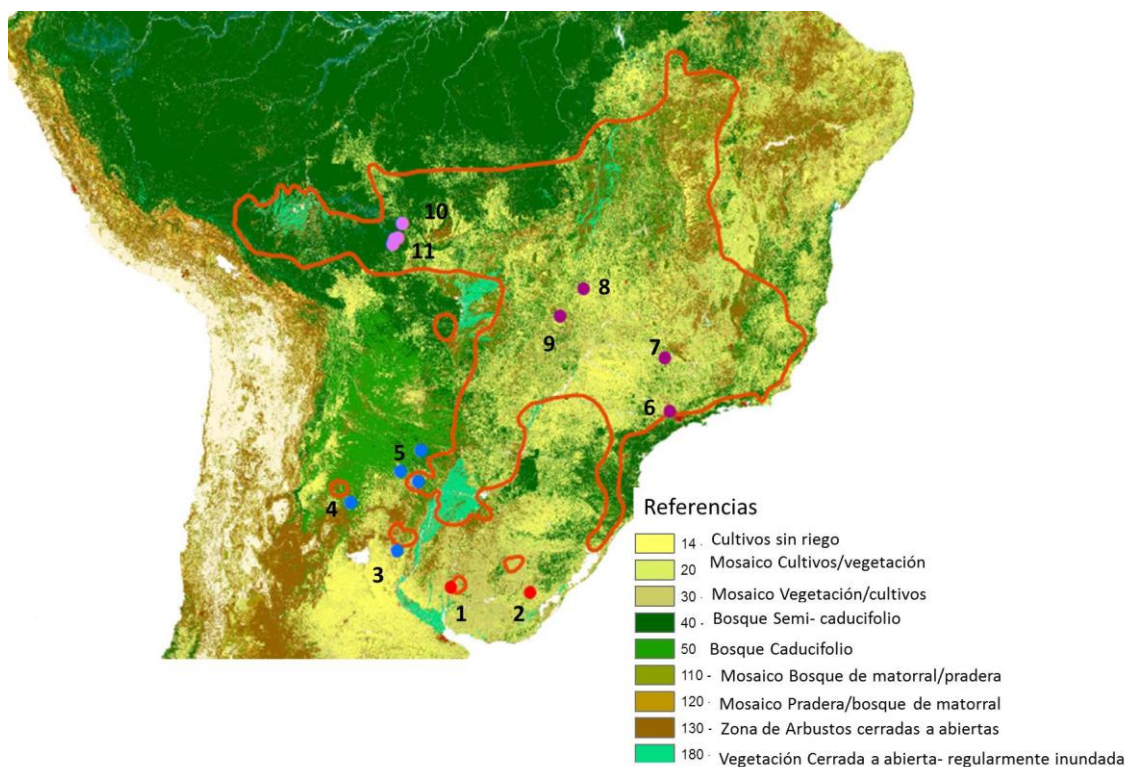


Figura 5: Mapa fitogeográfico en donde se muestran las localidades muestreadas (puntos de colores) y la distribución geográfica de la especie (contorno anaranjado). Los números representan los puntos de muestreo. 1- Río Negro (Uruguay). 2- Cerro Largo (Uruguay). 3- Santa Fé (Argentina), 4- Santiago del Estero (Argentina). 5- Formosa- Chaco (Argentina). 6- Faisca, Araxa, Gaia (Brasil). 7- Franca, Belo Horizonte (Brasil). 8- Rio Verde (Brasil). 9- Chapada do Sul (Brasil). 10- Mangabalito (Bolivia). 11- El Refugio, Parque Nacional Noel Kempff, Meseta (Bolivia).

### *Amplificación por PCR*

Se seleccionaron 12 loci de microsatélites desarrollados para perro doméstico, que fueron utilizados de manera exitosa en otras especies de cánidos (Tabla I). Se diseñaron PCR multiplex en base a las temperaturas de anidamiento ( $T_a$ ), el tipo de fluorocromo de cada juego de cebadores y el tamaño del fragmento a amplificar (Tabla I).

La reacción de PCR consistió en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l, conteniendo aproximadamente 50 ng de DNA, 0,65 pM de cada cebador (Tabla I) y 10  $\mu$ l del mix de PCR ImmnoMix<sup>TM</sup> (BIOLINE), el cual es específico para PCR-multiplex y posee una elevada performance por poseer hot-start Taq polimerasa. Las condiciones del termociclado fueron 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de: 95 °C durante 30 segundos, temperatura de anidamiento durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final de 15 minutos a 72 °C.

Se comprobó el éxito de la reacción de amplificación a través de la migración de 4  $\mu$ l de los productos en gel de agarosa al 2% (Amresco®), utilizando GoodView<sup>TM</sup> (SbS) como agente intercalante. Las corridas electroforéticas fueron efectuadas a 100 V y 50 mA, incluyéndose un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Las mismas se detuvieron luego de haber migrado 2/3 del gel.

### *Genotipificación*

Los productos de PCR fueron corridos en un equipo ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Se utilizó 1  $\mu$ l del producto amplificado, adicionándole 10  $\mu$ l de formamida/ROX (Applied Biosystems). Se llevó a cabo la migración empleando el polímero POP4 (Applied Biosystems), en microcapilar de 22 cm y manteniendo las condiciones de 15 kV, 100 A, 11 mW a 60 °C por 35 min.

El tamaño de los fragmentos fue examinado con el *software* Genescan Analysis® en el *Center for Conservation and Evolutionary Genetics - Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park*. La

genotipificación de los individuos fue realizada utilizando el *software* Genotyper<sup>®</sup> (Applied Biosystems) y GenMarkerV1.75 (SoftGenetics).

Tabla I: Para cada locus utilizado se indica tipo de repetido, en que cromosoma del perro se ubica, secuencia del cebador, tamaño esperado del fragmento amplificado en pares de bases (pb), fluorocromo con que se encuentra marcado el cebador y temperatura de unión del cebador al ADN molde en °C (Ta). También se muestran los multiplex diseñados para la amplificación por PCR.

Locus	Tipo de Repetido	Cromosoma en el perro	Secuencia del cebador	Tamaño esperado (pb)	Fluorocromo	Ta (°C)	Multiplex
FH2054 <sup>1,2</sup>	Tetranucleotido	12	F 5'-GCCTTATTCATTGCAGTTAG-3' R 5'- ATGCTGAGTTTTGAACCTTCCC-3'	138-154	HEX	60	1
REN169D01 <sup>3,4</sup>	Dinucleotido	14	F5'- AGTGGGTTTGCAAGTGAAC- 3' R5'- AATAGCACATCTTCCCCACG-3'	199-221	FAM	60	
AHTK253 <sup>3,4</sup>	Dinucleotido	23	F 5'- CTCAAAGCGTTCTTTCCAG- 3' R 5'- GCACATGGAGGACAAGCAC- 3'	277-297	FAM	60	
FH2137 <sup>1,5,6</sup>	Tetranucleotido	3	F 5'-GCAGTCCCTTATTCACAAATG-3' R 5'-CCCCAAGTTTTGCATCTGTT-3'	183-247	TET	58	2
FH2140 <sup>1,6</sup>	Tetranucleotido	5	F 5'- GGGGAAGCCATTTTTAAAG-3' R 5'-TGACCCTCTGGCATCTAGG-3'	107-159	FAM	58	
FH2328 <sup>7,8</sup>	Tetranucleotido	29	F 5'- ACCAGGTAGTTTTCAGAAATGC- 3' R 5'- AGTTATGGGACTTGAGGCTG-3'	171-213	FAM	58	
FH2848 <sup>9,10</sup>	Dinucleotido	2	F 5'-CAAACCAACCCATTCACTC- 3' R 5'-GTCACAAGGACTTTTCTCCTG	221-237	HEX	58	3
FH2535 <sup>9,6</sup>	Tetranucleotido	15	F 5'-GTCATTGACAGACTACAAATCTCC-3' R 5'-ACAGACTTGAGTATTTTGTCTG-3'	146-176	HEX	58	
REN105L03 <sup>9,10</sup>	Dinucleotido	11	F 5'-GGAATCAAAGCTGGCTCTCT- 3' R 5'-GAGATTGCTGCCCTTTTTACC- 3'	161-177	FAM	58	
FH2561 <sup>9,6</sup>	Tetranucleotido	6	F 5'-TGCTCAAGGTTGAATAAATATGC-3' R 5'-TTTATGGCCTGTGGGCTC-3'	210-272	TET	58	4
Pez19 <sup>2</sup>	Tetranucleotido	20	F 5'-GACTCATGATGTTGTGTATC-3' R 5'-TTTGCTCAGTGCTAAGTCTC-3'	195-211	FAM	58	
FH2226 <sup>7,6</sup>	Tetranucleotido	7	F 5'-GGACTACCCATTGCATTTG-3' R 5'- GAATCGAGTCCCATATCGGG-3'	128-180	HEX	58	

<sup>1</sup>Francisco *et al.* (1996); <sup>2</sup>Neff *et al.* (1999); <sup>3</sup>Breen *et al.* (2001); <sup>4</sup>ISAG Canine Panel (2005); <sup>5</sup>Richman *et al.* (2001); <sup>6</sup>Maldonado (2010); <sup>7</sup>Mellersh *et al.* (1997); <sup>8</sup>Tom *et al.* (2010); <sup>9</sup>Lindblad-Toh *et al.* (2005); <sup>10</sup>Moore *et al.* (2010).

#### 4.3. Análisis de muestras de animales de poblaciones silvestres

La metodología empleada para examinar esta matriz de genotipos consistió en: estimar el número de individuos muestreados en Bolivia y su tamaño poblacional (ya que la mayoría de las muestras eran fecas), caracterizar los loci utilizados, analizar la estructura genética poblacional (examinando las relaciones interpoblacionales) y determinar las relaciones de parentesco intrapoblacional.

##### 4.3.1. Caracterización de los loci de microsatélites

###### *Errores de genotipado*

Durante el genotipado se puede encontrar distintos tipos de errores cuando se trabaja con ADN degradado o en baja concentración: errores estocásticos (pérdida de alelos y tartamudeo) y errores sistemáticos (alelos nulos) (Pompanon *et al.*, 2005; Cosse, 2010). Los errores estocásticos pueden ser observados debido al reducido número de copias del ADN molde, la amplificación puede producir varias copias de relativamente baja calidad. Si al comienzo de la reacción de PCR es introducida una pequeña cantidad de ADN, es posible que los alelos amplifiquen de manera diferente. La pérdida de alelos puede causar la asignación incorrecta de homocigotas, subestimando la heterocigosidad observada (Wang *et al.*, 2012). El tartamudeo (*stutter*) es común en repetidos de dinucleótidos, dificultando discriminar entre homo y heterocigotas (Oosterhout *et al.*, 2004). Por otro lado, los errores sistemáticos son aquéllos que se originan a partir de mutaciones en el sitio de unión al cebador, lo que genera una reducción en la eficiencia de la reacción de PCR. Este proceso determina que algunos alelos no amplifiquen (*alelos nulos*) produciendo falsos homocigotas, generando así deficiencia en la frecuencia de ciertos heterocigotas (Selkoe & Toonen, 2006; Chapuis & Estoup, 2007; Cosse, 2010). Tales errores de genotipado suelen ocasionar desvíos de las proporciones esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) (Oosterhout *et al.*, 2004).

Para evaluar los errores de genotipado causados por alelos nulos, pérdida de alelos o tartamudeo se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004). Luego de identificar la presencia o no de estos errores el *software* puede estimar las frecuencias de alelos nulos y ajustar las frecuencias observadas, las cuales pueden ser utilizadas en análisis de genética poblacional subsecuentes (Oosterhout *et al.*, 2004). Micro-Checker implementa una distribución binomial acumulada para calcular la probabilidad observada de homocigotos dentro de cada clase de alelo homocigota (Weir, 1996). Los valores de  $p$  son calculados a través de un ranking de frecuencias observadas en la distribución al azar de genotipos. Finalmente se identifican desviaciones significativas de las proporciones esperadas para el equilibrio H-W, indicando si las mismas son consistentes con alelos nulos, tartamudeo, pérdida de alelos (Oosterhout *et al.*, 2004; Cosse, 2010).

El *software* ofrece distintos estimadores de alelos nulos, otorgando sugerencias sobre cuál estimador es más apropiado en cada situación (Oosterhout *et al.*, 2003-2005). En este caso, dado que los loci no amplificados podrían ser artefactos, tener alelos nulos, ADN degradado o problemas con el PCR el programa sugiere utilizar la ecuación de Brookfield 1 (Brookfield, 1996):

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

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

#### *Test de equilibrio de Hardy-Weinberg*

Uno de los supuestos básicos en los estudios de genética poblacional es que los loci utilizados, para analizar la estructura poblacional, deben tener un



comportamiento neutral en relación a la selección natural (Beebee & Rowe, 2008). Un punto de partida frecuente es que, si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), se puede predecir las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Este principio asume que en una población suficientemente grande, con apareamiento al azar (diploide), las frecuencias alélicas se mantendrán constantes de generación a generación; asumiendo que no hay mutación, migración, selección o deriva génica (Guo & Thomson, 1992). En la práctica estos supuestos no son requeridos de manera rigurosa.

Para un locus con dos alelos en equilibrio de H-W, se espera una distribución binomial de homo y heterocigotas (Beebee & Rowe, 2008) de acuerdo con la siguiente relación:

$$p^2+2pq+q^2=1 \quad (2)$$

Donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias de los alelos  $A$  y  $a$  en una población.

Esta relación puede ser rápidamente acomodada para múltiples alelos (Guo & Thomson, 1992):

$$\sum_i p_i A_i A_i + \sum_{i < j} 2p_i p_j A_i A_j \quad (3)$$

$p_i$  es la frecuencia alélica de  $A_i$  y  $p_j$  la frecuencia alélica de  $A_j$ .

Se estimó la probabilidad exacta para H-W utilizando el programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995) que emplea cadenas de Markov mediante el método descrito por Guo & Thomson (1992). Se realizó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

Se evaluó el equilibrio H-W para cada locus y para el conjunto de loci.

#### *Desequilibrio de ligamiento*

Se estudió el ligamiento entre loci para comprobar si éstos segregan de manera independiente y, por lo tanto, si cada locus aporta información nueva. En éste, las distintas combinaciones alélicas se pueden generar por

segregación independiente o pueden estar determinadas por patrones de ligamiento entre los loci. Se denomina equilibrio de ligamiento cuando las combinaciones alélicas de diferentes loci son logradas por azar (Hartl & Clarck, 1989).

El coeficiente de desequilibrio de ligamiento (D) es una medida de asociación entre los alelos A y B en dos loci, siendo  $p_{APB}$  el producto de las frecuencias alélicas y  $p_{AB}$  la frecuencia gamética (Weir, 1996):

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B \quad (4)$$

Éste fue realizado para cada par de locus mediante un test de  $\chi^2$  en el *software* GenePop (Raymond & Rousset, 1995). Se realizaron las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989)

#### *Contenido de información polimórfica y probabilidad de no exclusión*

El contenido de información polimórfica (PIC) es una medida del grado de polimorfismo o información que nos brinda un locus o el conjunto de loci, relacionada con la heterocigosidad esperada y calculada a partir de las frecuencias alélicas (Marshall, 1998-2007):

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (5)$$

$p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias alélicas para los  $n$  alelos de un locus (Botstein *et al.*, 1980).

Cuando  $PIC > 0,5$  se considera altamente informativo, razonablemente informativo para  $0,5 > PIC > 0,25$  y débilmente informativos  $PIC < 0,25$  (Botstein *et al.*, 1980).

Cuando se construyen genealogías a partir de datos moleculares es posible rechazar una hipótesis de parentesco debido a la ausencia de alelos compartidos. Sin embargo, al existir homoplasia, se puede calcular la probabilidad de que dos individuos que comparten alelos puedan tener una relación de parentesco dada. Por consiguiente, se puede determinar la

probabilidad de error en el proceso de exclusión de padres potenciales en un análisis de parentesco. La probabilidad de no exclusión para el par parental (NE-PP) es la probabilidad de considerar como posible par parental a dos individuos que no son los padres. Esta probabilidad de no exclusión (NE-PP) se puede estimar para un individuo dado en un locus (Marshall, 1998-2007; Kalinowski *et al.*, 2007). En el análisis de identidad, la probabilidad de no exclusión es la probabilidad de que los genotipos en un locus no se diferencian entre dos individuos elegidos al azar. Ésta puede ser calculada de dos maneras, una de ellas asume que los dos individuos no están relacionados (NE-I) mientras que la otra permite que los individuos puedan ser hermanos (NE-SI) (Marshall, 1998-2007; Waits *et al.*, 2001).

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

#### 4.3.2. Número de individuos muestreados en Bolivia y tamaño poblacional estimado

##### *Número de individuos muestreados*

Las muestras de Bolivia en su mayoría fueron de ADN fecal (81%) por lo tanto es posible que un mismo individuo haya sido re-muestreado. Para estimar el número de individuos muestreados se realizó un análisis de identidad con el programa GeneCap (Wilberg & Dreher, 2004). Con este *software* se compararon todos los genotipos entre sí con una probabilidad de coincidencia de 0,01 y asumiendo que los individuos podían ser hermanos (Psib) (Wilberg & Dreher, 2004). Los valores de Psib < 0,05 son considerados aceptables (Woods *et al.*, 1999)

La probabilidad de identidad es la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo genotipo. Ésta fue calculada de dos maneras con el *software* GeneCap (Wilberg & Dreher, 2004):

$$\text{HW } P(ID) = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j>i} (2p_i p_j)^2 \quad (6)$$

$$\text{Sib } P(ID) = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5 (\sum p_i^2)^2] - (0.25 \sum p_i^4) \quad (7)$$

$p_i$  and  $p_j$  son las frecuencias alélicas de los alelos  $i, j$ . La ecuación 6 (Paetkau & Strobeck, 1994) no considera que los individuos tengan una relación de parentesco, mientras que la ecuación 7 (Evetts & Wier, 1998) asume que los individuos puedan ser hermanos.

Los valores de  $P(ID)$  globales fueron obtenidos a través del producto de los  $P(ID)$  para cada locus (Wilberg & Dreher, 2004).

Para estimar el número de muestras el programa crea historias de captura a partir de los genotipos coincidentes y de  $P_{sib}$  (Wilberg & Dreher, 2004).

#### *Tamaño poblacional*

Se estimó el tamaño de la población de Bolivia utilizando el ejecutable GenCapture1.4 (McKelvey, 2008) contenido en el paquete DROPOUT2.3 (McKelvey & Schwartz, 2005; McKelvey, 2008;). El programa permite convertir datos de captura/marca/recaptura (CMR) en estimaciones de tamaño poblacional. GenCapture produce un archivo para ingresar al programa CAPTURE y también ejecuta este programa. El proceso de CMR que evalúa CAPTURE consiste en el *modelo de bolillero*, en donde los individuos son muestreados con reemplazo. Estos son marcados cada vez que son muestreados y dado que el número total de organismos marcados es conocido, el número de organismos en el bolillero puede ser estimado por la proporción de recapturas. El modelo básico, del cual derivan todos los restantes, asume que los organismos dentro de la urna pertenecen a una población cerrada (sin muertes ni reproducción) y que todos tienen la misma probabilidad de ser capturados (McKelvey, 2008).

GenCapture computa el estimador de Petersen (1896) y Lincoln (1930), llamado LP, el cual consta de dos pasos, primero se marcan los individuos muestreados y en una segunda instancia se registra la proporción de individuos colectados que se encuentran marcados (re-captura). La

proporción de marcas en la población es igual a la proporción de recapturas en el segundo muestreo. Este estimador es potencialmente menos sensible a las irregularidades de muestreo que los estimadores realizados en CAPTURE (McKelvey, 2008). La fórmula utilizada es la descrita por McKelvey (2008):

$$\hat{N} = (N_1 N_2) / M_2 \quad (8)$$

Donde  $N_1$  y  $N_2$  son el número de capturas en la primera y segunda sesión, mientras que  $M_2$  es el número de recapturas en la segunda sesión (McKelvey, 2008).

A su vez, calcula el corrector de Chapman (1951) para poblaciones pequeñas el cual provee el siguiente estimador poblacional (McKelvey, 2008):

$$\hat{N} = [(N_1 + 1)(N_2 + 1) / (M_2 + 1)] - 1 \quad (9)$$

El estimador de Chapman suele ser usado cuando el número de recapturas es cero y posee un menor sesgo cuando  $N_1 + N_2 > N$ , siendo  $N$  el tamaño poblacional (White & Shenk, 2001; McKelvey, 2008).

#### 4.3.3. Estructura genética poblacional

El grado de estructuración genética poblacional fue estimado mediante el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa utiliza el método Bayesiano y asume un modelo en donde existen  $K$  *clústers* ( $K$  puede ser desconocido), cada uno caracterizado por un conjunto de frecuencias alélicas. Los individuos muestreados son asignados probabilísticamente a los *clústers*, considerando que dentro de los mismos los loci se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y en equilibrio de ligamiento (Pritchard *et al.*, 2009). Sin embargo, la versión 2.0 puede manejar marcadores débilmente ligados (Pritchard *et al.*, 2009); así como también leves desvíos del equilibrio Hardy-Weinberg sin afectar las simulaciones (Cornuet *et al.*, 1999).

El programa STRUCTURE fue corrido para  $K$  de 1 a 10 con cinco réplicas cada una, empleando un parámetro de 10.000 *burnin period* y 200.000 réplicas Montecarlo de cadenas de Markov (MCMC).

El modelo de ancestralidad utilizado en dicho parámetro fue *Admixture*. Se calcularon las probabilidades de máxima verosimilitud  $\text{LnP}(X/K)$  para cada  $K$ . A partir de éstas, se graficó su media y desvío estándar. Se elige el valor de  $K$  con mayor media de  $\text{LnP}(X/K)$  y menor desvío estándar. En la mayoría de los casos una vez que se alcanza el  $K$  real, los valores de  $\text{LnP}(X/K)$  llegan a una meseta o continúan aumentando ligeramente para  $K$  mayores. De esta manera la distribución de  $\text{LnP}(X/K)$  no presenta un pico claro para seleccionar la  $K$  real; pero existe una cuantificación *ad hoc* basada en la tasa de cambio de segundo orden de la función probabilística para  $K$ . Esta aproximación llamada  $\Delta K$  muestra un claro aumento para el  $K$  verdadero (Evanno *et al.*, 2005). En primer lugar se calcula la diferencia entre los promedios de  $\text{LnP}$  para dos  $K$  sucesivas (ecuación 10) y luego la diferencia entre éstos (ecuación 11). Por último, la sumatoria de los valores absolutos de  $L''(K)$  es dividida entre el desvío estándar (SD) para cada  $K$  (ecuación 12).

$$L'(K) = \text{LnPD med } K_3 - \text{LnPD med } K_2 \quad (10)$$

$$L''(K) = L'(K) K_3 - L'(K) K_2 \quad (11)$$

$$\Delta K = \sum | L''(K) | / \text{SD} \quad (12)$$

$\Delta K$  puede ser calculada exclusivamente para  $K > 1$  (Evanno *et al.*, 2005).

### *Estadísticos F*

Los estadísticos de  $F$  estiman como está distribuida la variación genética dentro y entre subpoblaciones (Beebee & Rowe, 2008). Las subpoblaciones (*demes*) son entidades más pequeñas dentro de una población, es entonces el nivel más pequeño de estructura poblacional (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Existen tres estadísticos de  $F$  ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ) que fueron inicialmente descritos por Wright en 1943-1951 (Nei, 1977). El coeficiente  $F_{IS}$  evalúa el grado de endogamia de los individuos dentro de su subpoblación, es en esencia un coeficiente de endogamia. Por otro lado,  $F_{IT}$  mide cuanto se aleja

una población global del equilibrio Hardy-Weinberg (Allendorf & Luikart, 2007); mientras que  $F_{ST}$  (el índice de fijación) es un estimador común de diferenciación entre subpoblaciones (Beebee & Rowe, 2008). Los estimadores están definidos de la siguiente manera (Beebee & Rowe, 2008):

$$F_{IS} = (H_s - H_i) / H_s \quad (13)$$

$$F_{IT} = (H_t - H_i) / H_t \quad (14)$$

$$F_{ST} = (H_t - H_s) / H_t \quad (15)$$

$H_i$  es la heterocigosidad observada promedio a través de las subpoblaciones,  $H_s$  es la heterocigosidad esperada a través de las subpoblaciones y  $H_t$  es la heterocigosidad esperada para la población total.

