

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea Genética
PEDECIBA

Análisis Filogeográfico de un cánido neotropical: el zorro de
monte

(*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766)

Lic. Ana Carlozzi

Orientador: Dra. Susana González

Tribunal:

Dra. Adriana Mimbacas (presidente)

Dra. Silvia Llambi

Dr. Álvaro Soutullo

22 de diciembre de 2011

Montevideo, Uruguay

ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE UN
CÁNIDO NEOTROPICAL:
EL ZORRO DE MONTE
(*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766)

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, subárea Genética

Lic. Ana Carlozzi

Orientador: Dra. Susana González

Unidad Genética de la Conservación

Departamento de Genética - IIBCE - Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Agradecimientos



A Susana González, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.
A los integrantes del Laboratorio de Genética de la Conservación-IIBCE, particularmente a Mariana Cosse que generó varias de las secuencias utilizadas y a Natalia Manisse que aportó a la bibliografía manejada.



A Andrés Parada por la contribución bibliográfica.
A todas aquellas personas que colaboraron con muestras de tejidos.
A CC Da Silva por su amistad, guía y apoyo, que me animaron a completar este trabajo.



A Alejandro Márquez por su generosidad; siempre disponible para discutir mis dudas ofreciendo comentarios esclarecedores y significativas sugerencias.
A mis padres que continuamente estimularon mi formación académica pero también personal apoyándome desde lo afectivo y económico, entendiendo las limitaciones de esta carrera.

A Andrés que silenciosamente me acompañó y toleró en todo este proceso, a Gerardo y las “amigotas” con quienes siempre puedo contar.

-i-

Análisis Filogeográfico de un cánido neotropical:
el zorro de monte (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766).

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Los Cánidos	2
2.2. Biogeografía histórica de los cánidos neotropicales	3
2.2.1. Clasificación biogeográfica de Sudamérica	3
2.2.2. Origen y diversificación de los cánidos neotropicales	6
2.3. El “Zorro de monte”, <i>Cerdocyon thous</i> (Linnaeus, 1766)	8
2.4. La biología de la conservación desde un enfoque filogeográfico	12
3. HPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3.1. Hipótesis	15
3.2. Objetivos	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Obtención de las muestras	17
4.2. Extracción y amplificación del ADN	19
4.2.1. Amplificación de un fragmento del gen <i>D-Loop</i> mitocondrial	20
4.2.2. Amplificación de un fragmento del gen <i>Citocromo b</i> mitocondrial	21
4.3. Análisis de los datos.....	22
4.3.1. Diversidad Genética	22
4.3.2. Análisis Filogenéticos	23
4.3.3 Estimación de Redes de Haplotipos.....	25
4.3.4. Análisis de la Estructura Poblacional	26
4.3.5. Aislamiento por Distancia	27
4.3.6. Demografía histórica: Estimación de la Expansión Poblacional	28
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Análisis descriptivo de las secuencias	31
5.2. Análisis Filogenéticos y Redes de Haplotipos	34
5.2.1. Red de Haplotipos- Median Joining Network	41
5.2.2. TMRCA (Tiempo del Ancestro Común más Reciente)	45
5.3. Índices de Diversidad Genética de las Poblaciones del “Zorro de monte”	46

5.4. Estructura Poblacional del “Zorro de monte”	48
5.5. Análisis Demográficos	55
6. DISCUSIÓN.....	60
6.1 Patrones filogeográficos y filogenia intraespecífica.....	60
6.2 Diferenciación genética y filopatría de hembras.....	63
6.3 Dinámica Demográfica.....	67
6.4 Implicancias para la Conservación.....	73
7. CONCLUSIONES.....	75
8. PERSPECTIVAS.....	77
8. APÉNDICE I.....	79
9. APÉNDICE II.....	81
10. APÉNDICE III.....	82
11. APÉNDICE IV.....	84
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

INDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1.</u> Filogeografía, Marcadores moleculares y ADN Mitocondrial.....	14
<u>Cuadro 2.</u> Teoría del Coalescente. (Kingman, 1980).....	28

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.</u> Clasificación de regiones biogeográficas de América Latina y el Caribe.....	5
<u>Tabla 2.</u> Lista de especímenes utilizados en el estudio.....	18
<u>Tabla 3.</u> Distribución de los haplotipos obtenidos, a partir de secuencias de <i>Citocromo b</i>	35
<u>Tabla 4.</u> Distribución de los 49 haplotipos obtenidos, a partir de secuencias de <i>D-Loop</i>	37
<u>Tabla 5.</u> Diversidad haplotípica y nucleotídica de las secuencias de <i>Citocromo b</i>	47
<u>Tabla 6.</u> Diversidad haplotípica y nucleotídica de las secuencias de <i>D-Loop</i>	47
<u>Tabla 7.</u> Resultados del AMOVA para distintas subdivisiones.....	51
<u>Tabla 8.</u> Matriz de estimadores pareados de F_{ST} y N_m a partir de los datos de las secuencias de <i>Citocromo b</i>	53
<u>Tabla 9.</u> Matriz de estimadores pareados de F_{ST} y N_m a partir de los datos de las secuencias de <i>D-Loop</i>	53
<u>Tabla 10.</u> Resultados del Test de correlación de Mantel entre las distancia genética y geográfica para las 28 secuencias del <i>Citocromo b</i> y las 105 secuencias del <i>D-Loop</i>	54
<u>Tabla 11.</u> Índices del análisis de la historia demográfica en <i>C. thous</i>	55
<u>Tabla 12.</u> Estimación de parámetros poblacionales, con el modelo basado en Mismatch Distribution (Rogers & Harpending 1992; Schneider & Excoffier 1999) que asume una expansión reciente en la población.....	57

Análisis Filogeográfico de un cánido neotropical:
el zorro de monte (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766).