El estadístico  $F_{IS}$  puede tomar valores que van desde -1 (exogamia) a 1 (donde hay endogamia). El índice de fijación  $F_{ST}$  toma valores positivos que van de 0 (no hay estructuración poblacional) a 1 (poblaciones separadas totalmente), en donde los valores mayores a 0,2 se considera que reflejan una fuerte estructuración (Beebee & Rowe, 2008).

Si bien fueron descritos inicialmente para loci bialélicos, Nei (1977) extendió su uso para loci con más de dos alelos usando los parámetros  $G_{IS}$ ,  $G_{ST}$ ,  $G_{IT}$ . Actualmente  $G$  y  $F$  son usados de manera intercambiable (Allendorf & Luikart, 2007; Cosse, 2010).

Los estimadores fueron obtenidos a partir del *software* GenePop (Raymond & Rousset, 1995), de acuerdo al análisis de varianza descrito por Weir & Cockerham (1984).

#### *Análisis factorial de correspondencia*

Mediante el programa computacional GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004) se realizó un análisis factorial de correspondencia. Es un tipo de análisis canónico particularmente bien adaptado para describir asociaciones entre variables y se utiliza para analizar relaciones entre individuos. Para simplificar, se reduce el número de variables a un pequeño número de

factores. En concreto, los individuos son vistos como una nube de puntos en un hiperespacio con múltiples dimensiones, ya que hay alelos en diferentes loci. Por convención, el primer eje es el que tiene la mayor contribución a la inercia total. De esta manera también se identifica el o los factores que aportan en mayor medida a la estructura de los datos.

#### *Número de migrantes*

Las tasas de flujo génico pueden ser estimadas de dos maneras utilizando marcadores moleculares. Una manera indirecta de estimar la tasa de flujo génico promedio ( $Nm$ ) que puede ser obtenida a partir de la diferencia de frecuencias alélicas entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). Otra forma de calcularla es a través de la proporción de alelos privados en una población (Slatkin, 1985; Allendorf & Luikart, 2007). Se entiende por alelo privado a aquel que se encuentra únicamente en una población. Slatkin (1985) demostró que existe una relación lineal entre  $Nm$  y el promedio de las frecuencias alélicas de alelos privados. Este método es más apropiado porque es menos sensible a la homoplasia que pueden acarrear los microsatélites (Allendorf & Luikart, 2007). De esta manera, se estimó  $Nm$  mediante el método de alelos privados utilizando GenePop (Raymond & Rousset, 1995). El programa provee tres estimadores utilizando tres regresiones lineales (para  $N=10, 25$  y  $50$ ) descritas por Barton & Slatkin (1986) así como también el valor estimado corregido a partir de la regresión lineal más cercana (Rousset, 2009).

#### *Análisis de parentesco*

La capacidad para inferir las relaciones genealógicas entre individuos de una población ha contribuido a muchas áreas de investigación en comportamiento, evolución y conservación (Blouin, 2003). Para desarrollar estrategias de apareamiento en programas de manejo de especies amenazadas, se requiere el conocimiento de las relaciones de parentesco entre parejas potenciales. Las relaciones de parentesco reflejan la historia



compartida entre los miembros de una misma familia o población (Weir *et al.*, 2006).

Están disponibles diversos métodos estadísticos para realizar análisis de parentesco a partir de marcadores moleculares (Blouin, 2003). Éstos pueden ser divididos en dos: i) relación entre individuos (*relatedness*) y ii) parentesco (*kinship*):

i) La estimación de relaciones entre individuos es una medida continua ( $r$ ) de identidad por descendencia global. Los estudios de relación entre individuos se expresan en términos de probabilidades de que un conjunto de alelos desciendan de un único alelo ancestral, determinando la probabilidad de que dos alelos idénticos lo sean por descendencia. Se dice que dos individuos están relacionados cuando el alelo de uno de ellos es idéntico por descendencia a aquél que tiene el otro (Weir *et al.*, 2006).

ii) Las categorías de parentesco son las que permiten determinar relaciones de parentesco (genealógicas) como los son los hermanos, primos, etc. (Blouin 2003).

Dentro de los diversos programas computacionales para estimar relaciones entre individuos y parentesco encontramos ML-Relate, que fue utilizado en este caso. Éste calcula las probabilidades de máxima verosimilitud para estimar  $r$ , el cual posee un error cuadrático medio menor que otros estimadores (Kalinowski *et al.*, 2006). Las probabilidades de que dos individuos compartan 0, 1 o 2 alelos idénticos por descendencia se resume en los coeficientes  $k_0$ ,  $k_1$  y  $k_2$ , llamados coeficientes  $k$  (Blouin 2003). La relación entre los coeficientes  $k$  y  $r$  está dada por la siguiente ecuación (Kalinowski *et al.*, 2006):

$$r = \left(\frac{1}{2}\right)k_1 + k_2 \quad (16)$$

$k_0$ ,  $k_1$  y  $k_2$  representan las probabilidades de que dos individuos compartan 0, 1 o 2 alelos respectivamente en un locus dado. De esta manera para padre-hijo  $k_1$  será igual a 1, entre hermanos totales será 0,5 y para primos 0,25. ML-Relate también calcula el tipo de parentesco más probable siendo padre- hijo

(PO), hermanos totales (FS), medio hermanos (HS) o individuos no relacionados (U) (Kalinowski *et al.*, 2006).

#### 4.4. Análisis de muestras de *stocks* de cautiverio

Si bien diversos zoológicos en el mundo tienen ejemplares de aguará guazú en sus instalaciones, en este trabajo se contó con muestras de los zoológicos de: La Plata (Argentina), Buenos Aires (Argentina), Riberao Preto (Brasil), Belo Horizonte (Brasil), Praga (República Checa), Krefeld (Alemania), Instituto de Biología de la Conservación (SCBI), *Smithsonian Institution* (Front Royal, EUA) y Africam Safari, Puebla (México). En base al número de muestras y al intercambio entre los zoológicos de un mismo país o continente, fueron definidos los siguientes *stocks*: Argentina (zoológicos de La Plata y Buenos Aires), Brasil (zoológicos de Riberao Preto y Belo Horizonte), EUA (SCBI, *Smithsonian Institution*, Front Royal), México (Africam Safari- Puebla) y Europa (zoológicos de Praga y Krefeld).

Para las muestras de los *stocks* en cautiverio se calcularon las frecuencias alélicas y génicas, así como también se realizó el test de equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando GenePop (Raymond & Rousset, 1995). Con dicho *software* se obtuvieron los coeficientes  $F_{ST}$  para todos los pares de subpoblaciones en cautiverio, se consideró que los individuos en zoológicos de un mismo país pertenecen a una misma subpoblación y en el caso de los individuos en zoológicos europeos fueron considerados en su conjunto como una única subpoblación. Las herramientas que utiliza dicho software para efectuar el test de equilibrio H-W y calcular el coeficiente  $F_{ST}$  fueron explicadas con detalle en el apartado anterior (apartado 5.3.3.).

Se calculó para cada *stock* la diversidad génica y la diversidad interna que retienen las mismas. También se hallaron para el total y para cada grupo definido el coeficiente de coancestría, la heterocigosidad observada y esperada, PIC,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ . Se hallaron los coeficientes de coancestría y parentesco entre los individuos, así como también el coeficiente de endogamia y la coancestría promedio de cada individuo.

#### 4.4.1. Diversidad génica y diversidad interna

Mantener la diversidad génica es una de las principales metas en el manejo de poblaciones cautivas (Caballero & Toro, 2000). El aporte de diversidad de cada subpoblación analizada al conjunto de datos puede ser examinado por el método propuesto por Petit *et al.* (1998) y el descrito por Caballero & Toro (2002).

Caballero & Toro (2002) utilizan el criterio de mantener la diversidad génica global máxima (GD), lo cual minimiza la coancestría molecular global promedio ( $\bar{f}$ ) porque  $GD = 1 - \bar{f}$ . Si se observa la fórmula de  $\bar{f}$  es claro que GD depende de la coancestría dentro de las subpoblaciones y de la distancia promedio entre ellas (Caballero & Toro, 2002):

$$\bar{f} = \sum_{i=1}^n \frac{N_i}{N_T} \left[ f_{ii} - \frac{\sum_{j=1}^n D_{ij} N_j}{N_T} \right] \quad (17)$$

Donde  $D_{ij}$  son las distancias genéticas mínimas de Nei (1987).

De acuerdo a esta fórmula, cuando una población dada, resulta en una contribución positiva ( $\bar{f}$ ), nos estaría indicando que su contribución a la diversidad global no sería relevante (Gutiérrez & Goyache, 2009).

La diversidad interna descrita por Petit *et al.* (1998) evalúa la contribución de la población  $i$  a la riqueza alélica total a través de su propia riqueza alélica. Una contribución positiva de una población implica que el conjunto de datos restante tiene un reducido número de alelos y por consiguiente sería preferente conservar dicha población (Gutiérrez & Goyache, 2009).

Ambas diversidades fueron exploradas a partir del programa computacional Molkin 3.0 (Gutiérrez *et al.*, 2005)

#### 4.4.2. Coeficientes de coancestría molecular y parentesco

El grado de relacionamiento genético entre individuos es denominado coeficiente de coancestría. El coeficiente de coancestralidad molecular entre dos individuos para un locus dado es la probabilidad de que dos alelos

muestreados al azar sean idénticos (Caballero & Toro, 2002). Esta información es útil para seleccionar tanto a cada uno de los individuos reproductores como a las parejas. El coeficiente de coancestría entre dos individuos  $i$ - $j$  se calcula mediante (Gutiérrez & Goyache, 2009):

$$f_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L f_{ij,l}}{L} \quad (18)$$

Siendo  $L$  los loci analizados. La auto-coancestría molecular de un individuo ( $s_i$ ) está relacionada con su propia endogamia ( $F_i$ ) en donde  $F_i = 2s_i - 1$  (Gutiérrez & Goyache, 2009).

Con el *software* Molkin 3.0 se halló el coeficiente de coancestría molecular ( $f$ ) y el promedio del coeficiente de coancestría molecular para cada animal ( $f_{prom}$ ). Este último tiene como propósito asegurar el grado en el cual un genotipo dado esté representado en una población dando así información adicional sobre los candidatos que se utilizarán para reproducción con el fin de preservar la variabilidad genética.

Los coeficientes de parentesco ( $r$ ) entre individuos fue calculado con el *software* ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006). Los detalles de este coeficiente fueron tratados con anterioridad en la sección 5.3.3.

#### 4.4.3. Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad observada y esperada

Mediante el método expandido (*rarefaction method*) del Molkin 3.0 se obtuvieron los valores promedios de contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada y esperada para cada *stock* y para el total. La fórmula de PIC que utiliza es aquella descrita por Botstein *et al.* (1980) y los valores de heterocigosidad fueron calculados a partir de las frecuencias genotípicas y alélicas. Los valores de PIC son expresados en términos de porcentaje.

#### 4.4.4. Estadísticos $F$ y coeficiente de endogamia individual

Los estadísticos  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$  definidos como déficit de heterocigotas dentro de una subpoblación, pérdida de heterocigotas por estructuración poblacional y falta de heterocigotas en la población total, respectivamente, fueron calculados con Molkin 3.0 de la siguiente manera (Gutiérrez & Goyache, 2009):

$$F_{IS} = (\bar{F} - \bar{f}) / (1 - \bar{f}) \quad (19)$$

$$F_{ST} = (\bar{f} - \hat{f}) / (1 - \bar{f}) \quad (20)$$

$$F_{IT} = (\bar{F} - \hat{f}) / (1 - \hat{f}) \quad (21)$$

Donde  $\bar{F}$  y  $\hat{f}$  son el promedio de endogamia y coancestría para la población respectivamente, mientras que  $\bar{f}$  es el promedio de coancestría para la subpoblación (Gutiérrez & Goyache, 2009). Los valores que pueden tomar estos estadísticos fueron expuestos en la sección 5.3.3.

El coeficiente de endogamia ( $F_i$ ) para cada individuo es una manera de cuantificar si comparte ancestros con otros individuos. Cuando  $F_i > 0$  significa que comparten cierta ascendencia (Templeton & Read, 1994). El programa computacional COANCESTRY1.0 © implementa distintos métodos para hallarlo (Wang, 2011). Los estimadores instantáneos (*moment estimators*) se obtienen típicamente al igualar ciertos estadísticos de los datos a su valor esperado para un parámetro dado, por lo general, se obtienen en términos de los primeros momentos de las distribuciones de las frecuencias alélicas (Wang, 2011). El estimador instantáneo que utiliza el software es aquél descrito por Ritland (1996) (Wang, 2011):

$$F_i = \sum_{i=1}^k \frac{S_i - p_i^2}{(k-1)p_i} \quad (22)$$

Para un locus con  $k$  alelos y siendo  $S_i$  un indicador de similitud de alelos. El estimador para múltiples loci se calcula ponderando  $k-1$  (Ritland, 1996). Por otro lado, a través de métodos probabilísticos el *software* estima la endogamia individual a partir de los nueve coeficientes de parentesco que implementa asumiendo que los genes son idénticos por descendencia (Wang, 2011).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis de muestras de poblaciones silvestres

Los genotipos para cada locus se muestran en el Anexo 4. Las extracciones de ADN realizadas a partir de muestras no invasivas fueron exitosas tanto para fecas y pelos. Esto es altamente ventajoso ya que mediante el muestreo genético no invasivo se puede reunir información crítica sin manipular, capturar, u observar directamente animales (Waits & Paetkau, 2005). Además la utilización de estos métodos resulta favorable para estudiar poblaciones de especies raras, amenazadas o crípticas, como es el caso del aguará guazú (Waits, 2004). Sin embargo, la amplificación del ADN aislado de muestras no invasivas es a menudo problemático ya que éste se encuentra usualmente degradado y en baja cantidad (Bellemain & Taberlet, 2004). El éxito de la amplificación de este tipo de muestras también se encuentra influenciado por condiciones ambientales y la antigüedad de la misma. Sumado a lo anterior, los componentes de la dieta presentes en la fecha pueden afectar la reacción de PCR (Murphy *et al.*, 2003; Santini *et al.*, 2007). Dentro de los diversos ítems alimentarios que consume el aguará guazú se encuentran frutos que pueden contener inhibidores del PCR, frente a los cuales el ADN nuclear es muy sensible (Vynne, 2010). A pesar de ello las amplificaciones realizadas en este trabajo fueron exitosas, excepto para un único locus (FH2328) que presentó una baja eficiencia de amplificación. De esta manera queda reflejada la eficacia de los métodos no invasivos para amplificar fragmentos de ADN nuclear en esta especie.

#### 5.1.1. Caracterización de loci de microsatélites

El análisis de errores de genotipado reveló que todos los loci presentaban alelos nulos, en su mayoría en bajas frecuencias y no se evidenció pérdida de alelos en ninguno de ellos (Tabla II). Por otro lado, se detectó la presencia de tartamudeo en los loci AHTK253, REN105 y REN169, indicado por la escasez altamente significativa de genotipos heterocigotos con alelos que se diferencian en una unidad del repetido.

Se corrigieron los genotipos considerando alelos nulos para todos los loci. Luego de corregir las frecuencias alélicas únicamente el locus FH2137 se encontraba bajo equilibrio H-W, algunos loci presentaban un leve desvío (REN105 y FH2054) mientras que otros revelaron un valor de p altamente significativo incluso luego de ser efectuadas las correcciones de Bonferroni (Tabla II).

En el análisis de desequilibrio de ligamiento entre loci se realizaron 55 comparaciones de las cuales tan solo 22 mostraron valores estadísticamente no significativos luego de las correcciones de Bonferroni ( $p > 0,00091$ ).

Para evaluar la presencia de exceso de homocigotas se calculó el índice  $F_{IS}$  en cada locus (Tabla II). Se puede observar un valor elevado para PEZ19 y REN169, pero todos presentaron signo positivo y, por lo tanto, exceso de éstos.

Tabla II: Resultado del análisis de errores de genotipado, se detalla el locus y la frecuencia estimada de alelos nulos para la aproximación de Brookfield 1. Para cada locus se muestran los valores de la probabilidad (p) para el test del equilibrio H-W y el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ .

Locus	Brookfield 1	p	Fis
FH2140	0,129	0	0,287
FH2137	0,079	0,929	0,179
FH2535	0,121	0	0,305
FH2848	0,155	0	0,355
REN105	0,098	0,013	0,247
PEZ19	0,266	0	0,683
FH2561	0,191	0	0,404
FH2226	0,094	0	0,235
FH2054	0,136	0,013	0,322
REN169	0,324	0	0,964
AHTK253	0,139	0	0,464

La diversidad alélica promedio fue de 11,82 alelos por locus, en donde el número de alelos por locus varió de 3 (REN169D01) a 27 (FH2561) (Tabla III). La heterocigosidad global esperada y el contenido de información polimórfica (PIC) fueron 0,741 y 0,699, respectivamente. Para todo el conjunto de loci las probabilidades de no exclusión para el par parental (NE-PP) y para la

identidad (NE-I) fueron  $2 \times 10^{-8}$  y  $3,88 \times 10^{-13}$ , mientras que para la identidad asumiendo que los individuos puedan ser hermanos fue  $NE-SI = 4,66 \times 10^{-5}$ . Los resultados para cada locus se presentan en la Tabla III.

Tabla III: Número de muestras analizadas (N), diversidad alélica (k), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), probabilidades de no exclusión para el par parental (NE-PP), para la identidad (NE-I) y para la identidad asumiendo que puedan ser hermanos (NE-SI).

Locus	N	k	PIC	Hobs	Hesp	NE-PP	NE-I	NE-SI
FH2140	54	17	0,861	0,630	0,881	0,092	0,028	0,321
FH2137	34	19	0,910	0,765	0,930	0,048	0,013	0,295
FH2535	51	12	0,653	0,524	0,703	0,342	0,135	0,436
FH2848	49	9	0,784	0,531	0,819	0,196	0,063	0,360
REN105	42	6	0,664	0,548	0,725	0,359	0,132	0,425
PEZ19	33	6	0,610	0,212	0,661	0,387	0,163	0,465
FH2561	42	27	0,940	0,571	0,954	0,023	0,006	0,280
FH2226	54	14	0,700	0,556	0,724	0,238	0,097	0,416
FH2054	39	8	0,746	0,538	0,791	0,246	0,082	0,380
REN169	53	3	0,388	0,019	0,513	0,700	0,362	0,586
AHTK253	50	9	0,429	0,240	0,446	0,534	0,324	0,610

### 5.1.2. Número de individuos muestreados en Bolivia

La estimación realizada con el programa GeneCap reveló que en Bolivia fueron muestreados 23 individuos (Tabla IV). Las probabilidades de identidad globales fueron  $P(ID) = 3,1 \times 10^{-4}$  (asumiendo que los individuos puedan ser hermanos) y  $P(ID) = 1,14 \times 10^{-9}$  (asumiendo que se encuentran en equilibrio H-W).

Tabla IV: Los 23 individuos muestreados (*capturas*) y los 14 re-capturados. Aquellos marcados con \* son muestras problemáticas.

Capturas	ABOL1	A1489	ACB2	ACB3	ACB4	ACB6	ACB61	AJW1	ALECB	ALECB	ALHECB	ALHEF	BI50	BI51	BI52	BI55	BI61	BI64	BI65	BI69	BI70	BI71	CB13	
Re- Capturas	ACB5*	ACB57*	BL69	AJW2	BL56*	BL60	ALECBH	BL50	BL69	BL54*	BL53*	ACB1*	ALECB	BL57*										

Se identificaron siete muestras que presentaron pocos loci amplificados y, por lo tanto, el programa las catalogó como problemática (Tabla IV). Además



40 pares de muestras se diferencian únicamente en un alelo y 48 en dos. Para análisis posteriores se utilizaron las 23 capturas, descartando así los re-muestreos y muestras problemáticas.

### 5.1.3. Estructura genética y caracterización de loci de microsatélites

#### *Identificación de agrupamientos genéticos*

Dado que la presencia de estructura poblacional puede reflejar desequilibrio de ligamiento entre loci y, a su vez, desvíos del equilibrio de H-W, se examinó la existencia de subdivisión poblacional con el *software* STRUCTURE.

El análisis de estructuración realizado con el *software* STRUCTURE indicó que el número de *clúster* que presenta el mayor valor medio para el Ln de máxima verosimilitud y menor desvío estándar fue  $K=2$  (Fig. 6). Se define así un grupo que incluye individuos exclusivamente de Bolivia y otro grupo con el resto de los individuos, existiendo pocas muestras de Bolivia en este último (Fig.7).

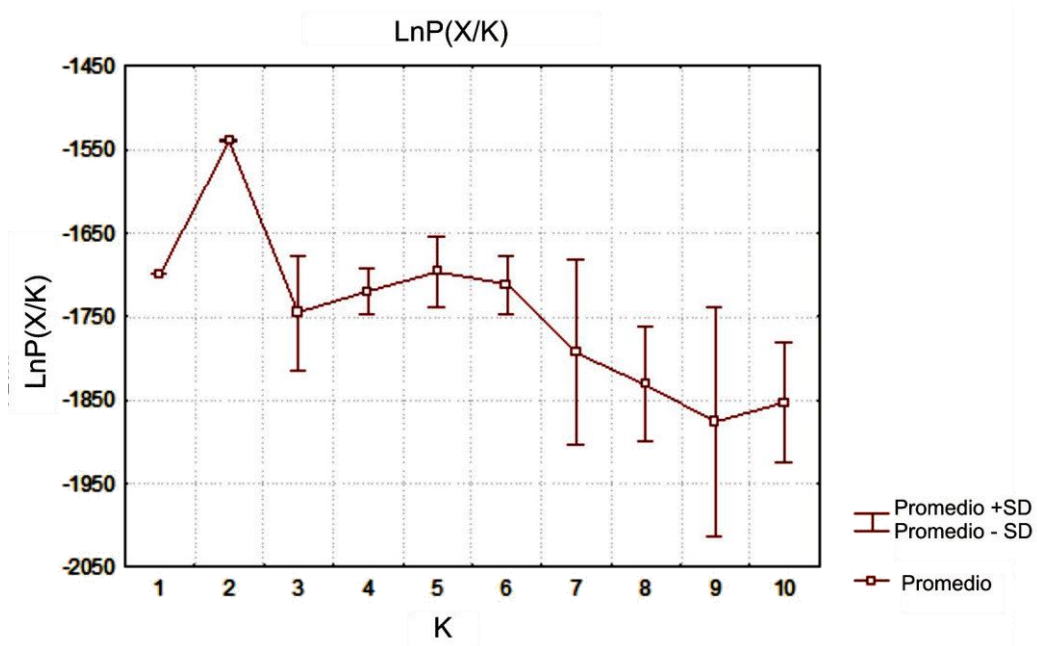


Figura 6: Gráfica con los valores medios del  $\text{LnP}(X/K)$  y el desvío estándar (SD) obtenido para cinco réplicas de distintos modelos de *clústers* (K), obtenidos con el programa STRUCTURE.

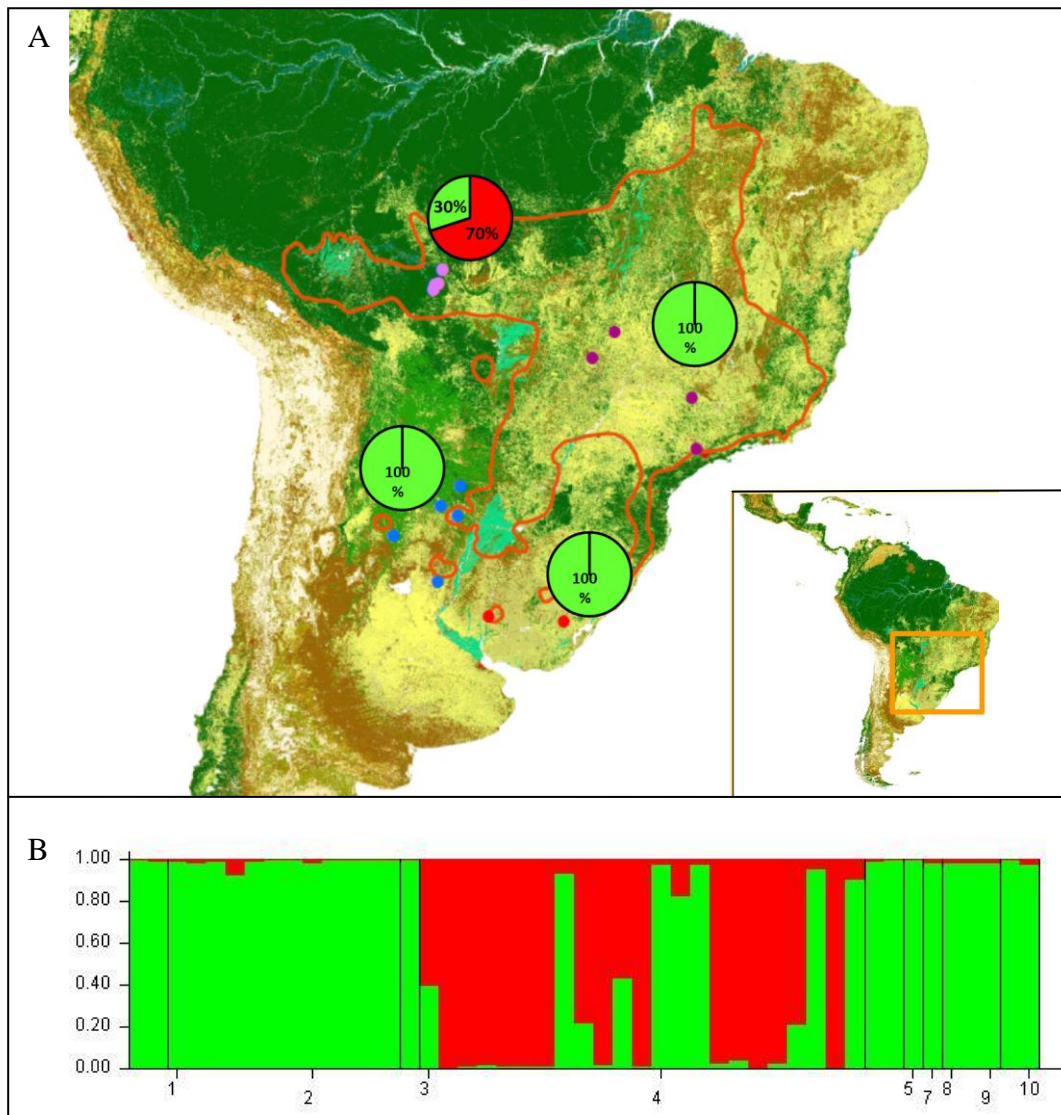


Figura 7: A) Mapa las localidades muestreadas y las proporciones de individuos para cada *clúster* en las distintas localidades. B) Gráfica que representa una simulación con  $K=2$  (representados en rojo y verde). Para cada individuo se presenta una barra que grafica la probabilidad de éste de pertenecer al *clúster* rojo o verde. Los números en la abscisa representan las localidades de muestreo: 1-Chapada do Sul, Brasil; 2-Chaco, Argentina; 3- Santa Fé, Argentina; 4- Bolivia; 5- Araxa, Brasil; 7- Belo Horizonte, Brasil; 8-Franca, Brasil; 9- Uruguay; 10- Santiago del Estero, Argentina.

A pesar de que la forma de la curva del LnP llegó a una meseta y exhibió un ligero aumento para  $K>2$ , los valores de  $\Delta K$  apoyan la existencia de dos *clústers* reales (Fig. 8).

Se calcularon los errores de genotipado y se caracterizaron los loci de microsatélites para cada *clúster*. De aquí en adelante se refiere a Kbol a aquel

*clúster* constituido exclusivamente por muestras de Bolivia y Kmixto al conformado por muestras de distintas localidades.

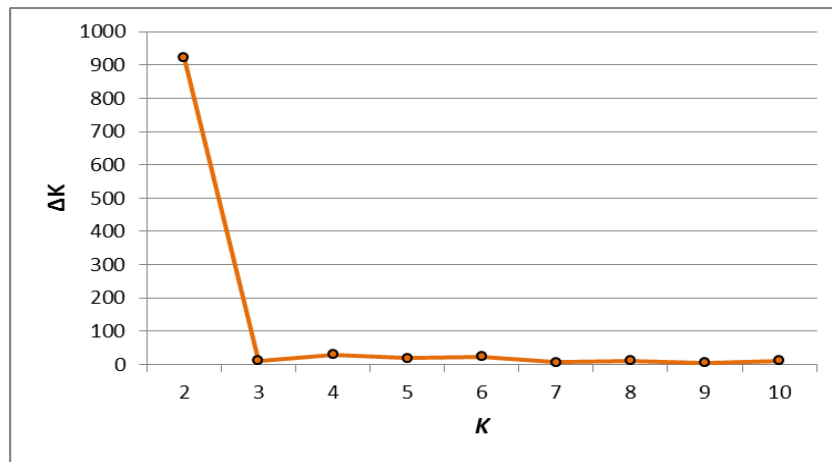


Figura 8: Gráfica de la magnitud de  $\Delta K$  (tasa de cambio del  $\text{LnP}(X/K)$ ) en función de  $K$  clústers en las muestras analizadas.

#### *Caracterización de loci de microsatélites en el clúster con muestras de Bolivia exclusivamente (Kbol)*

Se detectó la presencia de alelos nulos en cuatro de los loci analizados, pero no se encontraron errores de tartamudeo ni pérdida de alelos en ninguno de ellos. Luego de corregir las frecuencias alélicas y aplicar la corrección de Bonferroni, cinco loci se encontraron en equilibrio de H-W y el locus FH2535 exhibió una desviación altamente significativa para el mismo (Tabla V).

El análisis de desequilibrio de ligamiento no fue significativo para ningún par de loci luego de la corrección de Bonferroni ( $p > 0,00093$ ), de manera que éstos segregan de manera independiente.

El estadístico  $F_{IS}$  fue calculado para cada loci y los valores variaron entre 0,069 (FH2848) y 0,660 (FH2561), siendo todos positivos e indicando por consiguiente exceso de homocigotas (Tabla V).

Tabla V: Resultado del análisis de errores de genotipado para las muestras del *clúster* Kbol, se detalla el locus, la presencia de alelos nulos y la frecuencia estimada de alelos nulos para la aproximación de Brookfield 1. Para cada locus se muestran los valores de la probabilidad (p) para el test del equilibrio H-W y el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ .

Locus	Presencia de alelos nulos	Brookfield 1	p	Fis
FH2140	no	0,079	0,012	0,349
FH2137	no	0,029	0,800	0,316
FH2535	no	0,082	0	0,356
FH2848	si	0,174	0,006	0,069
REN105	no	- 0,008	0,583	0,472
PEZ19	no	- 0,003	0,193	0,321
FH2561	si	0,198	0,015	0,660
FH2226	si	0,179	0,001	0,427
FH2054	no	0,045	0,094	0,479
REN169	no	- 0,002	0,085	0,493
AHTK253	si	0,182	0,006	0,616

Para este grupo el número promedio de alelos por locus fue 5,64 en un rango de 3 a 9 alelos (Tabla VI). El PIC global fue de 0,557 y el promedio de la heterocigosidad esperada fue 0,613. Las probabilidades de no exclusión para la identidad fueron  $NE-I=5,4 \times 10^{-9}$  y  $NE-SI=4,3 \times 10^{-4}$ , mientras que para el par parental fue  $NE-PP=3,2 \times 10^{-5}$ . En la Tabla VI se encuentran estos datos para cada locus analizado.

Tabla VI: Número de muestras analizadas (N), diversidad alélica (k), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), probabilidades de no exclusión para el par parental (NE-PP), para la identidad (NE-I) y para la identidad asumiendo que puedan ser hermanos (NE-SI) en el *clúster* Kbol.

LOCUS	N	k	PIC	Hobs	Hesp	NE-PP	NE-I	NE-SI
FH2140	22	6	0,707	0,5	0,762	0,288	0,103	0,403
FH2137	12	8	0,782	0,583	0,841	0,186	0,061	0,363
FH2535	20	8	0,628	0,450	0,692	0,366	0,152	0,451
REN105	16	3	0,505	0,563	0,603	0,555	0,252	0,521
PEZ19	15	3	0,227	0,133	0,248	0,781	0,591	0,778
FH2054	17	5	0,608	0,471	0,686	0,411	0,170	0,459
REN169	18	3	0,149	0,056	0,160	0,855	0,719	0,852
FH2848	15	7	0,743	0,467	0,802	0,241	0,083	0,383
FH2561	11	9	0,793	0,455	0,853	0,170	0,056	0,357
FH2226	15	5	0,570	0,333	0,646	0,451	0,196	0,487
AHTK253	17	5	0,414	0,176	0,451	0,576	0,340	0,616

*Caracterización de loci de microsatélites en el clúster con muestras de distintas localidades (Kmixto)*

No se identificaron pérdida de alelos y tampoco señales de tartamudeo en ninguno de los loci, sin embargo, se detectó la presencia de alelos nulos en ocho de ellos (Tabla VII). Posteriormente se corrigieron las frecuencias alélicas y se calcularon las probabilidades para el test del equilibrio H-W aplicando las correcciones de Bonferroni. De esta manera se encontraron siete loci en equilibrio H-W, mientras que el locus PEZ19 mostró una desviación altamente significativa (Tabla VII).

En el análisis de desequilibrio de ligamiento tan sólo dos pares de loci exhibieron un valor de  $p < 0,00093$  y por lo tanto significativo luego de la corrección de Bonferroni (AHTK253-FH2848:  $p = 0,0001$ ; AHTK253-FH2535:  $p = 0,0002$ ). Dichos loci no segregarían de manera independiente y se excluyó AHTK253 en posteriores análisis en este *clúster* para evitar información redundante.

Los valores de  $F_{IS}$  para cada locus se encuentran en la Tabla VII. Los valores de este coeficiente varían entre 1 (REN169) y 0,009 (FH2226).

Tabla VII: Resultado del análisis de errores de genotipado para las muestras del *clúster* Kmixto, se detalla el locus, la presencia de alelos nulos y la frecuencia estimada de alelos nulos para la aproximación de Brookfield 1. Para cada locus se muestran los valores de la probabilidad (p) para el test del equilibrio H-W y el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ .

Locus	Presencia de alelos nulos	Brookfield 1	P	Fis
FH2140	no	0,049	0,776	0,014
FH2137	si	0,064	0,999	0,156
FH2535	si	0,098	0,321	0,25
FH2848	si	0,139	0,012	0,328
REN105	si	0,120	0,024	0,299
PEZ19	si	0,219	0	0,541
FH2561	si	0,121	0,143	0,268
FH2226	no	0,028	0,995	0,009
FH2054	no	0,101	0,819	0,086
REN169	si	0,121	0,03	1
AHTK253	si	0,091	0,056	0,350

La diversidad alélica encontrada varió entre 2 (REN169) y 24 (FH2561) alelos cuyo promedio fue de 9,82 alelos por locus. El contenido de información polimórfica y el promedio de la hererocigosidad esperada fueron 0,674 y

0,715, respectivamente. Las probabilidades de no exclusión globales fueron  $NE-PP=4 \times 10^{-8}$ ,  $NE-I=1,27 \times 10^{-12}$  y  $NE-SI=6,89 \times 10^{-5}$ . Estos índices y probabilidades fueron calculados para cada locus incluido en el estudio (Tabla VIII).

Tabla VIII: Número de muestras analizadas (N), diversidad alélica (k), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), probabilidades de no exclusión para el par parental (NE-PP), para la identidad (NE-I) y para la identidad asumiendo que puedan ser hermanos (NE-SI) en el *clúster* Kmixto.

LOCUS	N	k	PIC	Hobs	Hesp	NE-PP	NE-I	NE-SI
FH2140	22	12	0,840	0,864	0,875	0,116	0,036	0,331
FH2226	24	12	0,765	0,792	0,799	0,179	0,064	0,375
FH2054	17	5	0,625	0,647	0,706	0,413	0,160	0,447
FH2137	23	17	0,896	0,783	0,924	0,060	0,017	0,302
FH2535	27	9	0,681	0,556	0,737	0,321	0,119	0,418
FH2848	27	7	0,777	0,556	0,821	0,210	0,067	0,364
REN105	26	6	0,706	0,538	0,763	0,301	0,106	0,402
PEZ19	17	6	0,690	0,353	0,756	0,315	0,115	0,412
FH2561	27	24	0,935	0,704	0,956	0,026	0,007	0,283
REN169	27	2	0,128	0	0,140	0,884	0,754	0,870
AHTK253	28	8	0,367	0,250	0,382	0,603	0,399	0,662

#### 5.1.4. Estructura genética poblacional

##### *Estadísticos F*

Estos estadísticos fueron calculados de dos maneras: para cada *clúster* y para las localidades. Las localidades fueron agrupadas por su proximidad espacial, de esta manera las localidades representan muestras colectadas en un mismo país.

Se obtuvo el resultado del equilibrio H-W para el conjunto de loci en cada *clúster* y localidades por país de manera independiente. Los valores de p de este análisis luego de la corrección de Bonferroni se muestran en la Tabla IX.

Para ambos *clúster* se obtuvo un valor altamente significativo (HS) cuando se analizaron todos los loci genotipados. Sin embargo, los valores que se muestran fueron calculados considerando solo aquellos loci con un comportamiento neutro (en equilibrio H-W y en equilibrio de ligamiento). Se

puede observar que ninguno de los clúster se encuentra bajo las condiciones del equilibrio H-W (Tabla IX).

Para el cálculo por localidades se realizaron las correcciones de frecuencias alélicas en aquellos loci que presentaron alelos nulos y se utilizaron todos los loci genotipados. El conjunto de muestras de Brasil y Uruguay exhibieron un  $p > 0,05$ . Por otro lado, las muestras colectadas en Bolivia presentaron un apartamiento altamente significativo del mismo (Tabla IX).

Los valores del coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  variaron entre 0,118 (Brasil) y 0,362 (Bolivia) (Tabla IX).

El clúster Kbol y las localidades de Bolivia presentaron los valores más altos para el índice  $F_{IS}$ . A su vez, Kbol y Bolivia retienen la menor variabilidad intra (1-Qintra) e interindividual (1-Qinter) (Tabla X).

Tabla IX: Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) según la varianza de la identidad alélica, se detallan las variabilidades intra (1-Qintra) e interindividual (1-Qinter), así como también los valores de p para el test de H-W (p) para cada clúster (Kbol, Kmixto) y localidades por país.

		$F_{IS}$	1-Qintra	1-Qinter	p
Clúster	Kbol	0,297	0,346	0,4923	0,013
	Kmixto	0,142	0,721	0,841	0,004
Localidades	Argentina	0,159	0,609	0,725	0,002
	Brasil	0,118	0,615	0,697	0,612
	Uruguay	0,212	0,482	0,611	1
	Bolivia	0,362	0,414	0,649	HS

El índice de estructuración  $F_{ST}$  entre los clúster Kbol-Kmixto fue de 0,193, próximo a 0,2. De acuerdo con Beebe & Rowe (2008) se puede inferir estos dos clústers están marcadamente diferenciados.

Cuando se analizó el estadístico  $F_{ST}$  entre pares de localidades por país (Tabla X) vemos una fuerte diferenciación genética entre Bolivia y las restantes. Esto reafirma los resultados obtenidos a través del método Bayesiano que emplea el software STRUCTURE, en donde se observaron dos clúster y uno de ellos es

constituido por muestras de Bolivia exclusivamente. Las localidades de Uruguay y Argentina mostraron una leve diferenciación genética ( $F_{ST} > 0,05$ ).

Tabla X: Valores de  $F_{ST}$  entre pares de localidades por país.

Localidades	Argentina	Brasil	Uruguay
Brasil	0,049		
Uruguay	0,094	0,044	
Bolivia	0,208	0,223	0,236

La endogamia global  $F_{IT}$  fue de 0,343 considerando la diferenciación en dos *clúster* y tuvo un valor de 0,363 teniendo en cuenta las cuatro localidades.

#### *Número de migrantes*

Para un tamaño medio de 19,9 individuos muestreados por población y un valor de 0,074 para la frecuencia promedio de alelos privados considerando  $K_{bol}$  y  $K_{mixto}$ , el número de migrantes por generación resultó ser 1,364. Por otro lado, cuando se consideraron las cuatro agrupaciones de localidades el número de migrantes por generación fue de 1,123 (tamaño medio de la muestra por población=9,73; frecuencia promedio de alelos privados=0,107).



### *Análisis factorial de correspondencia*

En la Figura 9 se pueden observar los resultados obtenidos a partir de este análisis. Se puede apreciar que la mayoría de los individuos muestreados en Bolivia se separan de los restantes, mientras que las muestras de las otras localidades aparecen en una única nube de puntos. El primer, segundo y tercer eje contribuyen en un 6,86%, 5,23% y 4,95% a la inercia total respectivamente.

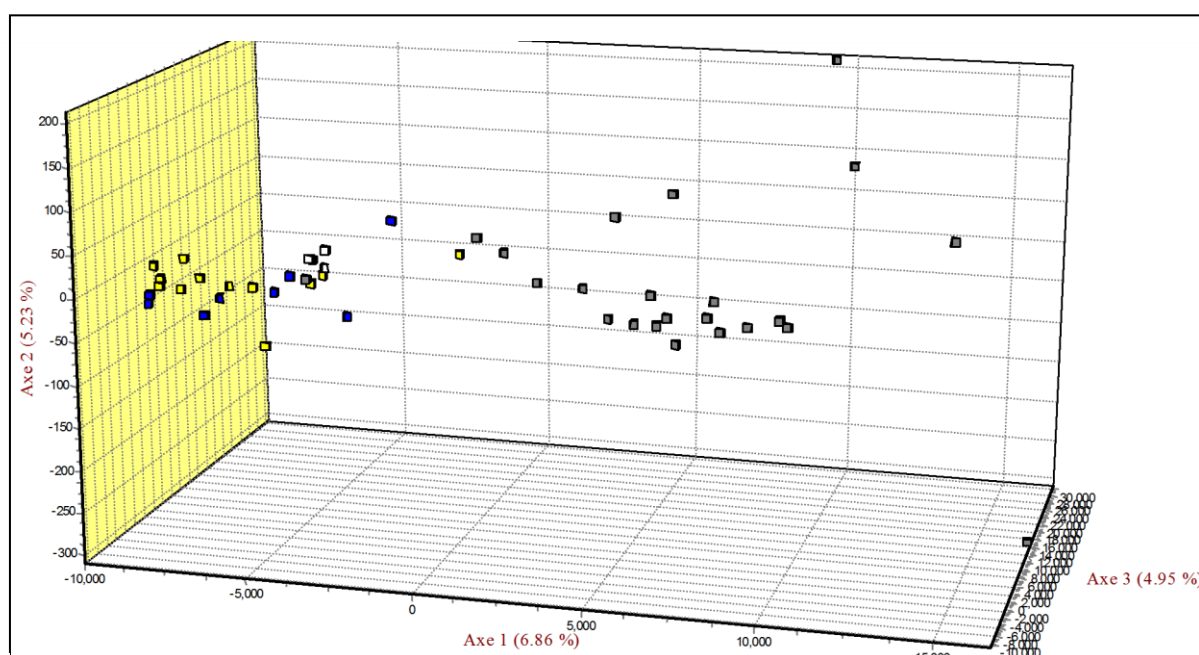


Figura 9: Gráfica en tres dimensiones del análisis factorial de correspondencia. Las localidades por país están representadas con un color diferente: blanco= Uruguay, amarillo= Argentina, azul= Brasil y gris= Bolivia.

### *Relaciones de parentesco*

El coeficiente de parentesco  $r$  fue calculado para cada par de individuos en el mismo *clúster*. Los valores promedio fueron 0,089 (desvío estándar= 0,184) y 0,057 (desvío estándar= 0,114) para Kbol y Kmixto, respectivamente. En la Tabla XI se muestran los valores de  $r$  para aquellas comparaciones que resultaron en Kbol. En el *clúster* Kmixto se analizaron las relaciones entre muestras de localidades por país (Tablas XII y XIII), los resultados de las de Uruguay se describen más adelante en el texto. Los resultados de  $r$  promedio para las muestras de las localidades por país incluidas en Kmixto fueron:

Argentina=0,081 (SD=0,099), Brasil=0,076 (SD=0,103) y Uruguay=0,15 (SD=0,13).

Tabla XI: Matriz de las relaciones de parentesco entre los individuos del *clúster* Kbol. En la diagonal inferior se detalla el coeficiente de parentesco  $r$  y en la superior el tipo de relación de parentesco (FS: hermanos totales; HS: medio hermanos; PO: padre-hijo).

Individuos	ABOL1	A1489	ACB2	ACB3	ACB4	ACB6	ACB61	ALECBB	ALECBE	ALHECBD	ALHEF	BI69	BI61	BI64	BI65	BI70	BI71
ABOL1	-																
A1489	0	-			FS	FS	HS				FS						
ACB2	0,109	0,032	-											HS			
ACB3	0	0	0	-								FS	HS			FS	
ACB4	0	0,472	0	0	-												
ACB6	0	0,601	0	0	0,392	-						PO			HS		
ACB61	0	0,329	0,054	0	0,059	0,254	-										
ALECBB	0	0	0,211	0	0	0	0,027	-									
ALECBE	0,050	0	0	0	0,113	0	0	0	-					FS			
ALHECBD	0	0	0	0	0,123	0	0,177	0,067	0	-							
ALHEF	0	0,377	0	0,047	0,061	0	0	0	0	0	-						
BI69	0	0	0	0,873	0	0,500	0	0	0,523	0	0	-				PO	
BI61	0	0	0	0,292	0	0	0	0	0	0,359	0	0,196	-				
BI64	0,059	0	0,155	0	0	0	0,005	0,005	0,775	0,223	0	0	0	-			
BI65	0	0	0	0,370	0	0,257	0	0	0,287	0	0	0,646	0,239	0	-		
BI70	0,261	0,021	0,252	0	0,021	0	0	0	0,523	0	0,126	0	0	0,201	0,119	-	
BI71	0	0	0	0	0	0,069	0,026	0	0	0	0,141	0	0	0	0	0,046	-

En el *clúster* Kbol se encontraron relaciones de tipo padre-hijo (PO) entre BL69-ACB6 y BL65-BL69, esto podría indicar la presencia de una pareja y su cría (Tabla XI). A su vez, se constataron grupos de hermanos totales (FS) y medio hermanos (HS) (Tabla XI). Dado que ACB6-BL65 exhibieron un vínculo de medios hermanos y, a su vez, resultaron padres de BL69, ésto podría aumentar la endogamia de la población.

Tabla XII: Matriz de las relaciones de parentesco entre los individuos de Argentina del *clúster* Kmixto. En la diagonal inferior se detalla el coeficiente de parentesco  $r$  y en la superior el tipo de relación de parentesco (FS: hermanos totales; HS: medio hermanos; PO: padre-hijo).

Individuos	A200	A201	A202	A203	A23	A400	A402	A441	A442	A447	A109	A444
A200	-	HS				HS	HS					
A201	0,31	-		HS								
A202	0	0,11	-	HS								HS
A203	0	0,18	0,18	-				HS	HS			HS
A23	0	0	0,1	0,04	-			HS		HS		
A400	0,19	0,25	0,08	0,1	0	-						
A402	0,18	0,09	0	0	0	0	-	HS				
A441	0	0	0,08	0	0,27	0,01	0,19	-		HS		
A442	0,12	0	0,08	0,16	0,25	0,07	0	0,08	-		HS	
A447	0	0	0,23	0,18	0,39	0	0	0,24	0,18	-		
A109	0,06	0	0	0,01	0	0,09	0	0	0,15	0	-	HS
A444	0	0,15	0,14	0,16	0	0	0	0	0,01	0	0,26	-

Para las muestras de Argentina en Kmixto se observó que la totalidad de éstas mantiene una relación de tipo medio hermano con alguna otra (Tabla XII). Por otro lado, en las de Brasil se encontró que solo seis mantenían un parentesco de hermanos totales o medios hermanos (Tabla XIII).

Tabla XIII: Matriz de las relaciones de parentesco entre los individuos de Brasil del *clúster* Kmixto. En la diagonal inferior se detalla el coeficiente de parentesco  $r$  y en la superior el tipo de relación de parentesco (FS: hermanos totales; HS: medio hermanos; PO: padre-hijo).