<u>Figura 16.</u> Fluctuaciones demográficas basadas en Skyline plots derivados de 313pb del gen <i>D-Loop</i> , para ejemplares de <i>C. thous</i> del clado Sur y Sureste por separado, y derivados de 347pb del gen <i>Citocromo b</i> sólo para ejemplares de <i>C.thous</i> del clado Sur.....	59
---	----

1. RESUMEN

*El “zorro de monte” *Cerdocyon thous* es un cánido neotropical con una amplia distribución en Sudamérica habitando una gran variedad de ambientes y exhibiendo una gran plasticidad fenotípica. Desde el punto de vista taxonómico es un género monotípico. Han sido descritas 5 subespecies, distribuidas en el amplio rango geográfico que ocupa: Colombia, Venezuela, Paraguay, una región de Perú y Bolivia, el Norte de Argentina, Brasil (excepto las tierras bajas de la cuenca del Amazonas) y Uruguay como punto más austral de la misma. Un estudio filogeográfico previo con ejemplares de *C. thous* distribuidos al sur de la cuenca amazónica en Brasil, identificó una clina Norte-Sur en el Bosque atlántico y dos unidades genéticas que corresponden a las 2 subespecies reconocidas para dicha región, *C. t. azarae* y *C. t. entrerrianus*. En el Uruguay esta especie ha sido reportada para todo el territorio, especialmente vinculada a los ambientes de bosques nativos y exóticos. Presenta además una amplia variación morfológica.*

El objetivo de nuestro trabajo fue efectuar la caracterización genética de ejemplares de zorro de monte y analizar si existe diferenciación y sub-estructuración en las poblaciones al sur de la cuenca amazónica, incluyendo localidades de Uruguay. Para ello se utilizaron muestras de tejidos de diferentes localidades, depositadas en la colección del laboratorio de Genética de la Conservación (IIBCE). Se extrajo ADN y se amplificó con primers universales para marcadores mitocondiales de la región D-Loop y del Citocromo b.

Se obtuvieron 20 secuencias parciales (347pb) para el marcador Citocromo b y 47 secuencias parciales (313pb) para el marcador D-Loop. En el análisis también se emplearon secuencias depositadas en el Genbank provenientes de otras localidades de Brasil. Se determinaron así 105 haplotipos para el marcador mitocondrial D-Loop, que presentan 103 sitios polimórficos informativos y 12 haplotipos para el marcador mitocondrial Citocromo b que presentan 26 sitios polimórficos informativos.

*La reconstrucción filogenética realizada con ambos marcadores confirma un fuerte quiebre filogeográfico entre el Sureste de Brasil y el resto de las localidades en el Sur. En dicho clado se ubican todas las muestras colectadas en Uruguay y no se observa subestructuración tanto a nivel filogenético como poblacional. La divergencia fue estimada en 550.000 años con un intervalo de confianza amplio. La historia demográfica de ambos clados está asociada al período del pleistoceno pero de forma independiente. El clado Sur exhibe una dinámica inestable con una expansión poblacional y posterior cuello de botella vinculado a la última Gran Glaciación, evidenciando eventos de expansión y contracción del hábitat producto de las oscilaciones climáticas. A pesar de ello los niveles de diversidad nucleotídica son elevados. El patrón filogeográfico de *Cerdocyon thous* al sur de la cuenca amazónica coincide con el de otras especies de la biota neotropical. Por ello y a pesar que el estatus de Conservación para esta especie no reviste amenaza definimos dos Unidades Evolutivamente Significativas que permiten identificar en el Bosque Atlántico áreas prioritarias para la conservación ya que revelan una interrupción demográfica producto de una historia de discontinuidad y fragmentación de hábitat en el área de estudio.*

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Los cánidos*

La familia Canidae, se ubica dentro del orden carnívora (suborden Caniformia, superfamilia Canoidea), e incluye 16 géneros y 36 especies que divergieron en los últimos 10 millones de años (MA). Incluye una gran variedad de organismos, en cuanto a aspectos morfológicos y de formas de vida, desde el pequeño “zorro vinagre” (*Speothos venaticus*), al “lobo aguará” (*Chrysocyon brachyurus*) (Clutton-Brock 1976; Wayne *et al.*, 1987; Nowak 1999; Graphodatsky *et al.*, 2007).

La distribución actual es amplia, ocurriendo en diversos ambientes: bosques templados y tropicales, sabanas, tundra y desiertos (Wayne 1993); en todos los continentes excepto territorios insulares (Nowak 1999).

El origen de los cánidos se remonta al final del Eoceno (hace 50 MA) en Norteamérica, a partir de la ya extinta familia Miacide (Sillero-Zubiri & MacDonald 2004). Ocurrieron tres grandes radiaciones, que dan origen a las subfamilias: Hesperocyoninae, Borophaginae y Caninae (Tedford 1978 citado en Garrido & Arribas 2008). Las dos primeras, extintas, estuvieron restringidas a Norteamérica mientras que la última se dispersó hacia otros continentes: Eurasia, África y Sudamérica. A finales del Mioceno atraviesa el estrecho de Bering y llega a Europa iniciando una explosiva radiación que da origen a las especies modernas del viejo mundo (Wayne *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2004). A principios del Pleistoceno los lobos, cuones y zorros cruzan de nuevo a Beringia e invaden Norteamérica. En ese período, una vez establecido el Istmo de Panamá, también alcanzan Sudamérica (Wang *et al.*, 2004).

Los representantes modernos de la familia Canidae pueden ser agrupados, de acuerdo con los resultados de análisis moleculares, en tres grandes grupos. El linaje de los “cánidos tipo lobos” incluye a los géneros *Canis*, *Lycaon*, *Cuon* y *Spheotos*; el linaje de los “cánidos tipo zorros” con los géneros *Vulpes*, *Alopex* y *Fennecus*; y el linaje de los “cánidos sudamericanos” integrado por los géneros *Atelocynus*, *Chrysocyon*,

Pseudalopex, *Duscicyon* (extinto) y *Cerdocyon*. Los géneros *Urocyon*, *Otocyon* y *Nyctereutes* representan linajes independientes y más antiguos (Wayne *et al.*, 1989).

La divergencia entre los “cánidos tipo lobo” (perro doméstico, lobo gris, coyotes y chacales) y los “cánidos tipo zorro” ha sido estimada entre 6 a 10 MA, de acuerdo a la datación fósil de *Canis davisii*, el ancestro potencial de ambos grupos (Berta 1984).