Individuos	A411	A415	A435	A436	A427	A428	A431	A416	A410
A411	-	FS							
A415	0,45	-							
A435	0	0,08	-	HS					
A436	0,11	0	0,25	-				HS	
A427	0	0	0,14	0	-				
A428	0	0,18	0,06	0,15	0	-	HS		
A431	0,03	0,06	0,07	0,31	0,1	0,12	-		
A416	0,01	0,06	0,07	0,2	0,06	0,04	0	-	
A410	0,19	0	0	0	0	0	0	0	-

Entre las muestras de Uruguay se halló una relación de tipo medio hermanos entre A438-A24 y A438-A437, cuyos valores de  $r$  fueron 0,23 y 0,22, respectivamente; mientras que para el par A24-A437 el coeficiente de parentesco fue cero y por lo tanto no estarían relacionados.

#### *Tamaño poblacional estimado en Bolivia*

La estimación de abundancia de Lincoln, considerando un locus para identificar individuos, resultó  $\hat{N}=208$  con un intervalo de confianza  $91 < \hat{N} < 325$ . Sin embargo, el ajuste de Chapman estimó un tamaño poblacional de 118 individuos ( $28 < \hat{N} < 235$ ). En este caso el *software* calculó la presencia de 28 muestras en el conjunto de datos que se distribuyen de la siguiente manera: primer muestreo=13, segundo muestreo=16 y 1 recaptura. Estos resultados no concuerdan con aquellos obtenidos a partir del GeneCap, en donde se identificaron 23 individuos muestreados.

Cuando se realizaron los cálculos permitiendo diferencias en dos loci para determinar individuos, el índice de Lincoln estimó un tamaño poblacional de  $\bar{N}=66$  ( $27 < \bar{N} < 105$ ). Al aplicar la corrección para poblaciones pequeñas la abundancia estimada fue de 51 ( $21 < \bar{N} < 90$ ). El número de individuos muestreados en este escenario fue 21: primer muestreo=12, segundo muestreo=11 y 2 recapturas. El número de individuos muestreados se aproxima al calculado previamente.

## 5.2. Análisis de los *stocks* en cautiverio

En el Anexo 5 se presentan los genotipos obtenidos. Las amplificaciones fueron exitosas para los doce loci, los cuales resultaron polimórficos con una diversidad de 3 (AHTK253) a 18 (FH2561) alelos con un promedio de nueve alelos por locus (Tabla XIV). La probabilidad global de no exclusión para el par parental fue  $4,67 \times 10^{-9}$ , mientras que para la identidad NE-I= $3,03 \times 10^{-14}$  y NE-SI= $1,87 \times 10^{-5}$ . El contenido de información polimórfica (PIC) fue 0,699 y la heterocigosidad esperada media fue 0,747. Los valores para cada locus se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Diversidad alélica (k), número de muestras analizadas (N), probabilidades de no exclusión para el par parental (NE-PP), para la identidad (NE-I) y para la identidad asumiendo que puedan ser hermanos (NE-SI), contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad esperada (Hesp) para el conjunto de muestras en cautiverio.

Locus	k	N	NE-PP	NE-I	NE-SI	PIC	Hesp
FH2140	13	23	0,110	0,033	0,327	0,849	0,882
FH2137	17	23	0,038	0,010	0,290	0,920	0,946
FH2328	9	21	0,164	0,054	0,355	0,796	0,836
FH2535	7	22	0,253	0,089	0,390	0,731	0,782
FH2848	8	23	0,229	0,082	0,389	0,738	0,781
REN105	7	24	0,321	0,124	0,425	0,671	0,727
PEZ19	4	14	0,437	0,168	0,453	0,614	0,704
FH2561	18	19	0,035	0,009	0,288	0,925	0,953
FH2226	11	23	0,168	0,057	0,362	0,786	0,822
FH2054	6	17	0,293	0,102	0,398	0,713	0,777
REN169	3	24	0,718	0,421	0,652	0,338	0,414
AHTK253	5	24	0,683	0,467	0,703	0,313	0,335

El análisis del equilibrio de H-W fue realizado para cada *stock* y dentro de los mismos para cada locus (Tabla XV). No pudo ser estimada la significancia estadística para dicho principio en aquellos loci con un número poco

representativo de muestras amplificadas por *stock*. El valor de  $p$  para los restantes loci fue superior a 0,05 luego de las correcciones de Bonferroni. Ésto refleja un comportamiento neutral de los microsátélites para los distintos conjuntos de muestras. Tampoco se pudo calcular el equilibrio de H-W para el *stock* del zoológico de México debido a que se analizó un solo ejemplar (A413).

Los resultados de dicho análisis para el conjunto de loci en los distintos *stock* en cautiverio (excepto para el ejemplar del zoológico de México) revelaron que se encuentran en equilibrio de H-W (Argentina  $p=0,999$ , Brasil  $p=0,712$ , Europa  $p=1$ , EUA  $p=1$ ).

Tabla XV: Valores de la probabilidad ( $p$ ) para el test del equilibrio H-W y el coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  para cada locus en los *stocks* en cautiverio Argentina, Brasil, Europa y EUA.

Argentina			Brasil			Europa			EUA		
Locus	$p$	$F_{IS}$	Locus	$p$	$F_{IS}$	Locus	$p$	$F_{IS}$	Locus	$p$	$F_{IS}$
FH2140	0,679	0,333	FH2140	0,996	- 0,161	FH2140	1	0	FH2140	0,785	-0,389
FH2137	0,959	0	FH2137	0,999	- 0,078	FH2137	1	- 0,333	FH2137	1	- 0,282
FH2328	1	- 0,333	FH2328	0,999	0,067	FH2328	1	- 0,333	FH2328	1	- 0,111
FH2535	1	- 0,5	FH2535	0,19	- 0,073	FH2535	1	- 0,333	FH2535	1	- 0,191
FH2848	1	0	FH2848	0,825	0,121	FH2848	-		FH2848	1	- 0,143
REN105	0,707	0,238	REN105	0,496	0,379	REN105	1	- 0,333	REN105	1	- 0,143
PEZ19	1	- 0,333	PEZ19	0,01	1	PEZ19	-		PEZ19	-	
FH2561	0,955	0,182	FH2561	1	- 0,059	FH2561	-		FH2561	1	- 0,333
FH2226	0,249	- 0,032	FH2226	0,9715	- 0,069	FH2226	-		FH2226	1	- 0,263
FH2054	1	- 0,200	FH2054	0,999	- 0,12	FH2054	1	- 0,333	FH2054	1	- 0,333
REN169	-		REN169	-		REN169	-		REN169	-	
AHTK253	1	- 0,125	AHTK253	1	- 0,071	AHTK253	-		AHTK253	-	

El coeficiente  $F_{IS}$  para cada locus en los distintos *stocks* cautivos refleja la presencia (signo positivo) o ausencia (signo negativo) de exceso de homocigotas (Tabla XV). En Argentina el valor de  $F_{IS}$  varió entre -0,5 (FH2535) y 0,333 (FH2140), presentando exceso de homocigotas FH2140, REN105 y FH2561. Para las de Brasil quedaron comprendidos dentro del rango de - 0,161 (FH2140) y 0,379 (REN105), en donde aquéllos con exceso de homocigotas fueron: FH2848, REN105, FH2328 y PEZ19.

El coeficiente estimado para el grupo de los zoológicos de Europa fue -0,333. El *stock* de Front Royal (EUA) corresponde a un grupo familiar y también

exhibió valores negativos. En estos dos últimos grupos no se encontró exceso de homocigotas para ningún loci.

### 5.2.1. Diversidad génica y diversidad interna

Se examinó la contribución de cada *stock* a la diversidad génica por los métodos descritos anteriormente (Tabla XVI). Los valores de GD (Caballero & Toro, 2002) variaron entre 0,683 (Brasil) y 0,717 (Europa). Los resultados de GD revelaron que todos los grupos tienen contribuciones positivas, siendo el de Brasil el que presenta la diversidad génica menor.

La diversidad interna fue positiva para los *stocks* Europa, EUA y México; por lo tanto, dado que aportan a la diversidad alélica sería importante incluir sus ejemplares en los planes de cría en cautiverio. En el caso de las muestras de EUA se trata de un grupo familiar y, por consiguiente, la diversidad dentro del grupo es baja, sin embargo, los alelos de dichos individuos son diferentes a los encontrados en los restantes.

Tabla XVI: Diversidad génica (GD) e interna evaluadas para las muestras de los zoológicos de Argentina, Brasil, Europa, EUA y México.

<i>Stock</i>	GD	Diversidad Interna
Argentina	0,698	-2,010
Brasil	0,683	-11,221
Europa	0,717	0,995
EUA	0,703	7,794
México	0,716	1,098

Estos valores pueden estar influenciados por el número dispar de muestras entre los diferentes zoológicos, ya que en Argentina y Brasil se cuenta con un número mayor de individuos que en México (n=1) y Europa (n=2).

### 5.2.2. Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad observada y esperada

En la Tabla XVII se muestran los resultados obtenidos para cada grupo en cautiverio definido y para el total. Brasil presentó el mayor valor de PIC (53,68%) y México el menor quizá porque se trata de una sola muestra (18,18%). La heterocigosidad observada se distribuyó en un rango comprendido entre 0,519 (EUA) y 0,733 (Europa), y la esperada entre 0,364 (México) y 0,671 (Brasil). En el total la heterocigosidad observada y esperada revelaron una diferencia de 0,095, siendo levemente superior a la esperada.

Tabla XVII: Heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), contenido de información polimórfica (PIC) para cada *stock* en cautiverio (Argentina, Brasil, Europa, EUA, México) y para el total.

<i>Stock</i>	Hobs	Hesp	PIC
Argentina	0,662	0,547	38.15%
Brasil	0,657	0,671	53.68%
Europa	0,733	0,469	28.91%
EUA	0,519	0,405	24.68%
México	0,727	0,364	18.18%
Total	0,634	0,729	69.95%

La heterocigosidad observada y esperada para Brasil fueron similares, al igual que en EUA. Sin embargo, para Europa y México resultaron diferentes y para Argentina fueron levemente distintos.

### 5.2.3. Coeficientes de coancestría molecular, endogamia individual y parentesco

Fue calculado el promedio del coeficiente de coancestría molecular de cada animal, con respecto al total ( $f_{prom}$ ) y a sus respectivos stocks ( $f_{prom\ Stock}$ ). Para el conjunto total el individuo A412 presentó el  $f_{prom}$  más bajo (0,159) por lo cual, debería ser considerado al momento de seleccionar individuos reproductores (Tabla XVIII). Este coeficiente presentó el valor más alto para

A425 (0,349), el  $f_{prom}$  en los restantes individuos varió entre 0,163 (A409) y 0,341 (A426).

Cuando se observan los  $f_{prom}$  de cada *stock* ( $f_{promStock}$ ) se pueden identificar animales para cada grupo de cautiverio cuyos genotipos se encuentran escasamente representados, lo que los hace excelentes candidatos para asegurar la diversidad genética en cautiverio (Tabla XVIII). De esta manera en Argentina debería ser considerado A409 (0,204), en Brasil A412 (0,195) y Europa A439 (0,513). De los individuos parentales en EUA (señalados con asterisco en la Tabla XVIII) 114164 presentó un valor levemente menor (0,611), mientras que de las crías el ejemplar 114749 presentó un valor de 0,597.

El coeficiente de endogamia individual de Ritland ( $F_i$ ) reveló que aquellos individuos con valores mayores a cero comparten cierta ascendencia y por lo tanto no deberían ser considerados para reproducción (Tabla XVIII). Dentro del *stock* Argentina A406 y A408 fueron quienes mostraron un  $F_i$  elevado, mientras que en Brasil la mayoría de los valores obtenidos fueron negativos o cercanos a cero excepto para A421. Los animales en zoológicos de Europa y México no mostraron un coeficiente elevado, esto mismo fue visualizado para el grupo familiar de EUA (Tabla XVIII).



Tabla XVIII: Coeficiente de coancestría molecular promedio de cada individuo con respecto al total de animales en cautiverio ( $f_{prom}$ ), coeficiente de coancestría molecular promedio de cada ejemplar con respecto a su *stock* ( $f_{prom Stock}$ ) y coeficiente de endogamia individual ( $F_i$ ). Con asterisco se indican los ejemplares parentales del grupo de EUA.

Individuo	Stock	$f_{prom}$	$f_{prom Stock}$	$F_i$
A405	Argentina	0,258	0,416	0,033
A406	Argentina	0,329	0,513	0,407
A408	Argentina	0,256	0,403	0,212
A409	Argentina	0,163	0,204	- 0,100
A440	Argentina	0,284	0,410	- 0,012
A412	Brasil	0,159	0,195	- 0,082
A417	Brasil	0,276	0,343	- 0,0877
A418	Brasil	0,266	0,321	0,062
A419	Brasil	0,274	0,323	- 0,064
A420	Brasil	0,302	0,367	- 0,064
A421	Brasil	0,260	0,329	0,119
A422	Brasil	0,301	0,369	- 0,019
A423	Brasil	0,333	0,406	0,029
A424	Brasil	0,238	0,335	- 0,004
A425	Brasil	0,349	0,405	0,089
A426	Brasil	0,341	0,392	0,073
A439	Europa	0,278	0,513	- 0,076
A443	Europa	0,286	0,546	0,026
114286*	EUA	0,315	0,619	0,024
114464*	EUA	0,281	0,611	0,149
114749	EUA	0,293	0,597	0,039
114750	EUA	0,324	0,644	0,038
114751	EUA	0,313	0,640	0,096
114752	EUA	0,287	0,635	0,0087
A413	México	0,253	0,636	0,029

El coeficiente de coancestría molecular entre individuos y para cada ejemplar fue calculado en los distintos *stocks* (Tabla XIX). A partir de estos resultados se pueden observar las relaciones de coancestralidad entre individuos del mismo y diferente *stock*.

Tabla XIX: Coeficiente de coancestría molecular para cada ejemplar y par de individuos en cautiverio. Se indica con distinto color y etiqueta el grupo al que pertenecen las muestras. Los animales parentales del zoológico de EUA están señalados con asterisco (\*).

Individuos	A405	A406	A408	A409	A440	A413	A412	A417	A418	A419	A420	A421	A422	A423	A424	A425	A426	A439	A443	114286*	114464*	114749	114750	114751	114752
A405	0,708																								
A406	0,438	0,875																							
A408	0,432	0,5	0,636																						
A409	0,063	0,25	0,083	0,5																					
A440	0,438	0,5	0,364	0,125	0,625																				
A413	0,364	0,357	0,275	0,063	0,295	0,636																			
A412	0,125	0,219	0,159	0,063	0,229	0,114	0,542																		
A417	0,273	0,344	0,25	0,063	0,227	0,159	0,275	0,591																	
A418	0,25	0,438	0,318	0,063	0,292	0,188	0,227	0,386	0,708																
A419	0,271	0,25	0,227	0,063	0,25	0,104	0,318	0,318	0,229	0,625															
A420	0,182	0,281	0,2	0,25	0,227	0,159	0,275	0,318	0,295	0,386	0,636														
A421	0,205	0,25	0,225	0,25	0,182	0,205	0,182	0,25	0,182	0,205	0,225	0,682													
A422	0,159	0,281	0,175	0,25	0,205	0,091	0,25	0,295	0,25	0,409	0,545	0,225	0,682												
A423	0,225	0,417	0,2	0,333	0,25	0,175	0,25	0,389	0,275	0,3	0,444	0,45	0,472	0,7											
A424	0,114	0,25	0,15	0,188	0,182	0,25	0,175	0,295	0,205	0,273	0,318	0,375	0,341	0,417	0,636										
A425	0,536	0,458	0,375	0,125	0,429	0,143	0,292	0,357	0,464	0,357	0,321	0,417	0,393	0,4	0,357	0,786									
A426	0,225	0,321	0,278	0,188	0,225	0,125	0,25	0,417	0,35	0,35	0,389	0,4	0,361	0,444	0,222	0,458	0,8								
A439	0,375	0,393	0,275	0,167	0,35	0,175	0,306	0,225	0,25	0,275	0,275	0,222	0,275	0,361	0,25	0,333	0,25	0,6							
A443	0,25	0,375	0,273	0,188	0,271	0,146	0,341	0,273	0,313	0,292	0,318	0,205	0,341	0,3	0,205	0,286	0,35	0,425	0,667						
114286*	0,194	0,208	0,194	0,167	0,306	0,111	0,194	0,194	0,139	0,25	0,25	0,167	0,278	0,222	0,111	0,35	0,344	0,222	0,25	0,722					
114464*	0,1	0,143	0,167	0,125	0,2	0,075	0,175	0,175	0,2	0,225	0,25	0,15	0,25	0,194	0,1	0,167	0,306	0,139	0,225	0,472	0,75				
114749	0,125	0,156	0,136	0,188	0,167	0,083	0,136	0,182	0,188	0,188	0,273	0,227	0,273	0,3	0,114	0,179	0,375	0,2	0,25	0,528	0,625	0,708			
114750	0,175	0,179	0,15	0,25	0,275	0,125	0,222	0,225	0,15	0,275	0,275	0,167	0,275	0,222	0,125	0,292	0,438	0,2	0,225	0,639	0,611	0,575	0,75		
114751	0,094	0,2	0,188	---	0,281	0,156	0,214	0,214	0,156	0,219	0,25	0,286	0,214	0,357	0,179	0,167	0,333	0,25	0,219	0,667	0,625	0,594	0,571	0,813	
114752	0,125	0,167	0,167	0,083	0,225	0,075	0,15	0,194	0,125	0,2	0,194	0,175	0,222	0,222	0,111	0,3	0,333	0,156	0,15	0,688	0,583	0,55	0,719	0,571	0,7

El coeficiente de parentesco ( $r$ ) promedio para el total de las muestras analizadas fue 0,071 (SD=0,155). Éste fue calculado entre animales del mismo grupo así como también se obtuvieron el tipo de relaciones de parentesco (PO=padre-hijo, FS=hermanos totales y HS=medio hermanos) entre los individuos (Tabla XX, Tabla XXI y Tabla XXII). Entre los animales de Europa (A439 y A443)  $r$  fue 0,36 pudiendo tener una relación de medios hermanos entre ellos. El ejemplar de México no mostró estar relacionado con ningún otro.

Tabla XX: Coeficiente de parentesco  $r$  (bajo la diagonal) y las relaciones entre los individuos de los zoológicos de Argentina (por encima de la diagonal).

Individuo	A405	A406	A408	A409	A440
A405	-	HS	HS		FS
A406	0,26	-	FS	HS	HS
A408	0,42	0,33	-		HS
A409	0	0,17	0,1	-	
A440	0,43	0,34	0,21	0	-

Entre los individuos de los zoológicos de Argentina se encontró un  $r$  promedio de 0,226 (SD=0,158) variando entre 0 (A409-A440) y 0,43 (A405-A440). Se observó que A408-A406 y A405-A440 tendrían una relación de hermanos totales. Por otro lado A405-A409, A408-A409 y A409-A440 no estarían relacionados. Los restantes individuos exhibieron una relación de medios hermanos entre ellos (Tabla XX).

Para las muestras de cautiverio brasileras, el coeficiente de parentesco promedio fue 0,097 con 0,136 de desvío estándar, cuyos valores pareados fueron comprendidos entre 0 y 0,65 (A420-A422) (Tabla XXI). Se encontró que el par A420-A422 podrían ser padre-hijo y a su vez A420 tendría como hermano total a A419. Esto último nos indicaría que quizá A420 sea madre o hija de A422 y hermana total de A419, sin embargo, entre A419 y A422 habría una relación de tipo medio hermanos cuando se esperaría una relación de tipo tío-sobrino que el *software* no calcula (Tabla XXI). En total se

encontraron doce pares de individuos que posiblemente tengan una relación de medios hermanos (Tabla XXI).

Tabla XXI: Coeficiente de parentesco  $r$  (bajo la diagonal) y las relaciones entre los individuos de los zoológicos de Brasil (por encima de la diagonal).

Individuo	A412	A417	A418	A419	A420	A421	A422	A423	A424	A425	A426
A412	-					HS			HS		
A417	0	-	HS								
A418	0,02	0,34	-								HS
A419	0	0,06	0	-	FS		HS				
A420	0	0	0	0,29	-		PO	HS	HS		
A421	0,15	0	0	0	0	-		HS	HS	HS	
A422	0	0	0	0,31	0,65	0	-	HS	HS		
A423	0	0,16	0,1	0	0,16	0,36	0,35	-	HS		
A424	0,12	0,11	0	0	0,13	0,32	0,22	0,26	-	HS	
A425	0,01	0	0,12	0	0	0,23	0,14	0,22	0,14	-	
A426	0	0,06	0,15	0,05	0	0	0	0,03	0	0,08	-

Dado que los ejemplares del *SCBI-Front Royal* de Estados Unidos constituyen un grupo familiar el valor de  $r$  promedio ( $r=0,577$ ,  $SD=0,152$ ) fue el más alto comparándolo con los obtenidos para otros grupos. Entre los padres se observó una relación de medios hermanos ( $r=0,21$ ) y uno de ellos (114464) presentó una relación de tipo padre-hijo con toda su descendencia (Tabla XXII). Por otro, lado el individuo parental 114286 mostró una relación de hermano total con dos de sus crías (114750 y 114752) y algunos de los hermanos un parentesco padre-hijo (Tabla XXII).

Tabla XXII: Coeficiente de parentesco  $r$  (bajo la diagonal) y las relaciones (por encima de la diagonal) entre los individuos del zoológico del *Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal* de EUA. El asterisco (\*) indica los parentales.

Individuo	114286*	114464*	114749	114750	114751	114752
114286*	-	HS	PO	FS	PO	FS
114464*	0,21	-	PO	PO	PO	PO
114749	0,5	0,7	-	PO	FS	PO
114750	0,66	0,58	0,57	-	FS	FS
114751	0,59	0,5	0,45	0,48	-	FS
114752	0,81	0,53	0,55	0,81	0,42	-

#### 5.2.4. Estadísticos $F$

Los coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) para cada *stock* variaron entre -0,244 (EUA) y 0,051 (Brasil), exhibiendo la mayoría de ellos valores negativos (Tabla XXIII). De esta manera no se estaría frente a escenarios de endogamia en los grupos de muestras de los distintos zoológicos analizados. El *stock* de EUA mostró la menor variabilidad intra (1-Qintra) e interindividual (1-Qinter), lo cual era de esperarse ya que se trata de un grupo familiar. A nivel intraindividual presentaron mayor variabilidad los animales de los zoológicos europeos, mientras que a nivel interindividual aquéllos en Brasil (Tabla XXIII). No se pudo calcular para México porque se cuenta con una única muestra.

El estimador de la endogamia global  $F_{IT}$  para el conjunto de muestras en cautiverio fue 0,119.

Tabla XXIII: Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) según la varianza de la identidad alélica, se detallan las variabilidades intra (1-Qintra) e interindividual (1-Qinter), para cada *stock* en cautiverio (Argentina, Brasil, Europa, EUA).

<i>Stock</i>	1-Qintra	1-Qinter	$F_{IS}$
Argentina	0,638	0,622	- 0,026
Brasil	0,669	0,706	0,051
Europa	0,700	0,575	- 0,217
EUA	0,525	0,422	- 0,244

Entre los grupos de animales en zoológicos de distintos países se calculó el grado de diferenciación génica mediante el estadístico  $F_{ST}$  (Tabla XXIV). Cuando se comparó EUA con las demás, en todos los casos se pudo ver una fuerte diferenciación entre ellas. Entre los restantes *stocks* se visualizó una leve diferencia ( $0,2 > F_{ST} > 0,05$ ). Se observa diferenciación genética en todos los grupos en cautiverio incluidos en este estudio, lo cual era esperable ya que algunos *stocks* están constituidos por grupos de animales altamente relacionados y esto sesgaría el análisis.

Tabla XXIV: Valores de  $F_{ST}$  entre pares de *stocks* en cautiverio.

<i>Stock</i>	Argentina	Brasil	Europa	EUA
Brasil	0,122			
Europa	0,111	0,077		
EUA	0,374	0,263	0,393	
México	0,057	0,051	0,179	0,459

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis de poblaciones silvestres

#### *Caracterización de loci de microsatélites e Identificación de estructura genética*

Los errores de genotipado encontrados tanto para el análisis que incluyó la totalidad de las muestras como dentro de cada *clúster* pueden ser explicados por la reducida cantidad y calidad del ADN colectado a través de métodos no invasivos. A su vez, el aumento del número de loci empleados en este tipo de muestras incrementa la probabilidad de observar errores de genotipado. De esta manera resulta, crucial determinar el número óptimo de loci polimórficos, para ello se recomienda evaluar entre diez y quince loci en aproximadamente 30 muestras (Taberlet *et al.*, 1999; Waits *et al.*, 2001; Waits & Paetkau 2005). La presencia de tartamudeo fue detectada únicamente en tres loci cuyos repetidos son dinucleótidos (AHTK253, REN105 y REN169), lo cual es muy frecuente para este tipo de repetidos (Oosterhout *et al.*, 2004).

Se discute en primer lugar la caracterización de los marcadores para el total de muestras en su conjunto. Posteriormente se analiza la identificación de estructura genética y las frecuencias alélicas de los microsatélites para cada *clúster*.

Para el total de muestras el análisis de desequilibrio de ligamiento entre loci reveló que la mayoría de los mismos no eran heredados de manera independiente. Si bien no se sabe con certeza la ubicación de estos loci en *C. brachyurus*, se conoce que en perro doméstico están presentes en distintos cromosomas (Tabla I). El número cromosómico de aguará guazú ( $2n=76$ ) es muy similar al que presenta el género *Canis* al que pertenece el perro doméstico ( $2n=78$ ). Una comparación cromosómica, basada en la morfología y en el patrón de bandas, entre *Canis lupus* (lobo gris) y aguará guazú sugirió que comparten un ancestro común similar a un lobo (Wayne *et al.*, 1987 en Rodden *et al.*, 2004). Consecuentemente, no se esperaría encontrar

diferencias en la ubicación de dichos loci en *C. brachyurus* con respecto al que exhiben en *Canis lupus familiaris*. Una posible causa del desequilibrio de ligamiento observado entre loci es la presencia de subdivisión poblacional. Si las frecuencias alélicas entre subpoblaciones difieren, puede generar asociaciones no aleatorias entre alelos de distintos loci (Allendorf & Luikart, 2007).

El apartamiento de los loci del equilibrio H-W, así como el exceso de homocigotas detectado, puede ser explicado por el efecto Wahlund. Este efecto ocurre cuando la mezcla de subpoblaciones sin reproducción provoca déficit de heterocigotas (o exceso de homocigotas) (Allendorf & Luikart, 2007).

En conjunto, los once microsatélites analizados tienen un alto contenido de información polimórfica y valores de probabilidad de no exclusión adecuados. Esto sugiere que pueden ser utilizados tanto para análisis de estructura genética poblacional como para identificación individual y asignación de parentesco.

La estructura genética poblacional podría estar sesgando los resultados obtenidos con respecto a la neutralidad de los marcadores utilizados. Mediante el análisis Bayesiano realizado en el *software* STRUCTURE se detectó la presencia de estructura genética. El número más probable de *clústers* fue dos, uno conformado por individuos de Bolivia y el otro por individuos de distintas localidades (Uruguay, Bolivia, Argentina, Brasil). Schwartz & McKelvey (2009) estudiaron como distintos esquemas de muestreo pueden influir en la correcta identificación de estructura genética. Dentro de los seis escenarios que plantean estos autores se encuentra el muestreo mixto, éste es probablemente el tipo de muestreo más común para carnívoros y fue el que se utilizó en esta investigación para obtener las muestras analizadas. Esta metodología combina muestras obtenidas a partir de eventos de caza o colectas ocasionales y esfuerzos de muestreo en proyectos de investigación. El área de Bolivia parece diferente y única, sin



embargo esto puede ser un artefacto muestral, ya que se cuenta con un mayor esfuerzo de muestreo en esa localidad. Se recomienda analizar patrones de autocorrelación (Schwartz & McKelvey, 2009). En este trabajo se realizó un análisis de parentesco como medida de autocorrelación.

Los resultados del desequilibrio de ligamiento y equilibrio de H-W para cada locus en ambos grupos, reflejan que la presencia de poblaciones mezcladas sin reproducción estaba sesgando los resultados obtenidos a partir del total de muestras.

Para el *clúster* de Bolivia se encontró que los loci eran heredados de manera independiente, mientras que para el otro grupo se identificó que un locus (AHTK253) se encontraba en desequilibrio de ligamiento y, por lo tanto, fue excluido en análisis posteriores. A su vez, se detectaron microsatélites en equilibrio H-W para cada *clúster* y si bien se encontró exceso de homocigotas los valores de  $F_{IS}$  fueron menores en comparación con el detectado para el total de las muestras. El locus FH2848 no se encuentra bajo equilibrio H-W en ninguno de los dos agrupamientos. Dado que este microsatélite no había sido amplificado anteriormente en *C. brachyurus* tal apartamiento podría ser explicado por su asociación con un carácter sometido a alguna fuerza de selección. Por otro lado, las desviaciones del equilibrio H-W en los restantes loci podrían deberse a cuestiones biológicas como son el apareamiento no azaroso, la dramática declinación poblacional y cuellos de botella. Otras posibles causas relacionadas con la metodología podrían ser el pequeño tamaño muestral en algunas localidades, la no detección de alelos nulos en ciertos loci y la presencia de subestructuración moderada que no pudo ser detectada con el método utilizado. Las dos causales más probables en este escenario serían el reducido número de muestras en algunas localidades y la posible presencia de subestructura.

Por otra parte, el alto contenido de información polimórfica encontrado para el conjunto de loci en los dos grupos apoya el potencial que presentan para estudios genéticos poblacionales. Los valores obtenidos para NE-PP, NE-SI,

NE-I en ambos *clústers* reafirman que el conjunto de loci provee elevada confiabilidad para asignar paternidad, identificar hermanos e individuos.

#### *Análisis entre clúster y localidades*

Los valores de endogamia global  $F_{IT}$  entre Kbol y Kmixto (0,343) y entre las localidades por país (0,363) fueron muy similares. Los resultados indican un apartamiento de la población global del equilibrio H-W por un exceso de homocigotas; lo cual es consistente con lo encontrado para cada locus considerando el total de las muestras.

El análisis factorial de correspondencia (AFC) arrojó resultados similares a aquellos obtenidos con el método Bayesiano que emplea el programa STRUCTURE. Se observan dos nubes de puntos, una compuesta por muestras de Bolivia y otra por individuos de distintas localidades. Ambas se encuentran conectadas por individuos que podrían haber migrado de otra población a Bolivia. A su vez, cuatro muestras colectadas en Bolivia se alejan de la nube de puntos pudiendo ser diferentes a los demás ejemplares analizados. Este resultado podría estar sesgado por los diferentes esfuerzos de muestreo en las distintas localidades, así como también por la falta de muestras en otras áreas cercanas a los sitios de colecta en Bolivia.

El índice de estructura genética  $F_{ST}$  entre Kbol y Kmixto reafirma la marcada diferenciación entre éstos ( $F_{ST}=0,19$ ). Los resultados de este índice entre las localidades por país, revelan que las muestras de Bolivia son fuertemente diferentes a las demás. Sumado al efecto causado por diferentes esfuerzos de muestreo, la región de Bolivia presenta una cobertura vegetal diferente a las otras áreas (Fig. 5). En dicha región predomina la presencia de bosques mientras que las otras son áreas donde predominan cultivos, pudiendo esto ocasionar diferencias en los patrones de flujo génico. Por otro lado, entre los restantes puntos de colecta se detectó una moderada diferenciación. Con respecto a estos valores se puede inferir que las muestras procedentes de Uruguay se diferencian en mayor grado con las de Argentina que con las de

Brasil y que entre las de Brasil y Argentina se observa una moderada diferenciación.

Este análisis con microsatélites exhibió un bajo nivel de estructura genética, mientras que en otro estudio realizado a partir de secuencias de ADN mitocondrial se detectó la presencia de cinco grupos o Unidades de Conservación (González *et al.*, *en prep*). Los grupos identificados con ADN mitocondrial fueron: Uruguay, Argentina (Corrientes, Santa Fé), Bolivia y dos en Brasil (Emas y Araza Gaia, Belo Horizonte, Franca, Chapada do Sul) (González *et al.*, *en prep*). Las diferencias entre los resultados obtenidos a partir del ADN mitocondrial y loci nucleares coinciden con lo esperado en especies cuyas hembras tienen menor dispersión y flujo génico que los machos. En estos escenarios la estructura es detectada mediante estudios con marcadores que se heredan por vía materna (Avise, 1995; Cosse, 2010). Asimismo durante la dispersión de juveniles de aguará guazú, se han encontrado hembras filopátricas (Emmons *et al.*, 2012<sup>a</sup>). Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de marcadores nucleares y mitocondriales estarían reflejando distintas escalas temporales. El alto grado de polimorfismo de los microsatélites los hace adecuados para realizar inferencias sobre eventos genéticos poblacionales actuales (Fredsted *et al.*, 2005). El uso de secuencias de la región control del ADN mitocondrial nos permiten obtener información del pasado reciente (Prates, 2008). Para poder realizar afirmaciones sobre la estructura genética actual de la especie es necesario aumentar los esfuerzos de muestreo e incluir otras localidades de Paraguay, Brasil y Perú.

El número de migrantes por generación considerando  $K_{bol}$  y  $K_{mixto}$  ( $N_m=1,364$ ) fue muy similar al obtenido teniendo en cuenta las localidades por país ( $N_m=1,123$ ). Dado que existe una leve diferenciación entre las muestras de Argentina, Brasil y Uruguay, se esperaba encontrar un menor número de migrantes en el análisis por localidad. Si bien se detectan diferencias entre las localidades de muestreo, tales pueden ser originadas por las disparidades en el número de muestras, dificultando el cálculo de  $N_m$ .

En este escenario el cálculo para los dos *clústers* (Kbol y Kmixto) resulta más apropiado que el realizado por localidades. Cuando  $Nm=1$  se considera que hay un migrante por generación lo cual es considerado el umbral crítico por encima del cual las subpoblaciones no divergirán genéticamente a causa de la deriva génica (Wang, 2002). Además, en conservación un migrante por generación es considerado un nivel adecuado de flujo génico (Wang, 2002). Cierta nivel de conectividad entre subpoblaciones es esencial para mantener la variabilidad genética, adaptación local y prevenir la endogamia (Wang, 2002; Beebee & Rowe, 2008). Un migrante por generación corresponde al límite inferior de la cantidad de flujo génico deseable. Sin embargo, en ciertas ocasiones las poblaciones reales presentan desviaciones de las condiciones ideales que asume la regla de un migrante por generación. En estas situaciones será necesario más de un migrante por generación en promedio. Como una regla adecuada para propósitos genéticos se sugiere un mínimo de uno y un máximo de diez migrantes por generación (Mills & Allendorf, 1996). El valor obtenido entre los grupos fue próximo a uno y, por lo tanto, existiría divergencia entre ambos. Para algunas especies un migrante por generación resulta apropiado, pero para otras con alto riesgo de depresión endogámica este valor es su límite superior. En el caso que existan datos demográficos y ecológicos detallados, lo más conveniente sería determinar el número de migrantes necesarios (Wang, 2002).

#### *Análisis dentro de clústers y localidades*

Ninguno de los *clústers* (Kbol y Kmixto) se encontraron bajo equilibrio H-W, además presentaron valores de  $F_{IS}$  mayores a cero. La causa más común de exceso de homocigotas es el apareamiento no azaroso de los individuos o la presencia de subdivisión poblacional (Allendorf & Luikart, 2007). Se puede discriminar si la causa de tal exceso es debida a la presencia de endogamia o a la inclusión de múltiples poblaciones en un único grupo. La presencia de endogamia reducirá la frecuencia de heterocigotas en todos los loci (Allendorf & Luikart, 2007). En ambos *clústers* se observa una menor proporción de heterocigotas que lo esperado según el equilibrio H-W para

cada locus, se puede entonces plantear la existencia de endogamia en ambos grupos. A pesar de que los valores positivos de  $F_{IS}$ ,  $K_{bol}$  y  $K_{mixto}$  tienen una alta diversidad intraindividual e interindividual lo cual indica que retienen variabilidad genética. Dado que los valores de  $F_{IS}$  obtenidos fueron bajos y que los resultados de  $F_{ST}$  revelan diferencias moderadas entre las localidades de muestreo, no se puede descartar la presencia de subestructura. Para indagar en éste aspecto se deberían aumentar los esfuerzos de muestreo.

La presencia de cuellos de botella poblacionales podrían ocasionar desvíos del equilibrio H-W. No obstante, de acuerdo a los resultados presentados en esta tesis no se estaría frente a tal situación dado que no se detectó un exceso de heterocigotas con respecto a lo esperado (Cornuet & Luikart, 1996; Cosse, 2010). Poblaciones con tamaños fluctuantes o dinámicas cíclicas pueden generar la pérdida de señal genética de eventos de cuello de botella (Pimm *et al.*, 1989; McEachern *et al.*, 2011). En este sentido, son necesarios estudios sobre dinámicas poblacionales en aguará guazú a lo largo del tiempo.

Para las localidades por país se obtuvieron valores positivos de  $F_{IS}$ , reteniendo cada una de ellas variabilidad genética. Aquellas colectadas en Uruguay ( $n=3$ ) y Brasil ( $n=9$ ) se hallaron en equilibrio H-W. El número de muestras para dichas localidades fue reducido y, por lo tanto, los valores de significancia del test de  $X^2$  para analizar el equilibrio H-W no fueron robustos. Por otro lado, Brasil presentó el menor valor de  $F_{IS}$ , mientras que Bolivia presentó el mayor valor para este índice.

Los valores promedio de parentesco ( $r$ ) para las muestras de un mismo país fueron bajos. Sin embargo, los desvíos estándar en Bolivia, Brasil y Uruguay son elevados lo que refleja la alta variabilidad de los datos. Las muestras de Brasil presentaron el menor valor promedio para  $r$  y se encontraron pocas muestras con cierto grado de relacionamiento. Con respecto a las muestras de Uruguay se puede inferir que las dos muestras procedentes de Cerro Largo tendrían una relación de medios hermanos, mientras que una de ellas

(feca colectada en Cerro Largo) mantendría una relación de medio hermano con el individuo cazado en Rio Negro. De esta manera se podría plantear la posible presencia de un grupo familiar en nuestro país (Mannise *et al.*, 2012; Anexo 6). Las muestras de Argentina mantendrían una relación de medios hermanos con alguna otra de la misma localidad. Esto al parecer no habría afectado la variabilidad genética que retienen las mismas y podrían pertenecer a uno o más grupos familiares. Entre las muestras de Bolivia se observa que existen una alta proporción de muestras emparentadas, incluso algunas relaciones podrían afectar el grado de endogamia. Dado que las muestras fueron colectadas en localidades muy próximas (las mas distantes se encuentran a 150km aproximadamente) y que los individuos de la especie tienen extensos áreas de vida, resulta esperable que los individuos de Bolivia mantengan relaciones de parentesco.

La presencia de muestras emparentadas en una misma localidad podría indicar la existencia de patrones de autocorrelación local. De esta manera las divergencias temporales y espaciales asociadas a dichas muestras podrían causar errores en la asignación de subestructuración poblacional (Schwartz & McKelvey, 2009). Por ejemplo, las localidades de Bolivia parecen únicas y diferentes a las demás. Esto podría ser un artefacto ya que dicha zona se encuentra a la misma escala que el patrón de autocorrelación cuando debería estar asociado a las propiedades del área de muestreo (Schwartz & McKelvey, 2009).

#### *Tamaño poblacional estimado en Bolivia*

La aproximación más utilizada para estimar el tamaño poblacional es la de captura-recaptura, la cual requiere la identificación de los individuos. Éstos han sido adaptados para el uso de metodologías no invasivas, que utilizan el número de individuos muestreados y la probabilidad asociada de detectar un animal. Asume que los individuos son correctamente identificados y que todos tienen la misma probabilidad de ser muestreados (Long & Zielinski, 2008).

Dentro del conjunto de datos se identificaron muestras cuyos genotipos coincidían con otros ( $n=14$ ). El programa utilizado (GeneCap) presenta algunas ventajas frente a otros ya que permite evaluar errores de genotipado en muestras con genotipos similares, emplea probabilidades para asignar coincidencias y puede operar en ausencia de datos. A su vez, excluye muestras redundantes para estimar las frecuencias alélicas que podría afectar la estimación de  $P(ID)$  (Wilberg & Dreher, 2004). En este sentido, se encontraron siete muestras problemáticas las cuales tenían una alta proporción de loci sin amplificar y, por lo tanto, podían coincidir con uno o más genotipos de manera errónea. De esta manera GeneCap las registró y excluyó del análisis de coincidencia genotípica. Se reconocieron 23 genotipos únicos y, por lo tanto, éste sería el número de individuos muestreados en Bolivia. Los valores de  $P(ID)$  fueron suficientemente bajos y, por lo tanto, adecuados para realizar estudios de captura-recaptura (Taberlet & Luikart, 1999).

Se considera la estimación del tamaño poblacional calculada a partir de diferencias en dos loci ya que se encontraron muestras con ausencia de datos que podrían incidir en la identificación de individuos. Además el número de individuos muestreados fue más cercano ( $n=21$ ) al calculado previamente con GeneCap ( $n=23$ ). Los resultados obtenidos a partir del estimador de Chapman poseen menor sesgo en la estimación, esto los hace más adecuado. La abundancia estimada a partir del índice de Chapman fue de 51 individuos con un amplio intervalo de confianza ( $21 < \bar{N} < 90$ ). Este último depende del tamaño de la muestra, estudios con un gran tamaño muestral tienden a ser más precisos y por lo tanto sus intervalos de confianza son más pequeños. Sin embargo, la abundancia estimada concuerda con los datos obtenidos por Emmons *et al.* (2012<sup>b</sup>) en donde consideran la presencia de aproximadamente 20-30 parejas en el Parque Nacional Noel Kempff (PNK) en Bolivia. Este grupo de investigadores ha tenido un seguimiento de los animales del Parque a través de radiocollares, collares con GPS, fotografías y capturas. La mayoría de las muestras incluidas en la estimación efectuada en

esta tesis son procedentes de PNK, tan solo nueve fueron obtenidas de otras localidades de Bolivia que se encuentran en un rango de 10km a 100km de distancia del PNK.

## 6.2. Análisis de los *stocks* en cautiverio

El conjunto de loci presentó un elevado contenido de información polimórfica así como también valores adecuados para las probabilidades de no exclusión. Por lo tanto, este conjunto de microsatélites permitirá identificar individuos, relaciones de parentesco y efectuar estudios de variabilidad genética entre y dentro de los *stocks*. A su vez, los marcadores REN169 y AHTK253 serán menos informativos en análisis de diversidad y parentesco porque presentaron los niveles más bajos de PIC y heterocigosidad.

Con respecto al equilibrio H-W se detectó que en el *stock* de Brasil el locus PEZ19 exhibía un leve desvío y un déficit de heterocigotas ( $F_{IS}=1$ ). Dado que tal exceso de homocigotas (o déficit de heterocigotas) sería locus específico, se plantea la posible presencia de alelos nulos. Este fenómeno ocasiona un exceso de homocigotas aparente de acuerdo a las proporciones esperadas para el equilibrio H-W (Allendorf & Luikart, 2007). Si bien en algunos *stocks* se observan otros marcadores con índices  $F_{IS}$  relativamente altos, éstos no reflejaron desviaciones del equilibrio H-W. Así mismo, un alto número de loci tuvieron valores negativos de  $F_{IS}$  revelando un leve exceso de heterocigotas. Este último escenario puede ser ocasionado por la selección de individuos menos emparentados entre sí para apareamiento o porque los heterocigotas tengan una mayor probabilidad de supervivencia. Sin embargo, la ventaja diferencial de los heterocigotas tiene que ser lo suficientemente grande para que el efecto sea detectado en las proporciones genotípicas (Allendorf & Luikart, 2007). En este sentido los excesos de heterocigotas registrados tampoco causaron desvíos del equilibrio H-W, por lo tanto, los loci tendrían un comportamiento neutral.



El reducido número de muestras en algunos *stocks* imposibilitó el cálculo de  $F_{IS}$  y el de la probabilidad asociada al análisis de  $X^2$  para el equilibrio de H-W en algunos loci. Por el mismo motivo tampoco pudo ser computado para la muestra de México. Los *stocks* en cautiverio se encontraron en equilibrio H-W, ésto podría deberse a un sesgo provocado por el reducido número de muestras por *stock*. El grupo familiar del zoológico de Front Royal (EUA) se encuentra en equilibrio a pesar del alto grado de parentesco entre los individuos. El método del test exacto para el equilibrio H-W utilizado es recomendado para un reducido tamaño muestral de una población (Guo & Thompson, 1992). De todas maneras el número de individuos fue muy bajo para los *stocks* de Argentina (n=5), Europa (n=2) y EUA (n=6). El número de muestras obtenido de cada *stock* es menor a la cantidad de animales presentes en cada Institución. Por lo tanto los resultados obtenidos para cada *stock* se encuentran influenciados por el número de muestras obtenidas.

#### *Diversidad y variabilidad genética de los stocks*

La diversidad génica positiva de cada *stock* definido reveló que ninguno tiene una contribución relevante en la diversidad global. De esta manera los grupos tendrían igual importancia para la conservación. Por otro lado, los *stocks* de Europa, EUA y México mostraron una diversidad interna positiva, contribuyendo a la diversidad alélica global. En este sentido el grupo de EUA demostró ser el que aportaría más, presentando mayores diferencias genéticas con los demás *stocks*, por lo que se torna importante su adecuado manejo para la conservación de dicho *stock*.

El parámetro PIC hace referencia al poder de un conjunto de marcadores para detectar polimorfismos dentro de una subpoblación, dependiendo del número de alelos detectables y la distribución de sus frecuencias alélicas (Gutiérrez & Goyache, 2009). El conjunto de loci utilizado demostró ser altamente informativo para los *stocks* de Brasil, Argentina y Europa. Dado que EUA está conformado por un grupo familiar, era esperable que tuvieran un moderado o débil contenido de información polimórfica. Dichos valores

obtenidos reafirman el adecuado uso de estos loci en estudios de parentesco y variabilidad genética dentro y entre los *stocks*.

La heterocigosidad esperada provee la medida de variabilidad genética con mayor significado biológico cuando se exploran las consecuencias del apareamiento (Templeton & Read, 1994). Brasil presentó el mayor valor de Hesp siendo el grupo que retendría mayor variabilidad. Aquéllos con una y dos muestras (México y Europa) así como también el grupo familiar de Front Royal exhibieron los valores más bajos. El valor global fue elevado, lo que significa que el total de las muestras mantendría variabilidad genética (Tabla XVII). Las heterocigosidades observada y esperada fueron similares para el total y para cada *stock*, excepto para México y Europa que tienen uno y dos animales, respectivamente. Se puede inferir que los apareamientos podrían haber ocurrido de manera azarosa, reflejando un buen manejo de los animales dentro y entre zoológicos.

Si bien los *stocks* definidos en este trabajo no siempre representan grupos que cohabitan en el mismo zoológico, la mayoría comparten una historia común. Los zoológicos europeos, incluyendo Krefeld, comenzaron a trasladar animales desde Brasil y Argentina a partir de 1960. Entre 1965 y 1967 fueron transportados los primeros siete individuos desde América del Sur hacia zoológicos en Estados Unidos. Asociaciones entre instituciones de EUA y Europa facilitaron el intercambio entre ambos continentes, mientras que en los siguientes años existieron traslados entre zoológicos de EUA, Europa y América del Sur. A partir de estos y otros intercambios que ocurrieron posteriormente, se conformó una población cautiva de 80 individuos descendientes de 32 animales fundadores (Songsasen & Rodden, 2010). Los resultados obtenidos reflejan el buen manejo de los *stocks* definidos ya que se observan altos niveles de heterocigosidad a pesar de que mantienen una historia de conexiones. Incluso cuando los *stocks* no corresponden a animales en un mismo zoológico, están constituidos por aquéllos que tienen un mayor intercambio entre sí (por ejemplo: entre el zoológico de la Plata y el de Buenos Aires, ambos en el *stock* aquí definido como Argentina). De esta

manera, se habrían manejado adecuadamente los apareamientos entre animales de distintos zoológicos.

#### *Estadísticos F*

Para el conjunto de muestras de animales en cautiverio no se encontró endogamia y tampoco para cada *stock*. Esto es congruente con los datos de variabilidad tratados anteriormente y confirma el buen manejo de las cruzas de animales dentro y entre los zoológicos. El grupo Brasil presentó el grado más alto de variabilidad interindividual, ésto coincide con los resultados de parentesco y coancestralidad obtenidos. Por otro lado, a pesar de que los ejemplares de EUA son un grupo familiar con índices de coancestría y parentesco elevados no se registró endogamia.