El grupo de “cánidos sudamericanos” se propone como un grupo no monofilético, cuyo origen se explica a partir de dos o tres oleadas de migración independientes, desde Norteamérica. Sin embargo el origen común a todo el grupo ha sido fijado de 6 a 3 MA (Wang *et al.*, 2004).

2.2 Biogeografía histórica de los cánidos neotropicales

2.2.1 Clasificación biogeográfica de Sudamérica

Sudamérica forma la mayor parte de la región Neotropical (Meserve 2007). Dentro del reino Holotropical, que corresponde a las áreas tropicales (entre los 30º de latitud sur y norte), comprende los trópicos del nuevo Mundo desde el norte de Méjico hasta el centro de la Argentina (Morrone 2001, 2004, 2005).

Está subdividida en subregiones y estas en provincias (Figura 2; Tabla 1) caracterizadas por los distintos biomas (Figura 1) que dominan geográficamente el área (Udvardy 1975).



Figura 1. Distribución actual de los biomas de Sudamérica.



Figura 2. Provincias biogeográficas de América Latina y el Caribe.

Tabla 1. Clasificación de regiones biogeográficas de América Latina y el Caribe.

REGIÓN	SUBREGIÓN	PROVINCIA	NÚMERO EN FIG. 3
Neotropical	Caribeña	Sierra Madre Occidental	6
		Sierra Madre Oriental	7
		Eje Volcánico Transmejicano	8
		Depresión del Balsas	9
		Sierra Madre del Sur	10
		Costa Pacífica Mejicana	11
		Golfo de Méjico	12
		Península de Yucatán	13
		Chiapas	14
		Oriente de América Central	15
		Occidente del Istmo de Panamá	16
		Bahamas	17
		Cuba	18
		Islas Caimán	19
		Jamaica	20
		Española	21
		Puerto Rico	22
		Antillas Menores	23
		Chocó	24
		Maracaibo	25
		Costa Venezolana	26
		Trinidad y Tobago	27
		Magdalena	28
		Llanos Venezolanos	29
		Cauca	30
		Islas Galápagos	31
		Occidente de Ecuador	32
		Ecuador Árido	33
		Tumbes-Piura	34
	Amazónica	Napo	35
		Imerí	36
		Guyana	37
		Guyana Húmeda	38
		Roraima	39
		Amapá	40
		Varzea	41
		Ucayali	42
		Madeira	43
		Tapajos-Xingú	44
		Pará	45
		Pantanal	46
		Yungas	47
	Chaqueña	Caatinga	48
		Cerrado	49
		Chaco	50
		Pampa	51
		Monte	52
	Paranaense	Bosque Atlántico Brasileño	53
		Bosque Paranaense	54
		Bosque <i>Araucaria angustifolia</i>	55

2.2.2 Origen y diversificación de los cánidos neotropicales

La biodiversidad sudamericana ha sido influenciada por distintos procesos (geológicos, climáticos y ecológicos) del Mesozoico (245 - 65MA.), que promovieron eventos de vicarianza y dispersión. Éstos incluyen el levantamiento de los Andes, fluctuaciones en el nivel del mar y la formación del Istmo de Panamá (Nores 2004).

En los cánidos, su historia evolutiva está estrechamente ligada al establecimiento del Istmo de Panamá, a través del cual ocurre el “Gran Intercambio Americano” (Webb 1978). La conexión entre las Américas propició la dispersión de fauna interamericana y su posterior radiación en Sudamérica. Por ello es posible identificar actualmente grupos enteros de mamíferos, cuyo origen está documentado fuera de Latinoamérica (Torres & Ferrusquia Villafranca 1981 citado en Zink, 2004).

Se establecen dos rutas de dispersión: la “ruta Andina”, desde la región ístmica a lo largo de la cadena andina y la “ruta del Este”, desde el perímetro del Caribe de América Central, en el este de Venezuela, hasta entrar en la cuenca amazónica (Langguth 1979; Quijadas-Mascareñas *et al.*, 2007). Este “Corredor Andino” es propuesto como una ruta norte-sur más directa, conectando áreas de sabana de los llanos de Colombia y Venezuela con las de Roraima, en Brasil (Quijadas-Macareñas *et al.*, 2007). Según Langguth (1979) fue principalmente utilizado por mamíferos y aves, presentando mayor uniformidad en la contracción del área de bosque y las frías temperaturas.

La existencia de un “Corredor Este/Costero” implicó la ocurrencia de condiciones áridas en el este brasileño (Bigarella & Andrade 1965 citado en Langguth, 1979). A través de él se conectaron el bloque sur de sabana brasileña, en Marajó y Amapá, con la sabana de la costa atlántica de las Guyanas (Haffer 1997).

En Argentina, ambas rutas convergen (Webb 1978), donde se considera que fue uno de los mayores centros de evolución de cánidos (Berta 1987). Las tierras altas de Brasil y Venezuela también se reconocen como importantes áreas para la diferenciación del grupo.

También se plantea la existencia de un tercer corredor denominado “Corredor Amazónico Central” el cual habría conectado el bloque de sabana del sur con los parches de sabana al norte de la cuenca amazónica (Monte, Pará y Roraima). Sin

embargo el apoyo a esta hipótesis es débil, en relación a la distribución estudiada para distintos grupos de vertebrados (Silva 1995; Ávila-Pires 1995; Pinto-Henriquez & Oren 1997; Silva *et al.* 1997; Cardoso da Silva & Bates, 2002 citados en Quijada-Macareñas *et al.* 2007).

Estos corredores se forman a partir de modificaciones en la composición y distribución de las comunidades vegetales, producto de las marcadas oscilaciones climáticas ocurridas durante el período del Terciario (65 - 1.8MA.) (Vivo & Carmignotto 2004) y principalmente hacia el final del Cuaternario (1.8MA. – presente). Sucesivamente los episodios de glaciación fueron interrumpidos por episodios interglaciares, alternando entre un clima relativamente frío y seco con momentos húmedos y cálidos. Como consecuencia de estos ciclos la densidad de la canopia en las distintas regiones, tanto templadas como tropicales, donde había bosques, sufrió una oscilación continua (Taberlet 1998; Cowling 2001; Hewitt 2000).