El *stock* de EUA mostró una fuerte diferencia genética con los demás, lo que ya había sido vislumbrado en el análisis de diversidad. Las restantes comparaciones reflejaron moderadas diferencias entre los grupos. A partir de esta información se podría inferir que sería adecuada la reproducción entre animales de distintos agrupamientos. Sin embargo, algunas cruzas aportarían mayor variabilidad genética y evitarían la consanguinidad. De esta manera, no sería apropiado seleccionar arbitrariamente los individuos reproductores.

#### *Determinación de relaciones de parentesco y selección de reproductores.*

Con la finalidad de comprobar la eficiencia de los marcadores y el método utilizado para asignar parentesco, se realizó el análisis para el grupo familiar de EUA cuyos parentescos son conocidos. Entre las crías y sus padres se encontró cierta discrepancia con lo esperado. Uno de los padres exhibió una relación de hermanos totales con dos de sus crías, a pesar de que los valores de  $r$  fueron mayores a 0,5. Algunas de las crías presentaron relaciones de tipo padre-hijo, ésto podría ocurrir porque los padres de esta camada mantienen un coeficiente de parentesco elevado pudiendo ser medios hermanos. Si se observan los genotipos obtenidos para cada locus, se puede observar que los descendientes tienen un alelo proveniente de cada uno de sus progenitores (Anexo 5). Para el locus FH2140, la cría 114751 exhibió un alelo nuevo. La

amplificación de dicho locus fue repetida tres veces para el grupo familiar, por lo tanto, se sospecha que pueda tratarse de una mutación *de novo* en este individuo. Sería apropiado explorar otros programas computacionales que calculen coeficientes de parentesco y que permitan un mayor grado de resolución en la asignación de tipo de relaciones.

El uso de información molecular resulta valioso cuando se quieren manejar poblaciones con registros genealógicos inexactos o ausentes (Ivy *et al.*, 2009). Se encontró cierta congruencia entre los datos obtenidos a partir del coeficiente de coancestralidad molecular ( $f$ ) y el de parentesco ( $r$ ). La muestra de México no se encontró emparentada ni mantendría relaciones de ancestralidad con ninguna otra, mientras que las de Europa podrían ser medios hermanos mostrando mantener mayor grado de coancestralidad entre ellos que con cualquier otro individuo. Por otro lado, los valores de  $r$  promedio y  $f$  fueron más altos para el *stock* de Argentina que para el de Brasil. Dentro de los animales de Argentina se encontró que comparten en mayor medida ancestros entre sí que con animales de otros grupos, pudiéndose identificar dos grupos de hermanos totales (FS) y cinco de medios hermanos (HS). El único animal de dicho grupo que se encuentra menos emparentado con los de su mismo *stock* es A409, que mantiene una relación de HS con A406. Entre los ejemplares de Brasil se encontró que A420-A422 podrían ser padre-hijo, incluso A419 podría ser hermano total de A420 y por lo tanto tío de A422. El *software* utilizado no distingue tíos-sobrinos pero reveló que existía una relación de tipo HS entre A422-A419, reafirmando el parentesco entre ellos. En el *stock* de Brasil se identificaron otras posibles relaciones de medios hermanos, siendo el individuo A426 el que estaría menos emparentado con los demás.

En los programas de conservación *ex situ* se deben abordar dos cuestiones centrales: seleccionar individuos reproductores y resolver de qué manera se van a aparear. Para elegir estos animales deberían basarse en minimizar la coancestralidad promedio entre los individuos que van a reproducirse ponderado por su contribución a la próxima generación (Ballou & Lacy,

1995). Ésto último es equivalente a maximizar el tamaño efectivo poblacional en una subpoblación (Caballero & Toro, 2002). Si se considera que el conjunto de animales en cautiverio constituyen una población y que cada *stock* representa una subdivisión de la misma, debería seleccionarse aquellos individuos con menor coancestralidad promedio. En este sentido el individuo A412 (Brasil) presentó el menor valor de coancestralidad promedio y, por lo tanto, sería un candidato para posibles apareamientos con otros animales tanto del mismo como de distinto *stock*. En caso de que los intercambios entre *stocks* no sean viables, se reconocieron individuos candidatos en cada uno de ellos. Dentro del grupo de Argentina el ejemplar A409 presentó la coancestralidad promedio más baja, mientras que para Europa no se puede efectuar una recomendación dado que los resultados fueron muy similares para los dos animales. También debe considerarse que el grupo de hermanos de Front Royal pueda reproducirse con animales de otros *stocks*.

A partir del coeficiente de endogamia individual se puede identificar aquellos ejemplares que comparten ascendencia y, que por lo tanto, deberían ser descartados como posibles reproductores. Dos animales de Argentina (A406 y A408) exhibieron valores elevados y, por lo tanto, se aconseja no tomarlos en cuenta a la hora de seleccionar reproductores. El grupo de EUA reveló que los individuos comparten cierta ascendencia con otros, lo cual es esperable ya que se trata de un grupo familiar. Sin embargo, los valores fueron levemente mayores a cero, lo cual podría ser explicado porque este *stock* aporta mayor diversidad alélica al total y es distinto genéticamente a los demás.

Los dos ejemplares candidatos para reproducción (A409 y A412) exhibieron los valores más bajos de coancestría promedio ( $f$ ) ya sea con otros de igual o distinto *stock*. Ambos ejemplares son hembras y, por lo tanto, se debería considerar un individuo macho para reproducción. Algunos animales de distintos grupos comparten un grado de coancestralidad considerable y, por lo tanto, la reproducción entre éstos debería ser evitada. Un par de ejemplos: A406 (Argentina), A423 (Brasil) y A408 (Argentina), A425 (Brasil).

La auto-coancestría de cada animal es una medida relacionada con la endogamia individual. Los dos individuos que podrían ser candidatos para reproducción tuvieron los valores más bajos. El ejemplar A419 posee el índice más bajo entre los machos y su endogamia individual fue negativa. Una pareja de reproductores potenciales podría ser A419-A409, al igual que A405-A412. El macho A413 (México) no reveló valores altos de coancestría y podría ser considerado para apareamientos. Las dos muestras de Europa son hembras y ambas mantienen bajos valores de coancestralidad con A413, por lo tanto, serían posibles parejas reproductoras. Además, el macho del *stock* de México parece no compartir ancestros con los animales de Front Royal por lo que puede ser un potencial reproductor con alguna de las hembras del grupo.

### 6.3. Implicancias para la Conservación

En el 2008 se elaboró el Plan de Acción para la Conservación del aguará guazú: Análisis de Viabilidad Poblacional y de Hábitat (PHVA) (Paula *et al.*, 2008). En aquella instancia se realizaron talleres con el objetivo de definir estrategias compartidas y proponer acciones para la conservación de esta especie amenazada. El proceso de evaluación de viabilidad poblacional se basó en simulaciones desarrolladas por un *software* (Vortex) específico para modelos de dinámicas poblacionales (Paula *et al.*, 2008). A partir de datos biológicos y sociológicos el modelo estima riesgos y dificultades para el manejo poblacional. Dentro de los problemas prioritarios delineados en dicho trabajo se encuentran la falta de información acerca de la estructura genética entre poblaciones de aguará guazú y la ausencia de trabajos sobre diversidad genética de sus poblaciones locales. Ambos datos son necesarios para estimar la viabilidad de las poblaciones (Paula *et al.*, 2008). En este sentido esta tesis aporta información valiosa que debería ser considerada en futuros análisis de viabilidad poblacional. Se ha detectado una alta variabilidad genética en cada una de las localidades así como también dentro de los *clústers* genéticos identificados. Para implementar estrategias de conservación el grupo de Bolivia podría ser considerado una Unidad de

Manejo. Sin embargo, el muestreo diferencial en esta área podría ocasionar que parezca única y distinta a las demás. Dado que se encontraron diferencias genéticas moderadas entre las localidades del grupo mixto y se cuenta con un reducido número muestral, no se puede afirmar que las restantes localidades conforman una única Unidad de Manejo. Sería necesario un mayor esfuerzo de muestreo para indagar sobre la existencia de las Unidades de Manejo.

Si bien el estudio aquí presentado es una evaluación genética, un monitoreo podría brindar mayor información acerca del efecto que tienen distintos factores antrópicos (como el uso del suelo y la construcción de carreteras) en las poblaciones de la especie. Se debe distinguir monitoreo de evaluación genética. Esta última implica analizar las características poblacionales en un único momento, mientras que el monitoreo lo hace a lo largo del tiempo (Schwartz *et al.*, 2007).

En el marco del Taller PHVA se identificaron los principales objetivos que tiene mantener *stocks ex situ* de *C. brachyurus*. En primer lugar la educación ambiental tiene un rol destacado, ya que existen diversos mitos y leyendas en torno a la misma y se conoce poco de su problemática actual. A su vez se trata de una especie elusiva y, por lo tanto, investigaciones científicas en animales en cautiverio generan aportes para estudios de ejemplares en vida libre. Resulta de suma importancia mantener poblaciones *ex situ* que retienen diversidad genética en el caso de que sean requeridas para su reintroducción (Paula *et al.*, 2008). La muestra en cautiverio estudiada demostró mantener variabilidad genética y ha permitido identificar que el *stock* de EUA (Front Royal) es diferente genéticamente a los restantes. Además, el grupo de Brasil estaría compuesto por individuos menos emparentados y exhibió el valor más alto de diversidad. En este sentido también se identificaron parejas reproductoras potenciales para mantener la variabilidad genética y evitar la consanguinidad.

## 7. CONCLUSIONES

- El conjunto de loci de microsatélites utilizado es apropiado para realizar estudios de parentesco ya que los niveles de polimorfismo son elevados y sus probabilidades de no exclusión permiten identificar individuos y parentesco. El poder de estos marcadores para determinar relaciones de parentesco fue comprobado mediante el genotipado del grupo familiar de EUA (Front Royal). Además los loci pueden ser usados para estudios genético poblacionales ya que segregarían de manera independiente y tendrían un comportamiento neutral.
- Se identificaron dos *clústers* genéticamente más probables en vida libre. Uno conformado por individuos exclusivamente de Bolivia y, el otro, por animales de distintas localidades (Uruguay, Bolivia, Argentina y Brasil). Entre ambos se detectó la presencia de aproximadamente un migrante por generación, existiendo divergencia entre ellos. Sin embargo, deberían aumentarse los esfuerzos de muestreo para determinar la existencia de Unidades de Manejo y eliminar el sesgo muestral.
- Las muestras de Uruguay se diferencian genéticamente en mayor grado con las de Argentina que con las de Brasil. En base a los coeficientes de parentesco encontrados para las muestras de Uruguay, se plantea la posible presencia de un grupo familiar en nuestro país.
- Entre los individuos de las localidades de Brasil y Argentina se observa una moderada diferenciación genética. Las muestras procedentes de Argentina podrían pertenecer a uno o más grupos familiares, dado que mantienen elevados coeficientes de parentesco.
- Se estimó la presencia de 23 individuos muestreados en Bolivia y un tamaño poblacional de 51 animales. Se observó que existen una alta



proporción de ejemplares emparentados y, por lo tanto, la posible presencia de grupos familiares.

- El total de los individuos en cautiverio presentaron una alta variabilidad genética, siendo Brasil el *stock* con mayor diversidad. El grupo familiar de EUA (Front Royal) presentó una fuerte diferencia genética con los demás grupos. Los restantes *stocks* cautivos revelaron diferencias genéticas moderadas entre ellos.
- Se identificaron las hembras A412 (Brasil) y A409 (Argentina) como posibles candidatas reproductoras en cautiverio. También se reconocieron dos posibles parejas para mantener la diversidad genética y evitar la consanguinidad: A419 (macho, Brasil), A409 y A405 (macho, Argentina), A412. El macho A413 (México) podría ser considerado para apareamientos con las dos muestras de Europa o con las hembras de Front Royal.

## 8. PERSPECTIVAS

Se considera relevante aumentar los esfuerzos de muestreo tanto en las localidades incluidas en esta tesis y de otros sitios de su área de distribución (del norte de Brasil y en Paraguay). Esto permitirá analizar la estructura genética poblacional eliminando sesgos muestrales. Asimismo, sería enriquecedor incluir muestras de áreas potenciales para su distribución y de zonas con coberturas vegetales similares a las de Bolivia. Por lo tanto, muestras de Paraguay, Perú y centro oeste de Brasil aportarían valiosa información para efectuar correlaciones entre el paisaje y flujo génico. De igual modo permitiría identificar Unidades de Manejo de una manera más ajustada. También sería relevante aumentar el número de individuos muestreados en cautiverio.

Realizar un monitoreo genético aproximadamente cada cinco años (ventana temporal que coincide con el tiempo generacional) de las poblaciones silvestres para estimar el efecto de distintas presiones antrópicas sobre las mismas. Monitorear las poblaciones cautivas sería aconsejable en la medida en que surjan nacimientos o introducciones de individuos en los distintos zoológicos.

Resultaría necesario para el diseño de planes de manejo calcular el tamaño efectivo para poblaciones *in situ* y *ex situ*.

En el caso de que no se cuente con la procedencia de los animales en cautiverio, se podría determinar a qué población o Unidad de Manejo pertenecen. Ésto sería crucial si se presentaran las condiciones y la necesidad de efectuar reintroducciones.

Para llevar a cabo planes de conservación es elemental desarrollar tareas de difusión acerca del conocimiento adquirido e involucrar a los distintos actores sociales. En este sentido, se considera que los resultados obtenidos deberían ser presentados ante las instituciones gubernamentales que tienen competencia en los recursos naturales a nivel nacional (DINAMA-SNAP-

MVOTMA, RENARE-MGAP) y regional (IBAMA en Brasil, Ministerio de Ambiente en Argentina). De igual manera los datos sobre cautiverio estarían a disposición del Plan de Supervivencia del aguará guazú de la Asociación de Zoológicos y Acuarios (AZA). Sería pertinente organizar campañas de divulgación para que la información recabada alcance a otros ciudadanos y, de esta manera, se logre comprender y sensibilizar sobre la problemática a la que se enfrenta el aguará guazú.

## 9. BIBLIOGRAFÍA:

- Achaval F, Clara M & Olmos A. 2004. Mamíferos de la República Oriental del Uruguay. 1º ed. Imprimex. Montevideo, Uruguay: 176pp.
- Allendorf FW & Luikart G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Pub., Malden, Oxford: 642pp.
- Avise JC. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9 (3): 686- 690.
- Azara F. 1802. Apuntamientos para la historia natural de los cuadrúpedos del Paraguay y Río de la Plata. Volumen 1. Imprenta de la Viuda de Ibarra. Madrid: 318pp.
- Ballou JD & Lacy RC. 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in captive populations. En: *Population Management for Survival and Recovery*. (eds: Ballou JD, Gilpin M & Foose TJ). pp: 76–111. Columbia University Press, New-York. Citado por: Caballero A & Toro M. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 3:289-299.
- Balloux F & Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Bandeira de Melo LF, Lima Sábato MA, Vaz Magni EM, Young RJ & Coelho C M. 2007. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger 1815): as revealed by GPS tracking collars. *Journal of Zoology*, 271(1):27-36.
- Barton NH & Slatkin M. 1986. A Quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56:409-415.
- Beebee T & Rowe G. 2008. *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, Oxford.400pp.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II. Montpellier, France.

- Bellemain E & Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursos arctos*) feces. *Molecular Ecology Notes* 4(3):519–522.
- Berta A. 1984. The Pleistocene bush dog, *Speothos pacivorus* (Canidae) from the Lagoa Santa Caves, Brazil. *Journal of Mammalogy*, 65(4):549-559.
- Blixen O. 1992. Los mitos Sudamericanos sobre el origen del fuego. *Anales del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 2(VIII):5-41.
- Blouin MS. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 18:503-511.
- Botstein D, White RL, Skolnick M & Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- Breen M, Jouquand S, Renier C, Mellersh CS, Hitte C, Holmes NG, Chéron AI, Suter N, Vignaux F, Bristow AE, Priat C, McCann E, André C, Boundy S, Gitsham P, Thomas R, Bridge WL, Spriggs HF, Ryder EJ, Curson A, Sampson J, Ostrander EA, Binns MM & Galibert F. 2001. Chromosome-Specific Single-Locus FISH Probes Allow Anchorage of an 1800-Marker Integrated Radiation-Hybrid/Linkage Map of the Domestic Dog Genome to All Chromosomes. *Genome Research*, 11:1784-1795.
- Brookfield JFY. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5:453-455.
- Bruzzi Lion M. 2007. Diversidad genética y conservación de agurá guazú. Tesis de Maestría en Ecología, Instituto de Ciencias Biológicas- Departamento de Ecología. Universidad de Brasilia, Brasil: 57pp.
- Bruzzi Lion M, Eizirik E, Garda AA, Da Fontoura- Rodrigues ML, Rodriguez FHG & Marinho- Filho JS. 2011. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. *Genetica*, 139:269-381.
- Caballero A & Toro MA. 2000. Interrelations between effective population size and other pedigree tools for the management of conserved populations. *Genetics Research*, 75:331-343.
- Caballero A & Toro M. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 3:289-299.

- Chapman DG. 1951. Some properties of the hypergeometric distribution with applications to zoological sample censuses. University of California Publ. Stat. 1(7): 131-160.
- Chapuis MP & Estoup A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3):621-631.
- Cornuet JM & Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144 (4):2001-2014.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A & Solignac M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153:1989-2000.
- Cosse M. 2010. Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*: Pautas para su conservación. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UdelaR. 202pp.
- Courtenay O. 1994. Conservation of the Maned Wolf: fruitful relationships in a changing environment. *Canid News*, 2:41-43.
- Da Fontoura Rodrigues M L, Lima-Rosa C A, Tchaika L, Valdez F P, Rodrigues FHG, Paula R, Gough MP, Johnson WE, Bonatto SL & Eizirik E. 2008. Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular Ecology Resources*, 8(4):898-900.
- De Almeida Jácomo AT. 1999. Nicho alimentar do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus* Illiger, 1811) no Parque Nacional das Emas- Go. Tesis de Maestría en Biología. Universidade Federal de Goiás, Brasil: 33pp.
- De Mattos PSR, Del Lama MA, Toppa RH & Arno Rudi Schwantes AR. 2004. Populational genetic structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B):639-644.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdés 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.

- Dietz JM. 1984. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Smithsonian Contribution to Zoology (Smithsonian Institution Press, Washington), 6:51 pp.
- Dietz JM. 1985. *Chrysocyon brachyurus*. Mammalian Species, 234: 1-4.
- Do Passo Ramalho F. 2011. Tamanho populacional de lobos- guará (*Chrysocyon brachyurus*) em uma Área Protegida de Cerrado no sudeste do Brasil. Tesis de Maestría en Genética y Evolución, Universidade Federal de Sao Carlos. Sao Carlos, Brasil: 61pp.
- Eisen J A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. En Microsatellites: evolution and applications (eds: Goldstein DB & Schlötterer C). pp: 34-48. Oxford University Press, Oxford; New York.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5: 435-445.
- Emmons LH. 2012. Introduction: Study Site and Methods En: The Maned Wolves of Noel Kempff Mercado National Park. (ed. Emmons LH). pp: 1- 14. Smithsonian Contribution to Zoology (Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington).
- Emmons LH, Chávez V, Del Aguila LF, Angulo S & Muir MJ. 2012<sup>a</sup>. Social Interactions and Reproduction En: The Maned Wolves of Noel Kempff Mercado National Park (ed. Emmons LH). pp: 57- 75. Smithsonian Contribution to Zoology (Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington).
- Emmons LH, Chávez V, Del Aguila LF, Angulo S & Muir MJ. 2012<sup>b</sup>. Ranging Patterns En: The Maned Wolves of Noel Kempff Mercado National Park (ed. Emmons LH). pp: 25- 36. Smithsonian Contribution to Zoology (Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington).
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology, 14:2611-2620.
- Evetts IW, Weir BS. 1998. Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists. Sinauer Associates Inc. Maine, USA. 278pp.

- Francisco L, Langsten A, Mellersh C, Neal C & Ostrander E. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7(5):359-362.
- Franco Berriel MR. 2004. Genetic Variability of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. University of Amsterdam- Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Genetics Program. Amsterdam- Washington: 46pp.
- Fredsted T, Pertoldi C, Schierup MH & Kappeler PM. 2005. Microsatellite analyses reveal fine-scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Molecular Ecology*, 14 (8):2363-2372.
- González S, Franco R, Cosse M, Emmons L, Vynne C, Duarte J & Maldonado JE. 2009. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). 172 pp. The 10 th International Mammalogical Congress. Mendoza, Argentina.
- González E & Martínez Lanfranco J. 2010. Mamíferos del Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. 1º ed. Ediciones de la Banda Oriental. Montevideo, Uruguay: 463pp.
- González S, Cosse M, Franco Berriel MR, Emmons LH, Vynne C, Duarte JMB, Beccacesi MD & Maldonado JE. *En preparación*. Conservation Genetic of the vulnerable maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger,1815) in a fragmented landscape scenario.
- Guo SW & Thompson EA. 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, 48:361-372.
- Gutiérrez JP, Royo L J, Álvarez I & Goyache F. 2005. MolKin v2.0: A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information. *Journal of Heredity*, 96:718-721.
- Gutiérrez JP & Goyache F. 2009. User's Guide MolKin v3.0. A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information. España. 20pp.
- Hartl DL & Clark AG. 1989. Principles of population genetics 2nd edition. Sinauer Associates, Sanderland, Massachusetts- USA. 682pp.



- Hedrick PW. 2001. Conservation genetics: where are we now?. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11):629-636.
- Illigeri CD. 1811. *Prodromus Systematis mammalium et avium*. Berlin: 301pp.
- ISAG Canine Panel. 2005. Disponible en: [www.isag.us/Docs/consignmentforms/2005ISAGPanelDOG](http://www.isag.us/Docs/consignmentforms/2005ISAGPanelDOG).  
Último acceso 28 de diciembre del 2012.
- IUCN. 2002. IUCN Technical Guidelines on the Management of Ex-situ populations for Conservation. Approved at the 14th Meeting of the Programme Committee of Council. Gland, Switzerland: 4pp.
- Ivy JA, Miller A, Lacy RC & DeWoody JA. 2009. Methods and Prospects for Using Molecular Data in Captive Breeding Programs: An Empirical Example Using Parma Wallabies (*Macropus parma*). *Journal of Heredity*, 100(4):441-454.
- Jarne P & Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10):424- 429.
- Kalinowski ST, Wagner AP & Taper ML. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6:576-579.
- Kalinowski ST, Taper ML & Marshall TC. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16:1099-1106.
- Lacey EA, Maldonado JE, Clabaugh JP & Matocq MD. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology*, 8(10):1754-1756.
- Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A & Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12):2453-2465.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, deJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin C-W, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli K-P, Parker HG, Pollinger JP, Searle SMJ, Sutter NB, Thomas R, Webber C & Lander ES. 2005. Genome

- sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438:803-819.
- Lincoln FC. 1930. Calculating waterfowl abundance on the basis of banding returns. Department of Agriculture- USA, Circular 118: 1-4.
- Long RA & Zielinski WJ. 2008. Designing Effective Noninvasive Carnivore Surveys  
En Noninvasive survey methods for carnivores (eds: Long RA, Mackay P, Zielinski WJ & Ray JC). pp: 8- 44. Island Press, Washington DC.
- Maldonado, J E. 2010. Using non-invasive fecal DNA analysis to estimate the presence, distribution and abundance of endangered San Joaquin Kit foxes in the Topaz Solar Farm project study area. Final Report to Althouse and Meade Inc. 28pp.
- Mannise N, Cosse M, Repetto L, Franco Berriel MR, Maldonado JE & González S. 2012. Análisis genético sobre la presencia de aguará guazú (Carnivora, Mammalia) en Uruguay *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 21:30-38.
- Marshall T. 1998-2007. Cervus 3.0 help. Field Genetics Ltd. Copyright Tristan Marshall.
- McEachern M, Vuren D, Floyd C, May B & Eadie J. 2011. Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conservation Genetics*, 12(1):285-296.
- McKelvey KS & Schwartz MK. 2005. Dropout: a program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Molecular Ecology Notes*, 5:716-718.
- McKelvey K. 2008. GenCapture 1.4 help. Rocky Mountain Research Station. USA.
- Medrano JF, Aasen E & Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8:43.
- Mellersh CS, Langston AA, Acland GM, Fleming MA, Ray K, Wiegand NA, Francisco LV, Gibbs M, Aguirre GD & Ostrander EA. 1997. A Linkage Map of the Canine Genome. *Genomics*, 46:326-336.
- Mellersh CS, Hitte C, Richman M, Vignaux F, Priat C, Jouquand S, Werner P, André C, DeRose S, Patterson DF, Ostrander EA & Galibert F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*, 11(2):120-130.