Existen suficientes datos que documentan el cambio de la biota sudamericana como resultado de los ciclos climáticos del Cuaternario (Haffer 1974, 1979; Simpson & Haffer 1978; Cracraft 1988).

En especial se asigna a las condiciones climáticas del Pleistoceno (2.5MA.) un rol preponderante en la ocurrencia de los patrones filogeográficos actuales, dentro o entre especies cercanamente relacionadas, de muchos vertebrados asociados a la región Neotropical (Avice *et al.*, 1998). La explicación más conocida y frecuentemente invocada para explicar la diversificación de esta biota es la “Hipótesis de Refugios Pleistocénicos” (Haffer 1969). Esta postula un mayor rol ecológico de la vicarianza, entre hábitats sometidos a eventos sucesivos de expansión y contracción de sabana y bosque, debido a la alternancia de los ciclos climáticos (Haffer 1969; Vuilleumier 1971; Simpson & Haffer 1978 citados en Cracraft & Prum 1988).

Para otros autores, la separación de especies ocurre en instancias pre-cuaternarias (Lanteri & Confaloneri 2003).

Hacia el Pleistoceno medio el gran intercambio había casi cesado debido a la ocurrencia de condiciones más húmedas. En el Pleistoceno tardío, producto del deterioro climático que comienza en el Mioceno tardío, varios de los grupos de grandes carnívoros en Norteamérica fueron diezmados, pero muchos otros de menor

porte, continuaron diversificando en hábitat abiertos de Sudamérica, como el grupo de los “cánidos sudamericanos” (Wang *et al.* 2004).

En el presente los zorros sudamericanos son el grupo de cánidos más diverso dentro de un mismo continente (Sillero-Zubiri & Switzer, 2004).

Algunos autores sugieren que la ausencia de los grandes predadores terrestres (Patterson & Pascual 1972; Simpson 1980; Marshall 1982, citados en Wayne & O’Brien 1987), sumada a una estrategia alimenticia oportunista, que utiliza pequeñas presas así como también frutos y granos, (Langguth 1979; Berta 1987) favoreció su diversidad actual. Sin embargo algunas de estas especies presentan una disminución en su área de distribución llegando incluso a ser consideradas vulnerables y amenazadas por la “Convención Internacional sobre la Naturaleza y los Recursos Naturales” (IUCN, 2004) tal como ocurre con *Chrysocyon brachyurus*, *Pseudalopex fulvipes* y *Spheotos venaticus*. La acción antrópica ha provocado la alteración de diversos ambientes silvestres convirtiéndose en uno de los principales factores responsables de dicha situación.

En general estos cánidos se encuentran ocupando áreas abiertas y planas provistas de manchas de bosque y/o grupos de árboles que les aseguran protección como ocurre en las sabanas y áreas de bosque galería (Borrero 1957; De Bisbal 1982; Eisenberg 1989; Emmons 1990 citados en Martínez *et al.*, 2000). De acuerdo con ello Langguth (1970) clasifica a los “cánidos sudamericanos” en 2 grupos con características morfológicas distinguibles. A uno lo denomina “zorros de campo” y al otro “zorros de monte”. En este último incluye al género *Cerdocyon* siendo caracteres que unifican al grupo las orejas y cola cortas, el rostro también corto, un patrón de coloración del pelaje oscuro, robustez del cuerpo y caderas proporcionales y cortas.

2.3 El “Zorro de monte”, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766)

El “Zorro patas negras”, o “Zorro de monte” o “Zorro perro”, son solo algunas de las denominaciones atribuidas a la especie *Cerdocyon thous*.

Constituye un género monotípico, de cánido neotropical conocido en el registro fósil desde depósitos del Mioceno tardío y Plioceno temprano (6-3 MA) en Norteamérica (Berta 1982, 1987).

En Sudamérica, se reconoce su presencia desde mediados del Pleistoceno (1 MA) hasta la fauna reciente (Wayne *et al.*, 1989).

En el presente es un cánido común cuyo estado de conservación no reviste amenaza pero el nivel de conocimiento es considerado insuficiente por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies de Fauna y Flora Silvestre en Peligro (CITES), que la ubica en el Apéndice II de la IUCN (Courtenay & Maffei, 2008).

Su rango de distribución ocupa, como muestra el mapa de la Figura 3, desde Venezuela y Colombia, pasando por Bolivia, Paraguay, el norte de Argentina, Uruguay, llegando hasta Brasil (excepto en las tierras bajas de la cuenca del Amazonas) (Cabrera & Yepes 1940; Mazzini & Molina 2000; Courtenay & Maffei 2004). Esta no difiere de su distribución en el pasado de acuerdo con fósiles hallados en depósitos del Pleistoceno en Brasil (Berta 1987).

Habita una gran variedad de ambientes que incluyen bosque tropical y subtropical, bosque abierto, sabana, así como áreas con modificaciones antrópicas. Sin embargo exhibe una clara preferencia por las áreas abiertas (Brady 1979; Bisbal 1989; Sunkist *et al.*, 1989;

Macdonald & Courtenay 1996; Besiegel 1999; Maffei & Taber 2003; Trovati *et al.*, 2007 citados en Machado & Hingst Zaher 2009) notoria por su distribución disyunta en la cuenca del bosque amazónico.

En Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, el “Zorro de monte”, coexiste con otros “canidos sudamericanos”. En Argentina y Uruguay se ha confirmado que habita en simpatria con el “Zorro gris” (*Pseudalopex gymnocercus*). Además de la superposición en su rango de distribución estos cánidos tienen un tamaño corporal similar y



Figura 3. Mapa del patrón de distribución del “Zorro de monte”.

comparten hábitos alimenticios. Sin embargo la coexistencia es posible debido a un uso diferencial de los hábitats y las horas del día. Mientras el “Zorro gris” se encuentra en los sitios de campo abierto, el “Zorro de monte” vive en el bosque galería que acompaña los cursos de agua y las áreas de campo abierto contiguas. Además el “Zorro de monte” es más activo a partir del crepúsculo y el “Zorro gris” en horas más diurnas (Langghut 1979; Cravino *et al.*, 2000; Di Bitteti *et al.*, 2009). En este caso al coexistir con otro cánido el “Zorro de monte” muestra una restricción en su distribución aunque en general exhibe versatilidad en el tipo de ambiente que habita, dentro de su rango de distribución.

Es una especie omnívora cuyos hábitos alimenticios incluyen: frutas, vertebrados, insectos, anfibios, crustáceos, aves y carroña. La dieta está determinada por la disponibilidad de acuerdo a la estación del año. Cazán tanto en forma individual como en grupos y también se consideran dispersores de semillas de especies vegetales entre las que se encuentra la palmera *Butiá capitata* en Uruguay (Rodríguez Mazzini & Molina Espinosa 2000; De Arruda Bueno & Motta-junior 2004; Rocha *et al.*, 2004; Pedó *et al.*, 2006).

Los adultos tienen un ámbito hogar que ocupa un área entre 280 y 110 hectáreas con un solapamiento mínimo, mostrando mayor actividad durante la hora del crepúsculo y la noche (Maffei & Taber 2003).

Se los considera monógamos, ambos sexos alcanzan la madurez sexual en el primer año de vida y nace comúnmente una cría al año. Los grupos sociales están constituidos por la pareja y sus crías (1 – 5).

Desde el punto de vista citogenético, el “Zorro de monte” presenta un número diploide de 74 cromosomas (Wurster-Hill 1973 citado en Hatanaka *et al.*, 1998).

Es un cánido de tamaño corporal mediano (5 – 7 kg) que se distingue por el rostro largo y puntiagudo, con la cabeza relativamente corta y angosta. El pelaje es generalmente oscuro, con una coloración marrón grisáceo. Posee una línea dorsal negra más o menos marcada que llega hasta la cola y los extremos de sus miembros también son negros (Berta 1982).

Presenta gran plasticidad fenotípica en la coloración del pelaje que varía dentro y entre poblaciones (Figura 4).



Figura 4. Ejemplares de *C. thous* de distinta procedencia. a) Venezuela, b) Colombia, c)Paraguay, d) Argentina (Corrientes), e) Argentina, f) Brasil (Pantanal), g) Brasil (Río Grande).

Se reconocen, 5 subespecies (Cabrera 1931) (Figura 5):

1. *C. t. aquiles* (norte de Venezuela y Colombia.)
2. *C. t. azarae* (Noreste y porción central de Brasil.)
3. *C. t. entrerrianus* (sur de Brasil, Bolivia, Uruguay, Paraguay y Argentina.)
4. *C. t. germanus* (Bogotá en Colombia.)
5. *C. t. thous* (sureste de Venezuela, Guyana, Surinam, Guyana francesa y noreste de Brasil.)

Para la determinación de estas unidades, muchas de las características diagnósticas originales han sido tomadas en base a la coloración del pelaje que, como se mencionó

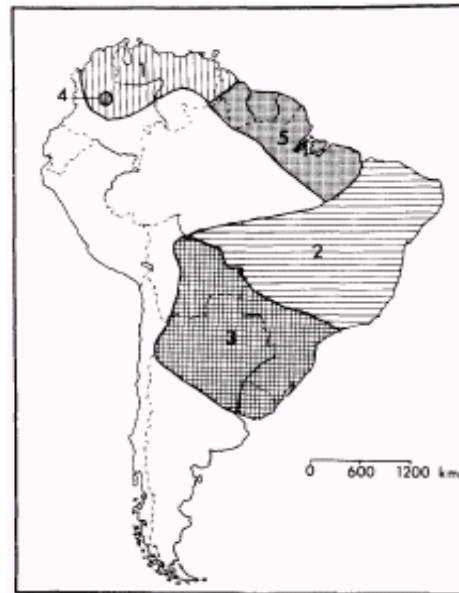


Figura 5. Mapa que indica el patrón de variación de las subespecies clásicas de *C. thous*.
Fuente: Berta, 1982.

previamente, presenta gran variabilidad intraespecífica y tomado aisladamente puede constituir una limitante para determinar niveles de diferenciación y proponer límites de distribución.

Estudios más recientes en el “Zorro de monte”, incorporando caracteres genéticos (Tchaicka *et al.*, 2007) y craneométricos (Machado & Hingst Zaher 2009), muestran congruencia con algunas de las subespecies clásicamente reconocidas.

Por un lado los datos de ADN mitocondrial revelan para poblaciones del “Zorro de monte” distribuidas en Brasil, una partición filogeográfica acorde con dos de las subespecies diagnosticadas por Cabrera (*C. t. entrerrrianus* y *C. t. azarae*). Por otro lado a partir de datos morfológicos de ejemplares provenientes de todo el rango del “Zorro de monte”, se reconcilian tres grupos distintos. Un primer grupo al norte, corresponde con parches de sabana densa (llanos y tierras tropicales y subtropicales del bosque de Colombia y Venezuela) e incluye las grandes elevaciones de los Andes. Un segundo grupo al este, se ubica en el Cerrado brasileño, corresponde con una región central de sabana densa, y se extiende a las zonas adyacentes que ocupan el Bosque Atlántico y la región litoral de Caatinga. Finalmente el tercer grupo, se dispone al sur en la mayor parte de la región chaqueña (Argentina, Bolivia y Paraguay) e incluye además la región pampeana que ocupa Brasil, Argentina y Uruguay, que constituye el punto más austral de distribución de la especie. Estos antecedentes morfológicos y genéticos, concuerdan con el patrón observado en otras especies de la región Neotropical (Quijadas – Mascareñas 2007), sugiriendo la ocurrencia compartida de eventos históricos a gran escala que también afectan a los mamíferos terrestres de mayor tamaño y con amplia capacidad dispersiva como el “Zorro de monte”. Sin embargo los patrones filogeográficos en cánidos sudamericanos hasta el momento han sido poco estudiados.

2.4 La biología de la conservación desde un enfoque filogeográfico

La diversidad genética es reconocida como un componente fundamental de la biodiversidad, que permite a la biota adaptarse a nuevas condiciones (Fraser & Bernatchez 2001). Por ello uno de los objetivos de la biología de la conservación es atender la variación intraespecífica para asegurar el sustento de los procesos responsables de la diversidad genética y del potencial evolutivo de un taxón (Sites & Crandall 1997; Haig 1998).