- Mills LS & Allendorf, FW. 1996. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology*, 10 (6): 1509- 1518.
- Mones A & Olazarri J. 1990. Confirmacion de la existencia de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) en el Uruguay: (Mammalia: Carnivora: Canidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 174(XII):1-6.
- Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M & Hetzel DJS. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10:654-660.
- Moore M, Brown SK & Sacks BN. 2010. Thirty-one short red fox (*Vulpes vulpes*) microsatellite markers. *Molecular Ecology Resources*, 10:404–408.
- Moritz C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(10):373-375.
- Moritz C, Lavery S & Slade R. 1995. Using information from allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. En: *Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining unique units in population conservation* (ed: Nielsen JL). Pp: 249-262. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- Moritz C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*, 130:217-228.
- Murphy M A, Waits LP & Kendall KC. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 12(8):2261-2265.
- Neff MW, Broman KW, Mellersh CS, Ray K, Acland GM, Aguirre GD, Ziegle JS, Ostrander EA & Rine J. 1999. A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics Society of America*, 151 803-820.
- Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetic*, 41:225-233.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512pp.

- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM & Shipley PF. 2003-2005. Micro-checker User Guide. The University of Hull.
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Willis DPM & Shipley P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.
- Palsbøll PJ, Bérubé M & Allendorf FW. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(1):11-16.
- Paetkau D, Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3:489-495.
- Paula RC, Medici P & Goncalves Morato R. 2008. Maned Wolf Action Plan. Icmbio, Brasilia: 291 pp.
- Petersen CGJ. 1896. The yearly immigration of young plaice into the Limfjord from the German Sea. *Report of the Danish Biological Station*, 6:5-84.
- Petit RJ, El Mousadik A & Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844-855.
- Perini FA, Russo CAM & Schrago CG. 2010. The evolution of South American endemic canids: a history of rapid diversification and morphological parallelism. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 311- 322.
- Pimm SL, Gittleman J, McCracken GF & Gilpin M. 1989. Genetic bottlenecks: alternative explanations for low genetic variability. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 176-177
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E & Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6:847-859.
- Prates PHSJ. 2008. Diversidade genética e historia evolutiva do lobo guará. Tesis de Doctorado en Biociencias. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil: 66pp.
- Prevosti FJ, Bonomo M & Tonni EP. 2004. La distribución de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) (Mammalia: Carnívora: Canidae) durante el holoceno en la Argentina: implicancias paleoambientales. *Mastozoología Neotropical*, 11(1):27-43.

- Prigioni CM & Sappa A. 2003. Aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en el área natural protegida Potrerillo de Santa Teresa. Acta Zoológica Platense 6(1):1-8.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959.
- Pritchard JK, Wena X & Falushb D. 2009. Documentation for Structure software: Version 2.3.
- Queirolo D & Motta-Junior J. 2007. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. Acta Theriologica, 52(4):391-402.
- Queirolo D, Moreira JR, Soler L, Emmons LH, Rodrigues FHG, Pautasso AA, Cartes JL & Salvatori V. 2011. Historical and current range of the Near Threatened maned Wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. Oryx 45(2):296-303.
- Queller DC, Strassmann JE & Hughes CR. 1993. Microsatellites and kinship. Trends in Ecology & Evolution, 8(8):285-288.
- Raymond M & Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. Journal of Heredity, 86:248-249.
- Rice WR. 1989. Analysing tables of statistical tests. Evolution, 43: 223-225.
- Richman M, Mellersh CS, André C, Galibert F & Ostrander EA. 2001. Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome-wide screens of the canine genome. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 47:137-149.
- Ritland K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. Genetics Research, 67:175-185.
- Rodden M, Rodrigues F & Bestelmeyer S. 2004. Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815). En: Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan (eds Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M. & Macdonald, D.W.): 38–43. IUCN/Species Survival Commission Canid Specialist Group. Gland, Switzerland & Cambridge, UK.

- Rodden M, Rodrigues F & Bestelmeyer S. 2008. *Chrysocyon brachyurus*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Consultado el 15 de febrero del 2013.
- Rodrigues FH G. 2002. Biología e conservação do lobo- guará na estação ecológica de águas emendadas. Tesis de Doctorado en Ecología, Instituto de Biología. Universidad Estatal do Campinas, Brasil: 105pp.
- Rodrigues FM, Telles MPC, Resende LV, Soares TN, Diniz- Filho JAF, Jácomo ATA & Silveira L. 2006. Transferability of short tandem repeat markers for two wild Canid species inhabiting the Brazilian Cerrado. *Genetics and molecular research*, 5(4):846-850.
- Rousset F. 2009. Genepop 4.0 for Windows and Linux.
- Ruiz-Lopez MJ, Roldan ERS, Espeso G & Gomendio M. 2009. Pedigrees and microsatellites among endangered ungulates: what do they tell us?. *Molecular Ecology*, 18(7):1352–1364.
- Salgado-Labouriau ML, Casseti V, Ferraz-Vicentini KR, Martin L, Soubiés F, Suguio K & Turcq B. 1997. Late Quaternary vegetational and climatic changes in cerrado and palm swamp from Central Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 128:215-226.
- Salim DC, Akimoto AA, Carvalho CB, Oliveira SF, Grisolia CK, Moreira JR & Klautau-Guimaraes MN. 2007. Genetic variability in maned wolf based on heterologous short-tandem repeat markers from domestic dog. *Genetics and Molecular Research*, 6(2):248-257.
- Santini A, Lucchini V, Fabbri E & Randi E. 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes*, 7(6):955-961.
- Schlotterer C & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20(2):211-215.
- Schwartz MK, Luikart G & Waples RS. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1):25-33.

- Schwartz MK & McKelvey K. 2009. Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation Genetics*, 10(2):441-452.
- Selkoe K A & Toonen R J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5):615-629.
- Slater GJ, Thalmann O, Leonard JA, Schweizer RM, Koepfli KP, Pollinger JP, Rawlence NJ, Austin JJ, Cooper A & Wayne RK. 2009. Evolutionary history of the Falklands wolf. *Current Biology*, 19(20):937-938.
- Slatkin M. 1985. Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16:393-430.
- Songsasen N & Rodden MD. The role of the Species Survival Plan in Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* conservation. *International Zoo Yearbook*, 44(1):136-148.
- Soler L, Carenton JM, Birochio D, Salvatori V, Orozco MM, Rosso MS, Carpinetto M, Fortabat SH, Díaz ML, de la Cruz Pino M, Chávez Clavimontes V, Kina AM, Torres Jiménez G, Prates P, Solís G. 2005. Problems and Recommendations for the Conservation of the maned wolf in Argentina. *Endangered Species UPDATE*, 22(1):3-9.
- Taberlet P & Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1-2):41-55.
- Taberlet P, Waits LP & Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8):323-327.
- Thermo Fisher Scientific, I. 2008. Thermo Scientific, Nanodrop 1000 Spectrophotometer. User's Manual, Wilmington. DE 19810 U.S.A.
- Templeton AR & Read B. 1994. Inbreeding: One word, several meaning much confusion. Pp. 91-106. En Loeschcke V, Tomiuk J & Jain SK eds. *Conservation Genetics*. Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland.
- Tom BK, Koskinen MT, Dayton M, Mattila A-M, Johnston E, Fantin D, DeNise S, Spear T, Smith DG, Satkoski J, Budowle B & Kanthaswamy S. 2010. Development of a Nomenclature System for a Canine STR Multiplex Reagent Kit. *Journal of Forensic Sciences*, 55:597-604.

- Torres R, Jayat JP & Pacheco S. 2013. Modelling potential impacts of climate change on the bioclimatic envelope and conservation of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Mammalian Biology*, 78(1):41-49.
- Vynne C, Baker MR, Breuer ZK & Wasser S K. 2010. Factors influencing degradation of DNA and hormones in maned wolf scat. *Animal Conservation*, 15(2):184-194.
- Waits LP, Luikart G & Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10:249-256.
- Waits LP. 2004. Using noninvasive genetic sampling to detect and estimate abundance of rare wildlife species. En *Sampling Rare or Elusive Species: Concepts, designs, and techniques for estimating population parameters* (ed. Thompson WL). pp: 211-228. Island press, Washington DC.
- Waits LP & Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69(4):1419-1433.
- Wang J. 2004. Application of the One-Migrant-per-Generation Rule to Conservation and Management. *Conservation Biology*, 18(2):332-343.
- Wang J. 2011. Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11:141-145.
- Wang C, Schroeder KB & Rosenberg NA. 2012. A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, 192:651-669.
- Wayne RK, Nash WG & O'Brien SJ. 1987. Chromosomal evolution of the Canidae. II. Divergence from the primitive carnivore karyotype. *Cytogenetics and cell genetics*, 44(2-3):134-141.
- Wayne RK, Geffen E, Girman DJ, Koepfli KP, Lau LM & Marshall CR. 1997. Molecular systematics of the Canidae. *Systematic Biology*, 46(4):622-653.
- Wayne RK & Morin PA. 2004. Conservation genetics in the new molecular age. *Frontiers in Ecology and The Environment*, 2(2):89- 97.
- Weir BS & Cockerham CC. 1984. Estimating *F*- statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358- 1370.



- Weir BS. 1996. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates. Sunderland, Mass.
- Weir BS, Anderson AD & Hepler AB. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics*, 7:771-780.
- White GC & Shenk TM. 2001. Population estimation with radio-marked animals. P. 329-350. En Millspaugh JJ & Marzluff JM. eds. *Radio Tracking and Animal Populations*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Wilberg MJ & Dreher BP. 2004. Genecap: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes*, 4:783-785.
- Witzenberger K & Hochkirch A. 2011. Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, 20(9):1843-1861.
- Woods JG, Paetkau D, Lewis D, McLellan BN, Proctor M & Strobeck C. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin*, 27: 616–627.
- Wozencraft WC. 1992. Order Carnivora. En: *Mammal Species of the World – A Taxonomic and Geographic Reference* (eds: Wilson DE & Reeder DM), 279–348 pp. Second Edition. Smithsonian Institution Press.
- Zane L, Bargelloni L & Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1):1-16.

## 10. Anexos

### Anexo 1

Para cada locus testeado en *C. brachyurus* se muestra el rango de tamaño en pares de bases, número de alelos (k), heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), coeficiente de fijación (Fis) y referencia bibliográfica. Se indica con un asterisco en el casillero Hesp, aquellos loci que no se encontraron bajo equilibrio H-W.

Locus	k	Tamaño	Hobs	Hesp	Fis	Bibliografía
FH2001	3	152-160	--	0,410	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	5	--	0,62	0,760	0,232	do Passo Ramalho, 2011
	5	--	0,62	0,760	0,232	do Passo Ramalho, 2011
FH2004	5	256-272	--	0,750*	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008;
	5	--	0,739	0,703	-0,052	Bruzzi Lion <i>et al.</i> , 2011
FH2010	5	240-256	--	0,720	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	5	--	0,652	0,652	0	Bruzzi Lion <i>et al.</i> , 2011
	5	--	--	--	--	Salim <i>et al.</i> , 2007
FH2018	6	169-197	--	0,790	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	5	--	0,38	0,640*	0,431	do Passo Ramalho, 2011
FH2054	6	158-174	--	0,740	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	5	--	0,696	0,697	0,001	Bruzzi Lion <i>et al.</i> , 2011
	5	--	--	--	--	Salim <i>et al.</i> , 2007
	6	--	0,62	0,800*	0,264	do Passo Ramalho, 2011
FH2088	3	112-120	--	0,590	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	3	--	0,54	0,610	0,152	do Passo Ramalho, 2011
	4	--	0,739	0,660	-0,123	Bruzzi Lion <i>et al.</i> , 2011
	3	--	--	--*	--	Salim <i>et al.</i> , 2007
FH2132	6	160-188	--	0,740	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	10	--	0,913	0,863	-0,060	Bruzzi Lion <i>et al.</i> , 2011
FH2137	15	218-272	--	0,910*	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	8	208-252	--	--	--	Franco Berriel, 2004
FH2140	13	138-190	--	0,880*	--	Da Fontoura-Rodrigues <i>et al.</i> , 2008
	11	128-184	--	--	--	Franco Berriel, 2004
	8	--	0,46	0,800*	0,455	do Passo Ramalho, 2011
FH2006	4	--	--	--	--	Salim <i>et al.</i> , 2007
CSSM-038	1	--	--	--	--	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
PEZ05	5	--	0,697	0,627	-0,129	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
PEZ20	6	--	0,560	0,712	0,197	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
PEZ12	2	--	0,658	0,478	-0,394	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
LOCO13	8	--	0,914	0,817	-0,135	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
LOCO15	5	--	0,553	0,564	0,007	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
PEZ19	4	196-212	--	--	--	Franco Berriel, 2004
FH2226	10	144-180	--	--	--	Franco Berriel, 2004
FH2561	13	240-348	--	--	--	Franco Berriel, 2004
FH2535	4	146-158	--	--	--	Franco Berriel, 2004

## Anexo 2

Lista de muestras de poblaciones silvestres analizadas. Para cada muestra se exhiben las coordenadas geográficas y las localidades de colecta así como también el tipo de muestra.

Muestra	Latitud Sur	Longitud Oeste	Localidad	Tipo de muestra
A23	26° 47'	59° 43'	Argentina- Chaco	tejido
A109	30°14'	60°47'	Argentina- Santa Fé	tejido
A200	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	tejido
A201	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	tejido
A202	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	tejido
A203	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	tejido
A447	26°47'	59°43'	Argentina- Chaco	tejido
A400	25°09'	59°35'	Argentina- Formosa	tejido
A402	25°09'	59°35'	Argentina- Formosa	tejido
A411	18°27'	52°36'	Brasil- Chapada Do Sul	tejido
A415	17°5'	51°26'	Brasil- Rio Verde	tejido
A427	23°11'	47°05'	Brasil- Faisca, Araxa	pelo
A428	23°11'	47°05'	Brasil- Araxa, Gaya	pelo
A435	23°11'	47°05'	Brasil- Franca San Pablo	pelo
A410	23°11'	47°05'	Brasil- Franca San Pablo	tejido
A431	20°32'	47°21'	Brasil- Belo Horizonte	pelo
A436	20°32'	47°21'	Brasil- Franca San Pablo	tejido
A416	20°32'	47°21'	Brasil- Franca San Pablo	tejido
A441	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	sangre
A442	26°12'	60°37'	Argentina- Chaco	sangre
A444	27°49'	63°08'	Argentina- Santiago del Estero	sangre
A24	32°4'	58°06'	Uruguay- Rio Negro	tejido
A437	32°19'	54°06'	Uruguay- Cerro Largo	tejido
A438	32°19'	54°06'	Uruguay- Cerro Largo	feca
ABOL 1	13°47'24"	60°32'28'	Bolivia- Mangabalito	sangre
ALECBE	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 57	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 56	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 69	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	sangre
BI 70	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 66	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 65	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca

ACB 3	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 4	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	sangre
ACB 5	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 64	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 57	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 61 A	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
148.1499	14°36'	60°52'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	sangre
BI 71	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 6	14°41'	60°56'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	sangre
BI 55	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ALHECBD	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 61	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 2	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 54	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
CB13	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	sangre
BI 53	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ALHEF	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ACB 1	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ALECBG	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
ALECBH	14°33'	60°55'	Bolivia- Parque Nacional Noel Kempff	feca
BI 60	14°31'26"	60°44'24"	Bolivia- Meseta	feca
BI 49	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
BI 50	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
AJW2	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
BI 52	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
BI 51	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
AJW1	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
AJW3	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca
ALECBB	14°47'	61°02'	Bolivia-El Refugio	feca

### Anexo 3

Lista de muestras de individuos en cautiverio. Para cada muestra se presenta el zoológico al que pertenece, el tipo de muestra y el sexo del animal.

Muestra	Zoológico	Tipo de muestra	sexo
A405	Buenos Aires	tejido	macho
A406	Buenos Aires	tejido	macho
A408	La Plata	tejido	hembra
A409	Buenos Aires	tejido	hembra
A440	Buenos Aires	sangre	hembra
A412	San Pablo	tejido	hembra
A417	Zoo Riberao Preto- San Pablo	sangre	hembra
A418	Zoo Riberao Preto- San Pablo	sangre	macho
A419	Zoo Belo Horizonte	sangre	macho
A420	Zoo Belo Horizonte	sangre	hembra
A421	Zoo Belo Horizonte	pelo	hembra
A422	Zoo Belo Horizonte	pelo	macho
A423	Zoo Belo Horizonte	pelo	hembra
A424	Zoo Belo Horizonte	pelo	hembra
A425	Zoo Belo Horizonte	pelo	macho
A426	Zoo Belo Horizonte	pelo	hembra
A439	Praha-Rca Checa	sangre	hembra
A443	Krefeld- Alemania	sangre	macho
114286	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	pelo	macho
114464	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	pelo	hembra
114749	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	sangre	hembra
114750	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	sangre	macho
114751	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	sangre	hembra
114752	Front Royal- National Zoo, Smithsonian Institution	sangre	macho
A413	Africam Safari-Puebla	pelo	macho

## Anexo 4

Matriz de genotipos de las muestras de animales en vida libre. Cada columna contiene los alelos para cada locus, la ausencia de datos por locus esta representada por "000000".

Muestra	FH2140	FH2137	FH2535	FH2848	REN105	PEZ19	FH2561	FH2226	FH2054	REN169	AHTK253
ABOL1	120120	226236	094094	236238	231231	197205	280318	138166	140144	198198	284284
A1489	120168	000000	094094	240240	227231	197197	300304	158158	140144	198198	284284
ACB1	000000	000000	000000	000000	000000	197197	312312	000000	144144	000000	280280
ACB2	124132	242242	098098	236238	227229	197197	304304	158158	140144	198198	284284
ACB3	120124	000000	094098	234240	227231	197197	304308	156156	136140	198198	284290
ACB4	120124	000000	094094	240240	227231	197197	310310	158158	140140	198198	284284
ACB5	120124	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	198198	000000
ACB57	120120	000000	094094	240240	000000	000000	000000	158158	000000	198198	000000
ACB6	120168	000000	094094	240240	227231	000000	306306	000000	144144	198198	284284
ACB61	120168	236242	092092	240240	229229	197197	300300	158170	140144	198198	284284
AJW1	128128	000000	098098	000000	000000	197197	314318	138158	000000	000000	278278
AJW2	124124	210230	000000	000000	000000	000000	000000	156166	000000	000000	000000
ALECBB	168180	222236	098098	230232	227227	197197	304304	158170	140144	198198	280280
ALECBE	120120	000000	094098	000000	000000	000000	000000	000000	140140	000000	282282
ALECBG	000000	000000	094098	240240	000000	197197	304304	158158	136144	198198	284284
ALECBH	000000	000000	000000	000000	000000	000000	308308	158158	140140	198198	280284
ALHECBD	124124	232232	000000	000000	000000	000000	000000	158170	130130	000000	284284
ALHEF	168168	230232	094094	238238	227227	197197	300304	158158	136140	198198	284284
BI49	120124	000000	000000	240240	000000	197197	310310	158158	132136	198198	284284
BI50	000000	000000	000000	000000	000000	197205	000000	158158	140140	200200	284284
BI51	124132	000000	102102	000000	000000	000000	000000	170170	000000	000000	276284
BI52	124128	218218	094094	234236	227229	000000	284322	140158	140140	198198	284284
BI53	154154	000000	094094	228230	000000	000000	000000	000000	000000	198198	000000
BI54	124172	000000	102102	236240	227229	000000	000000	000000	000000	198198	000000
BI55	124124	000000	094140	234234	000000	000000	252252	176176	152152	000000	290290
BI56	120120	000000	098098	238240	000000	000000	000000	000000	000000	198198	000000
BI57	120132	000000	112112	000000	000000	000000	000000	158158	000000	198198	000000
BI60	000000	000000	094102	236240	231231	197197	000000	158172	000000	198198	000000
BI61	124124	000000	000000	226226	000000	000000	000000	156156	136144	198198	284284
BI64	120132	000000	094098	236238	227231	197197	276300	158170	000000	198198	282282
BI65	120120	236236	094098	234234	227231	197197	000000	156156	144144	198198	284284
BI66	120120	000000	094094	000000	000000	000000	000000	158158	144144	000000	280286
BI69	120120	232236	094098	234240	227231	197197	000000	156156	000000	198198	284290
BI70	120120	236240	094098	236238	227227	000000	000000	158158	000000	198198	284284

BI71	120168	236242	134138	238238	227227	197197	292292	158158	144144	198202	284296
CB13	128128	222222	130140	234238	231231	199199	278278	140158	000000	198198	284284
JW3	134134	000000	094102	000000	000000	000000	000000	144170	000000	198198	000000
A411	122132	222238	88094	232236	229229	199199	310322	162168	146146	200200	284284
A415	118132	226242	094094	232236	229233	199203	310322	158162	000000	200200	284284
A435	124130	218222	94094	238238	229231	199203	312326	158158	136146	200200	284284
A436	000000	000000	094102	230240	229229	000000	260312	158166	000000	200200	284284
A200	130182	222230	098098	234236	231231	201201	000000	144158	000000	200200	284284
A201	128182	226230	000000	234234	227227	000000	304318	158158	000000	200200	284284
A202	126132	234268	000000	232238	227227	000000	276326	158166	136136	200200	284284
A203	122136	234234	098102	232234	227229	000000	280318	158158	136148	200200	284284
A23	126134	000000	098102	232238	223231	000000	282282	158172	136146	200200	000000
A400	122122	216222	098098	236236	227227	000000	256322	158158	140146	200200	282284
A402	132182	220238	102102	234236	231233	000000	350350	158176	140146	200200	284284
A441	126132	228238	094102	232232	223231	203203	256272	158176	136140	200200	284284
A442	136136	214238	098098	232238	223231	199199	318318	144170	132136	200200	284284
A447	126132	234272	098102	232238	223231	203207	280342	158174	140146	200200	286288
A109	126136	226240	094102	236236	229229	000000	318328	144144	000000	200200	284284
A427	126128	230250	094098	238238	227241	000000	312318	158170	000000	200200	284284
A428	126132	220224	094094	238242	229233	203203	284296	158166	136136	200200	284296
A431	118122	222234	094102	238238	229229	203203	284284	140146	140146	200200	284284
A416	126132	238242	094106	240240	231231	199199	290312	158170	136140	200200	284288
A24	000000	000000	094094	240240	227227	203203	314320	166170	146146	200200	000000
A437	132174	230234	094102	236236	227231	197201	282324	158170	000000	200200	284284
A438	132132	230230	094094	236240	227229	199203	306306	140170	136136	200200	284284
A444	126136	226234	092100	234234	229229	000000	318326	166180	140146	200200	284296
A410	124170	232232	094098	236240	227229	201201	320320	162168	146146	200200	282284

## Anexo 5

Matriz de genotipos de animales en cautiverio. Cada columna contiene los alelos para cada locus, la ausencia de datos por locus esta representada por "000000".