Desde la perspectiva poblacional es posible definir unidades para la conservación de dichos procesos, a partir de dos conceptos propuestos por Moritz (1994): el de unidad evolutiva significativa (ESU) y el de unidad de manejo (MU).

La ESU se caracteriza por ser una unidad geográficamente discreta, recíprocamente monofilética para los alelos de ADN mitocondrial y por mostrar una divergencia significativa en las frecuencias alélicas de los loci nucleares. Esto ofrece un criterio cualitativo para su identificación, basado en la distribución de alelos (mitocondriales y nucleares) en una filogenia. La MU, es una unidad demográficamente independiente que constituye un nivel de unidad de conservación por debajo de la ESU. Presenta, a pesar del grado de diferenciación filogenética, una divergencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas (nucleares o mitocondriales) (Moritz 1995). El manejo adecuado de estas poblaciones, demográficamente distintas e identificadas a través del análisis de secuencias mitocondriales, aseguraría la viabilidad de la ESU. Este enfoque pone el énfasis en la identificación de poblaciones históricamente aisladas unas de otras, por sobre la diversidad adaptativa actual (Bowen 1999).

Bajo el paradigma filogeográfico (Cuadro 1) Avise (1994) considera que las ESUs son clasificaciones en base a una filogenia de genes congruente, consistente con la separación de una población en grupos a un nivel biogeográfico. De esta forma muestra como el estudio de los patrones geográficos del componente genético constituye una aproximación para establecer prioridades tanto para la protección como para el manejo de los distintos taxones (Moritz & Faith 1998; Kuchta & Meyer 2001).

Las aproximaciones al concepto de ESU son diversas porque no hay una que funcione mejor en todas las situaciones (Crandall *et al.*, 2000). En definitiva el concepto de ESU constituye una herramienta que, a pesar de ofrecer cierta flexibilidad, permite un abordaje objetivo para establecer unidades prioritarias para la protección, especialmente de niveles taxonómicos bajos (Ryder 1986 citado en Fraser & Bernatchez 2001).

CUADRO 1. FILOGEOGRAFÍA, MARCADORES MOLECULARES Y ADN MITOCONDRIAL.

La filogeografía se define como el análisis espacial de linajes génicos, especialmente aquellos a nivel intraespecífico. Para esto combina las relaciones filogenéticas, reconstruidas a partir del análisis del ADN mitocondrial, con la información geográfica de la distribución del taxón de estudio.

De esa manera se logra identificar diferentes grados de la estructuración poblacional de las especies (Avice *et al.*, 1987). Concomitantemente permite inferir procesos históricos y demográficos que modelan la evolución de los linajes, dentro y entre especies cercanamente relacionadas. En definitiva logra establecer hipótesis sobre los procesos de diversificación evolutiva (Berningham & Moritz 1998). La filogeografía es propuesta como un puente entre dos campos tradicionalmente distintos la genética de poblaciones y la biología filogenética. Asimismo para el análisis e interpretación de los datos integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avice 1994, 2000)

Con el transcurrir del tiempo la filogeografía se ha posicionado como una disciplina influyente dentro de la biología evolutiva (Avice 1998).

MARCADORES MOLECULARES. Un marcador genético es una característica genética discreta y segregante que distingue a una población por virtud de su presencia, ausencia, alta o baja frecuencia (Crawford 1973). Le corresponde un lugar específico en el genoma, su mecanismo de herencia es bien conocido, su determinación es confiable y presenta variación (polimorfismo) en las poblaciones. Entonces cuando en las poblaciones ocurren procesos histórico-geográficos (división poblacional, expansión o colonización a distancia, entre otros) es esperable encontrar señales, a nivel de algún marcador genético, de tales eventos (Irwin 2002).

Entre ellos el ADN mitocondrial ocupa un lugar privilegiado (Avice 2000) por las características que se enumeran a continuación:

1) Exhibe, en relación al ADN nuclear, un número más elevado de polimorfismos nucleotídicos, a nivel intraespecífico, y una alta tasa de mutación. A partir de ello algunas regiones son particularmente hipervariables, como por ejemplo la región *D-Loop*, lo cual las hace propicias para resolver filogenias de reciente evolución (Moore 1995) o entre taxa cercanamente emparentados (Mercure *et al.*, 1993).

2) La mayoría de las variantes involucran sustituciones nucleotídicas o cambios de tamaño pequeño con lo cual son pocos los casos en que se observan cambios de longitud de la molécula entonces el orden de genes, en general es estable para tiempos evolutivos cortos.

3) El ADN mitocondrial se encuentra en líneas celulares somáticas y germinales, donde está ampliamente representado en número de copias.

4) La mayoría de individuos en una población son homoplásmicos, tienen un haplotipo mitocondrial preponderante. Esta característica resulta fundamental para poder realizar un análisis filogeográfico donde las unidades de estudio son los individuos.

5) Posee un tipo de herencia citoplasmático (no mendeliana) que se trasmite de forma uniparental (de origen materno) (Birky *et al.*, 1989) y normalmente sin recombinación génica lo que además permite considerar la molécula como un único locus. Esto permite la reconstrucción de genealogías matrilineales, las cuales son útiles porque son jerárquicas y muestran relaciones filogenéticas claras entre individuos que a su vez es posible superponer con la distribución geográfica del grupo de estudio.

Estas propiedades hacen que el ADN mitocondrial sea un marcador particularmente útil para estudios filogeográficos a nivel microevolutivo; la interpretación de los patrones observados es bastante directa dada, por lo general, la ausencia de recombinación a nivel de esta molécula.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los cánidos son un grupo de especies que en general presentan tasas de dispersión relativamente altas y gran versatilidad para adaptarse a un amplio rango de hábitats. Esta alta capacidad para la migración y el flujo de genes puede producir escasa estructuración filogeográfica en sus poblaciones.

El “Zorro de monte” exhibe el área de distribución actual más amplia, entre las especies de cánidos de la región neotropical, siendo Uruguay el punto más austral de la misma. Tchaicka y colaboradores (2007) han identificado una partición filogeográfica norte-sur, concordante con 2 de las subespecies clásicamente reconocidas: *C. t. azarae* y *C. t. entrerrianus*.