Individuo	FH2140	FH2137	FH2328	FH2535	FH2848	REN105	PEZ19	FH2561	FH2226	FH2054	REN169	AHTK253
A405	126126	230268	253267	094102	236236	227227	203203	316318	140158	136140	200200	288296
A406	126186	220220	000000	000000	000000	227227	000000	284284	140158	136136	200200	284284
A408	126186	230268	253271	098102	236238	227231	199203	000000	176176	136136	200200	284288
A409	000000	000000	000000	000000	232242	229231	000000	284288	158172	000000	000000	000000
A440	124124	220230	267271	094102	232236	227227	199203	286296	140158	136140	200200	284288
A412	122124	228238	259275	092100	228232	233235	199199	262322	140180	136140	200202	284296
A417	122126	212242	241245	092098	236240	227229	000000	260316	162170	132140	200200	284284
A418	122126	212246	245267	098106	238238	227227	199199	260312	158166	132146	200200	284284
A419	118130	222234	237245	094102	236240	229241	203203	326356	166170	140146	200200	284284
A420	122128	222234	241275	094102	230238	229229	000000	288306	158170	140146	200200	284284
A421	126166	238240	259259	098102	232236	229233	201201	262328	172172	000000	200200	284300
A422	120128	226234	237241	094102	230240	229229	000000	288306	158170	146146	200200	284284
A423	122126	226240	241241	094102	232240	229233	201201	000000	158172	000000	200200	284284
A424	128166	234242	241259	092100	232240	233233	000000	288328	168172	140146	200200	284284
A425	000000	000000	000000	000000	236236	227227	000000	318328	158172	146146	200200	284296
A426	122132	200246	000000	098098	236236	229229	201201	258326	158166	000000	200200	284284
A439	126136	230264	267271	094102	234240	233241	000000	000000	158158	136140	200200	284296
A443	120138	234264	263267	098102	234234	229241	199203	276316	158158	132136	200200	284284
114286	120124	228232	271271	094102	236236	229239	000000	000000	152158	000000	198198	284284
114464	120124	208208	267271	102104	236238	229229	000000	330330	138166	000000	198198	284284
114749	120120	208228	267271	102104	236238	229229	201201	312330	138158	140148	198198	284284
114750	120124	208228	271271	094104	236236	229229	000000	000000	158166	140144	198198	284284
114751	112124	208228	271271	102102	000000	000000	201201	000000	000000	132140	198198	284284
114752	120124	208232	271271	094104	236236	229239	197201	312330	000000	000000	198198	284284
A413	126132	242260	271275	094102	234234	227229	203203	316332	140166	000000	200200	284294



---

**ANÁLISIS GENÉTICO SOBRE LA PRESENCIA DE AGUARÁ GUAZÚ  
(CARNIVORA, MAMMALIA) EN URUGUAY**

**Natalia Mannise<sup>1</sup>, Mariana Cosse<sup>1</sup>, Leticia Repetto<sup>1</sup>, María del Rosario Franco Berriel<sup>1</sup>, Jesús E. Maldonado<sup>2,3</sup> & Susana González<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética de la Conservación. Departamento de Genética. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Unidad Asociada Facultad de Ciencias-UdelaR. Avenida Italia 3318, Montevideo-11600. Uruguay.

<sup>2</sup> Center for Conservation and Evolutionary Genetics, Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, 3001 Connecticut Ave. NW, Washington, DC 20008. <sup>3</sup>Department of Vertebrate Zoology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, MRC 108, Washington DC 20013.

Autor de Correspondencia: Susana González sugonza@iibce.edu.uy

**RESUMEN**

El aguará guazú es el cánido más grande de Sudamérica, categorizado como cercano a la amenaza por la UICN. En Uruguay ocurrieron dos episodios de caza furtiva de ejemplares machos adultos, uno en Río Negro y otro en Cerro Largo. El objetivo de este trabajo fue confirmar la presencia de aguará guazú en dos localidades del Uruguay (Departamentos de Cerro Largo y Río Negro) y caracterizar los niveles de variabilidad genética de la especie en nuestro país utilizando marcadores moleculares. Se analizaron las muestras de ejemplares cazados y una feca colectada en el sitio de caza de Cerro Largo. Fueron amplificadas fragmentos de ADN mitocondrial (*Cit b* y *D-loop*). Las muestras de Cerro Largo fueron genotipadas para nueve loci de microsatélites. El ADN fecal fue sexado con cebadores específicos para Canidae. Los resultados obtenidos indican que la especie retiene diversidad génica ya que cada individuo analizado representó un haplotipo diferente para el fragmento de *D-loop*. El análisis del ADN fecal reveló que en la dieta del ejemplar estaban incluidos restos ovinos y que pertenecía a un individuo aguará guazú macho. Las muestras de Cerro Largo comparten al menos un alelo para cada uno de los loci microsatelitales analizados, siendo posible la presencia de un grupo familiar en Cerro Largo.

**Palabras clave:** ecología molecular, genética de la conservación, muestreo no invasivo.

**ABSTRACT**

**Documenting maned wolf (Carnivora, Mammalia) occurrence in Uruguay.** The maned wolf is the largest South American canid species and is categorized as Near Threatened in the IUCN Red List. In Uruguay two adult males were illegally hunted, one in Río Negro and the other in Cerro Largo. The aim of this study was to characterize the levels of genetic variability of maned wolf in Uruguay using molecular markers and to confirm their presence in Cerro Largo and Río Negro using non-invasive genetic techniques. Samples from illegally hunted animals and a faeces collected in the Cerro Largos

poaching locality were analyzed. Mitochondrial DNA fragments were amplified (*Cit b* and *D-loop*). The Cerro Largo samples were also genotyped for nine microsatellite loci. Faecal DNA was sexed using primers designed for Canidae. Our results revealed a higher genetic diversity than expected because each sample analyzed showed a different haplotype for *D-loop*. Faecal analysis revealed that sheep remains were included in the animal diet and sexing markers revealed that the maned wolf was a male. Cerro Largo samples share at least one allele in every one of the microsatellite loci used. This suggests that the animals that we screened from Cerro Largo may be members of a family group.

**Key words:** molecular ecology, conservation genetics, non invasive methods.

## INTRODUCCIÓN

El aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) es el cánido más grande de América del Sur (Dietz, 1985). La distribución geográfica de la especie abarca regiones de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay. Debido a presiones antropogénicas se han documentado cambios en su rango de distribución geográfica ocurriendo una reciente expansión poblacional en el límite este y una gran retracción especialmente en su límite sur (Cunha de Paula *et al.*, 2008; Queirolo *et al.*, 2011).

En la actualidad, se ha identificado que el principal riesgo para su conservación es la drástica reducción de los ambientes naturales adecuados para la supervivencia de sus poblaciones, siendo categorizada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como "Cercana a la amenaza" (Cunha de Paula *et al.*, 2008; IUCN, 2008).

En 1989 en Uruguay fue registrado un episodio de caza furtiva de un ejemplar macho adulto en el departamento de Río Negro (Mones & Olazarri, 1990; Mannise *et al.*, 2011). Por otro lado, se han encontrado huellas características de la especie en el departamento de Rocha (Prigioni & Sapa, 2003). Posteriormente en el 2006, en el departamento de Cerro Largo, se reportó otro episodio de caza furtiva (Mannise *et al.*, 2011; Queirolo *et al.*, 2011).

Las técnicas de genética molecular son ampliamente utilizadas para abordar cuestiones elusivas en biología de la conservación y ecología del comportamiento (Taberlet *et al.*, 1999). La posibilidad de identificar individuos, sexo y especie utilizando marcadores moleculares a partir de muestras colectadas de forma no invasiva (ej: fecas), ofrecen un amplio potencial (Piggott & Taylor, 2003). En estudios que utilizan este tipo de muestreos, generalmente se realizan análisis con ADN mitocondrial para determinar la especie y además analizar las relaciones filogeográficas. A su vez el empleo de marcadores moleculares nucleares permite obtener otros niveles de resolución para efectuar la identificación individual (loci de microsatélites) y sexaje (marcadores presentes en cromosomas sexuales) de la muestra (Taberlet *et al.*, 1999; Waits & Paetkau 2005).

El ADN mitocondrial en mamíferos es una molécula pequeña, circular, de aproximadamente 16 000 pb cerrada, heredada por vía materna (Avise *et al.*, 1987). Cada célula contiene entre 10 y 2500 copias del genoma mitocondrial, lo cual facilita su amplificación (Kohn & Wayne, 1997). Las secuencias de ADN mitocondrial tienen una tasa de mutación diez veces más rápida que

los genes nucleares, particularmente su región control no codificante (*D-loop*) (Ryder & Fleischer, 1996). La amplificación de la región control permite desarrollar análisis de variabilidad poblacional, determinar unidades de manejo y desarrollar estudios filogeográficos (Kohn & Wayne, 1997). Es de importancia primaria el diagnóstico de especies y la determinación de relaciones interespecíficas para biología, ecología, evolución, sistemática, manejo de la biodiversidad, conservación y estudios forenses (Tobe *et al.*, 2009). Para realizar la identificación taxonómica es apropiado amplificar una sección del gen citocromo b (*Cit b*) (González, 2005; Tobe *et al.*, 2009).

En estudios de conservación de especies amenazadas el ADN mitocondrial se ha utilizado para identificar sets de poblaciones evolutivamente divergentes, incluyendo la resolución de Unidades Evolutivas Significativas (ESUs); así como también para evaluar desde una perspectiva evolutiva ó filogenética la conservación de áreas ó poblaciones (Moritz, 1994). Un pre-requisito para el manejo de la biodiversidad es la identificación de poblaciones con historias evolutivas independientes, tales agrupamientos son categorizados como especies, subespecies ó ESUs (Moritz, 1994). Siguiendo lo establecido en la Convención de la Biodiversidad de Rio, poblaciones genéticamente divergentes son reconocidas de manera apropiada como unidades de conservación (Moritz, 1994). Una aplicación genética muy simple pero altamente poderosa y práctica es definir Unidades de Manejo (MUs), las cuales representan poblaciones demográficamente independientes, que son diagnosticadas como tales presentando divergencia en sus frecuencias alélicas (Moritz, 1994; 1999). Las Unidades de Manejo son los componentes ecológicos de las Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) (Moritz, 1999). Las ESUs representan un mayor elemento de diversidad dentro de especies siendo de interés para la conservación (Moritz, 1999). Ambos aspectos no deben ser considerados como entidades separadas cuando se busca conservar la mayor Unidad Evolutiva Significativa (Moritz, 1999).

Los microsatélites son marcadores genéticos nucleares de locus simple, con herencia mendeliana, que consisten en repetidos en tándem de secuencias entre dos y seis pares de bases de largo (Zane *et al.*, 2002). Dado que presentan una elevada variabilidad intraespecífica son utilizados para analizar las relaciones de parentesco entre individuos (Lacey *et al.*, 1999; Lacey *et al.*, 2000). Si bien no se han aislado loci de microsatélites específicos para aguará guazú, diversos estudios en dicha especie utilizan loci hipervariables que fueron aislados para perro doméstico (Lion *et al.*, 2007; Salim *et al.*, 2007; Da Fontoura-Rodrigues *et al.*, 2008; Lion *et al.*, 2011).

Dentro de los marcadores nucleares, encontramos aquellos ubicados en los cromosomas sexuales. El gen denominado *ZFX* ubicado en el cromosoma X y el *ZFY* ubicado en el cromosoma Y, codifica para la proteína con dedos de zinc, que cumple una función de regulación génica pero que ha sido ampliamente utilizada para el sexaje de zorros (Ortega *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue el de caracterizar mediante marcadores moleculares, ejemplares de aguará guazú registrados en Uruguay.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Muestras*

Las muestras procedentes de animales cazados se encuentran depositadas en la colección del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN). Se extrajeron muestras de tejidos de los ejemplares cazados en Río Negro en 1989 (32°35'45"S; 58°08'46" O) y Cerro Largo en el 2006 (32°14'43"S; 54°03'30" O). Además en esta última localidad se colectó una feca días después del episodio de caza, la misma se mantuvo refrigerada por cuatro días y luego conservada en alcohol.

#### *Extracción de ADN y Amplificación*

Las extracciones de ADN para tejidos fueron realizadas siguiendo el protocolo de Medrano *et al.* (1990), mientras que para la extracción del ADN fecal se realizó utilizando el kit de DNeasy®Tissue (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Posteriormente cuantificamos y observamos la pureza del ADN extraído midiendo su absorbancia mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000).

Para efectuar la caracterización genética amplificamos fragmentos del gen de *Cit b* (Irwin *et al.*, 1991) y de *D-loop* de ADN mitocondrial (Franco Berriel, 2004).

Para efectuar el sexaje de la muestra de ADN fecal utilizamos cebadores específicos desarrollados para Canidos que amplifican un fragmento del gen *ZFX-ZFY* (Ortega *et al.*, 2004). Amplificamos dicho fragmento mediante PCR en Tiempo Real (RT-PCR) y analizamos los patrones de las curvas de desnaturalización o *melting* mediante el canal de *HRM* (High Resolution Melting) para la asignación del sexo de la muestra (Repetto *et al.*, en revisión). Mediante esta técnica, en las hembras se espera observar una única curva de amplificación (*Zfx-Zfx*) mientras que en los machos se obtendría un patrón de dos curvas de amplificación (*Zfx-Zfy*) (Repetto *et al.*, en revisión).

Con la finalidad de determinar la posible relación de parentesco entre las dos muestras de Cerro Largo analizamos nueve loci de microsatélites (FH2226, FH2535, FH2140, PEZ19, FH2137, FH2848, FH2328, REN169, FH2054) que fueron diseñados para perro doméstico (Francisco *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 2000). Para su empleo desarrollamos un protocolo para la reacción y termociclado de PCR en base a Franco Berriel (2004), Mellersh *et al.* (2000) y Francisco *et al.* (1996).

#### *Análisis de secuencias y genotipificación con loci de microsatélites*

Las secuencias que obtuvimos para los marcadores mitocondriales fueron analizadas y se asignaron haplotipos con el software Mega.5 ® (Tamura *et al.*, 2011). A su vez efectuamos, con la aplicación "Blast Search", la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del Genbank.

Los productos amplificados de loci de microsatélites fueron corridos en gel microcapilar y genotipificados con el software GenMarker V1.75® (Softgenetics).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### *Determinación de la especie y relaciones filogenéticas*

El análisis que realizamos de los fragmentos de *D-loop* amplificados con cebadores

específicos para aguará guazú reveló la presencia de tres haplotipos diferentes para la especie. Sin embargo, las secuencias de *Cit b* obtenidas de los animales cazados evidenciaron que las muestras de tejidos tenían el mismo haplotipo. Mientras que la secuencia del fragmento de *Cit b* obtenida del ADN fecal y amplificada a partir de cebadores universales para mamíferos, fue determinada por "Blast Search" como perteneciente a *Ovis aries*. Este hallazgo está en concordancia con los diferentes estudios de dieta donde se menciona que sería una especie omnívora que eventualmente podría consumir otros vertebrados y carroña (Dietz, 1984; Rodrigues, 2002; Queirolo & Motta-Junior, 2007; Trovati, 2009).

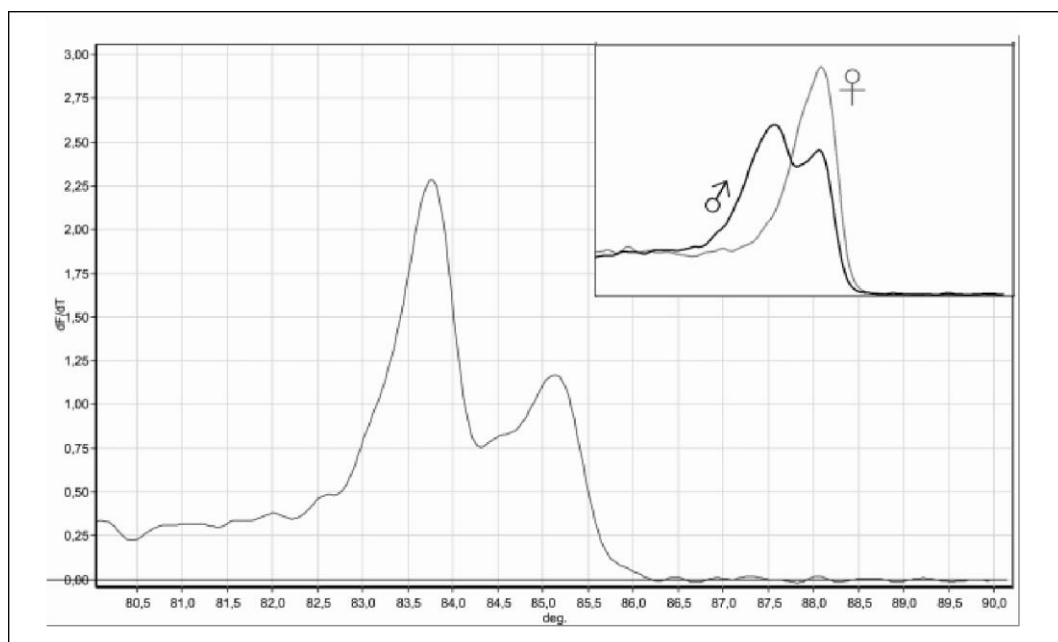
Estas herramientas moleculares permiten estimar a partir de ADN fecal, de manera cualitativa, ítems presentes en la dieta a través de la amplificación por PCR con cebadores específicos y/o universales (Valentini *et al.*, 2009).

### Sexaje

Mediante la comparación de la curva de *melting* obtenida para el ADN fecal con muestras de sexo conocido, se determinó que pertenecía a un ejemplar macho (Fig. 1). De esta manera, las muestras de Cerro Largo pertenecen a dos individuos machos, con diferente origen materno.

#### Genotipificación con loci de microsatélites

Mediante la comparación de los dos genotipos de los ejemplares de Cerro Largo, se pudo



**Fig. 1.** Patrón de curvas obtenido para la muestra de ADN fecal, la cual exhibe un pico a 83,75°C y otro a 85,2°C. En la parte superior se observan los controles positivos y . Los presentan dos picos: a 83,75°C representa aquel fragmento presente en el cromosoma sexual Y, a 85,2°C que representa a la copia en el cromosoma sexual X. Las presentan un único pico a 85,2°C presente en el cromosoma sexual X.

**Tabla 1.** Se muestran los alelos para cada loci de microsatélite utilizado, aquellos alelos compartidos se encuentran marcados con un asterisco (\*).

Loci	FH2226	FH2535	FH2140	Pez 19	FH 2137	FH2848	FH2328	REN169	FH2054
Individuo cazado	158 170*	94* 94*	134* 174	197* 207*	278* 288	293* 299	363 373*	199* 199*	62* 72
Feca	140 170*	94* 102	122 134*	197* 207*	276 278*	293* 303	373* 403	199* 199*	62* 62*

observar que para cada loci de microsatélite analizado, ambas muestras comparten por lo menos un alelo (Tabla 1).

Los resultados con los fragmentos de *D-loop* y *ZFX* revelaron que las muestras de Cerro Largo pertenecen a dos individuos machos con diferente origen materno, por lo que se descarta que sean hermanos. Dado que las dos muestras de Cerro Largo comparten al menos un alelo para cada loci de microsatélites, nos permite plantearnos la hipótesis de que éstas podrían tener una relación de parentesco padre-hijo. Dicha relación podrá ser verificada mediante el cálculo del coeficiente de parentesco, para lo cual se necesitan datos de las frecuencias alélicas en un número mayor de muestras.

## CONCLUSIÓN

Los marcadores moleculares empleados demostraron ser eficientes para determinar en forma confiable y repetible, la presencia en Uruguay de este cánido vulnerable y elusivo. Los resultados presentados en este trabajo revelan que la especie retiene diversidad génica ya que cada individuo analizado representó un haplotipo diferente para el fragmento de *D-loop*. A su vez, serían consistentes con la presencia de un grupo familiar de aguará guazú en Cerro Largo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Enrique González (MEC-MNHN), a Jorge Cravino (MGAP-RENARE) y a los revisores Dres. Jorge Ortega y Diego Queirolo que efectuaron valiosos comentarios. Este estudio fue parcialmente financiado por: CSIC-UdelAR; PEDECIBA, ANII-Uruguay.

## REFERENCIAS

Awise J.C., Arnold J., Ball R.M, Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

- Cunha de Paula R., Medici P. & Goncalves Morato R. 2008. Maned Wolf Action Plan. Icmbio, Brasilia, pp 29.
- Da Fontoura- Rodrigues M.L., Lima-Rosa C.A, Tchaicka L., Valdez F., Rodrigues F.H.G., Paula R.C., Gough M.P., Johnson W.E., Bonnato S.L. & Eizirik E. 2008. Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular Ecology Resource* 8: 898-900.
- Dietz J.M. 1984. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Smithsonian Institution Pr., City of Washington, pp 51.
- Dietz J.M. 1985. *Chrysocyon brachyurus*. *Mammalian Species* 234: 1-4.
- Francisco L., Langsten A., Mellersh C., Neal C. & Ostrander E. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7(5): 359-362.
- Franco Berriel M.R. 2004. Genetic Variability of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Master Thesis in Biological Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, 46 pp.
- González S. 2005. Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. *Agrociencia* IX: 545-550.
- Irwin D., Kocher T. & Wilson A. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32(2): 128-144.
- Kohn M.H. & Wayne R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in ecology & Evolution* 12(6): 223-227.
- Lacey E.A., Maldonado J.E., Clabaugh J.P. & Matocq M.D. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8(10): 1754-1756.
- Lacey E.A., Patton J.L. & Cameron G.N. 2000. Introduction. Pp. 1-14. *En*: Lacey E.A.P, Patton J.L. & Cameron G.N. (Eds.). *Life underground: the Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- Lion M.B. 2007. Diversidade Genética e conservação do lobo guará, *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do Distrito Federal. Tesis de Maestría en Ecología. Instituto de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología. Universidad de Brasilia, Brasil. (Orientador: Jader Soares Marinho- Filho), 57pp.
- Lion M.B., Eizirik E., Garda A.A., Da Fontoura- Rodrigues M.L., Rodriguez F.H.G. & Marinho-Filho J.S. 2011. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. *Genetica* 139: 369-381.
- Mannise N., Cosse M., Repetto L., Franco R., Maldonado J. & González S. 2011. Caso de estudio: caracterización y presencia de aguara guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en Uruguay empleando herramientas de ecología molecular. *Segundas Jornadas de Genética del Uruguay Sociedad Uruguaya de Genética*, pp. 19.
- Medrano J.F., Aasen E. & Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8(1): 43.
- Mellersh C.S., Hitte C., Richman M., Vignaux F., Priat C., Jouquand S., Werner P., André C., DeRose S., Patterson D.F., Ostrander E.A. & Galibert F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome* 11(2): 120-130.
- Mones A. & Olazarri J. 1990. Confirmacion de la existencia de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger)

- en el Uruguay: (Mammalia: Carnivora: Canidae). Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo 174(XII): 1-6.
- Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3(4): 401-411.
- Ortega J., Rosario Franco M.D., Adams B.A., Ralls K. & Maldonado J.E. 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics* 5(5): 715-718.
- Piggott M.P. & Taylor A.C. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology* 51(4): 341-355.
- Prigioni C.M. & Sapa A. 2003. Aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en el área natural protegida Potrerillo de Santa Teresa. *Acta Zoológica Platense* 6(1): 1-8.
- Queirolo D. & Motta-Junior J. 2007. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. *Acta Theriologica* 52(4): 391-402.
- Queirolo D., Moreira J.R., Soler L., Emmons L.H., Rodrigues F.H.G., Pautasso A.A., Cartes J.L. & Salvatori V. 2011. Historical and current range of the Near Threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. *Oryx* 45(2): 296-303.
- Rodrigues F.H.G. 2002. Biología e conservação do lobo-guará na estação ecológica de águas emendadas. Tesis de Doctorado en Ecología. Instituto de Biología. Universidad Estatal do Campinas, Brasil. (Orientador: Wesley Rodrigues da Silva), 105.
- Ryder O.A. & Fleischer R.C. 1996. Genetics Research and Its Application in Zoos. Pp. 255-262. *En: Kleiman D.G., Allen M., Thompson K.V. (Eds.). Wild Mammals in captivity. Principles and Techniques. University Chicago Press.*
- Salim D.C., Akimoto A.A., Carvalho C.B., Oliveira S.F., Grisolia C.K., Moreira J.R. & Klautau-Guimaraes M.N. 2007. Genetic variability in maned wolf based on heterologous short-tandem repeat markers from domestic dog. *Genet. Mol. Res.* 6(2): 248-57.
- Taberlet P., Waits L.P. & Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14(8): 323-327.
- 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. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tobe S.S., Kitchener A. & Linacre A. 2009. Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification—An answer to the debate. *Forensic Science International. Genetics Supplement Series* 2(1): 306-307.
- Trovati G.R. 2009. Mamíferos escavadores (Dasypodidae e Echimyidae) do cerrado da região de Itirapina e seu papel em comunidades de vertebrados terrestres. Tesis de Doctor en Ecología Aplicada. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Brasil (Orientador: Luciano Martins Verdade), 116 pp.
- Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P., Swenson J.E. & Taberlet P. 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources* 9(1): 51-60.



- Waits L.P. & Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69(4): 1419-1433.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11(1): 1-16.

Fecha de Recepción: 20 de junio de 2012

Fecha de Aceptación: 23 de agosto de 2012