A partir de lo enunciado en párrafos anteriores, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

Las poblaciones del “Zorro de monte” ubicadas dentro de los límites geopolíticos del Uruguay son asignadas a C. t. entrerrianus, con una ausencia de subestructuración poblacional.

3.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue analizar cómo se estructura geográficamente la variación genética en poblaciones del “Zorro de monte” (*Cerdocyon thous*) al sur de la cuenca amazónica.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la variación intraespecífica basada en el ADN mitocondrial, empleando 2 marcadores: *D-Loop* y *Citocromo b*.

- Estimar el grado de estructuración genética y niveles de flujo génico entre poblaciones.
- Examinar la demografía histórica de las poblaciones, estableciendo patrones de migración y eventos de expansión – contracción.
- Determinar si los patrones genéticos y tiempos de divergencia apoyan la hipótesis de refugios para esta especie.
- Evaluar la afinidad genética y el estatus de conservación de las poblaciones existentes en la región de estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de las muestras

Se analizó un total de 47 muestras de “Zorro de monte” (*Cerdocyon thous*) depositadas en la colección del laboratorio de Genética de la Conservación (IIBCE). Fueron obtenidas de animales encontrados muertos atropellados en las rutas y de animales en cautiverio (Tabla 2). Las muestras de piel y músculo fueron conservadas en etanol 70% mientras las de sangre fueron colocadas en EDTA. Proporcionan una cobertura geográfica que corresponde en Uruguay a los departamentos de: Artigas, Rivera, Salto, Paysandú, Tacuarembó, Río Negro, Colonia, Rocha, Treinta y tres, Durazno, Canelones y Montevideo. También se dispone de muestras de Brasil, Paraguay y Venezuela. En la Figura 6 se señalan las localidades de colecta en relación al área de distribución de la especie.

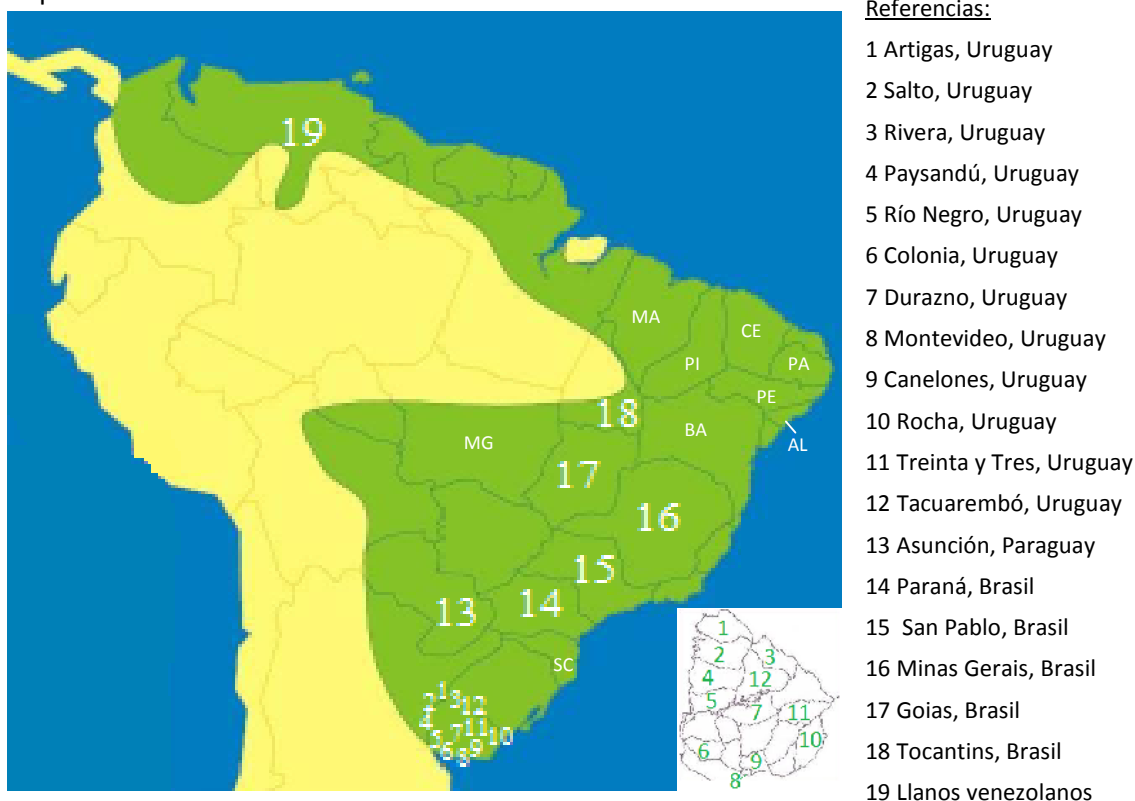


Figura 6. Mapa de distribución de la especie donde se ubicaron las localidades de colecta de los ejemplares utilizados. También se indica abreviado el nombre de las localidades de las secuencias de Genbank utilizadas. (SC: Santa Catarina, MG: Mato Grosso, BA: Bahía, PE: Pernambuco, PI: Piauí, PA: Paraíba, CE: Ceará, Ma: Maranhao).

A efectos comparativos, incorporamos al conjunto de datos generados en esta tesis, secuencias de *D-Loop* y de *Citocromo b* depositadas en Genbank especificadas en los Apéndices I y II. De esta forma obtuvimos una cobertura más completa del rango de distribución de la especie para ambos marcadores mitocondriales.

Tabla 2. Lista de especímenes utilizados en el estudio, se indican las distintas provincias biogeográficas. (Los especímenes están catalogados en la colección de la Unidad Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias).

ID Muestra	Colector	Localidad de Colecta	Coordenadas	Provincia Biogeográfica
Z40*	Cravino	Uruguay-Artigas	30°28'24.75"S/57°39'5.83"O	Pampa (n = 35)
Z22	González S	Uruguay-Salto	31°30'24.43"S/56°16'21.36"O	
Z30	González S	Uruguay-Salto	31°45'7.17"S/56°39'41.77"O	
Z113*	González S	Uruguay-Salto	31°21' 57"S/57°32'16.16"O	
Z121	González E	Uruguay-Rivera	31° 3'3.06"S/55°28'42.94"O	
Z23*	González S	Uruguay-Tacuarembó	31°43'26.45"S/55°49'59.32"O	
Z110*	González S	Uruguay-Tacuarembó	32°12' 58"S/56° 10' 42.6"O	
Z51	González S	Uruguay-Paysandú	32°38'20.75"S/57°45'53.70"O	
Z112	González S	Uruguay-Paysandú	32°18' 48.4"S/57° 32'29.3"O	
Z146	González S	Uruguay-Río Negro	33°27' 19"S/57° 54' 23"O	
Z49	González S	Uruguay-Río Negro	33°10' 03"S/58° 12' 08"O	
Z54	González S	Uruguay-Río Negro	32°52' 58" S/57° 27' 17"O	
Z42*	González S	Uruguay-Durazno	33°09' 09"S/56° 27' 36"O	
Z33	Villalba A	Uruguay-Treinta y Tres	33° 9'7.54"S/54°13'51.03"O	
Z21	González S	Uruguay-Rocha	33°58'60.00"S/53°45'0.00"O	
Z24*	González S	Uruguay-Rocha	33°57'11.37"S/53°37'36.24"O	
Z28	González S	Uruguay-Rocha	33°40'59.55"S/ 54°8'22.09"O	
Z31	González S	Uruguay-Rocha	33°54' 30"S/53° 43' 42"O	
Z32	González S	Uruguay-Rocha	31°48' 32"S/56° 15' 13"O	
Z35*	González S	Uruguay-Rocha	34°1'41.55"S/ 53°39'31.53"O	
Z36	Márquez A	Uruguay-Rocha	34° 1'58.17"S/53°32'22.82"O	
Z38*	González S	Uruguay-Rocha	34°05' 43"S/53° 38' 56"O	
Z39	González S	Uruguay-Rocha	34°16'22.81"S/54° 3'35.45"O	
Z41	González S	Uruguay-Rocha	34°01' 13"S/54°22'44"O	
Z58*	Roibal D	Uruguay-Rocha	33°58'21.37"S/53°32'55.24"O	
Z77*	Cosse M	Uruguay-Rocha	33°54' 12"S/53° 44' 57"O	

Continuación Tabla 2.

Z109*	Cosse M	Uruguay-Rocha	33°43' 46.9"S/54 09' 51.3"O	
Z61	Leizargoyen C	Uruguay-Montevideo	34°31'0.86"S/56° 5'45.86"O	
Z64*	Leyzargoyen C	Uruguay-Montevideo	34°31'0.86"S/ 56° 5'45.86"O	
Z76	Leyzargoyen C	Uruguay-Montevideo	34°31'0.86"S / 56° 5'45.86"O	
Z131	González S	Uruguay-Montevideo	34°31'0.86"S/56° 5'45.86"O	
Z57	González S	Uruguay-Canelones	34°41' 23" S/ 55°49' 17"O	
Z138	Leyzargoyen C	Uruguay-Colonia	33°52'4.40"S/57°21'51.48"O	
Z70	Cosse M	Uruguay		
Z72	Cosse M	Uruguay		
Z43	Fernanda	Brasil-Paraná	18°52'82"S/52°26'20"O	Bosque de A. <i>angustifolia</i> (n = 3)
Z81*	Barbanti M	Brasil-Paraná	18°52'82"S/52°26'17"O	
Z102*	Barbanti M	Brasil-Paraná	25°06'01"S/5°35'53"O	
Z82*	Barbanti M	Brasil-San Pablo	23°50'59"S/48°31'2,7"O	Bosque Paranaense (n = 4)
Z83*	Barbanti M	Brasil-San Pablo	20°48'57.5"S/48°47'40,5"O	
Z103*	Barbanti M	Brasil-San Pablo	21°36'110"/48°39'10.0"O	
Z119	Barbanti M	Brasil-Minas Geráis	19°46'1.93"S/43°51'8.56"O	
Z95	Barbanti M	Brasil-Goiás	18°10'54"S/53°03'30"O	Cerrado (n = 3)
Z115	Barbanti M	Brasil-Tocantins.	12°26'2.95"S/48°28'27.73"O	
Z118*	Barbanti M	Brasil-Tocantins	12°35'24.90"S/48°5'12.53"O	
Z84*	D'Elía G	Paraguay	25°34'77.2"S/ 57°33'93.4"O	Chaco (n = 1)
Z111*	González E	Venezuela	9°32'55.49"N/71°28'41.24"O	Llanos venezolanos (n = 1)
Z26*	Brum N	Uruguay-Colonia	Grupo Externo <i>Pseudalopex gymnocercus</i>	
Z29*	González S	Uruguay-Rocha		
Z100*	Barbanti M	Brasil-San Pablo	Grupo externo <i>Pseudalopex vetulus</i>	
Z116*	Barbanti M	Brasil-Tocantins		

(Se indica con un asterisco las muestras que fueron secuenciadas con ambos marcadores genéticos).

4.2. Extracción y amplificación del ADN

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Medrano y colaboradores (1990), con modificaciones.

En las extracciones de músculo y piel se usó aproximadamente 25mg de muestra, mientras que en las extracciones a partir de pelos, se utilizó una toma aproximada de 50

pelos con bulbo piloso. Asimismo en las extracciones a partir de sangre se usó 1 mL de muestra.

La calidad del ADN obtenido fue analizada en una corrida electroforética en Buffer TBE 1X (0.8µg. de agarosa 1X y 80mL de buffer TBE 1X), en gel de agarosa al 1% conteniendo Bromuro de Etidio a una concentración final de 5mg/mL. La concentración del ADN se verificó en nanogramos por microlitro mediante Nanodrop.

4.2.1 Amplificación de un fragmento de la región *D-Loop* mitocondrial

La amplificación del fragmento de interés, aproximadamente 460 pares de bases (pb), se logró empleando la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos universales Thr-L15910 y DLH-16498 (Kocher *et al.*, 1989) cuya secuencia nucleotídica se detalla a continuación:

Oligonucleótido	Secuencia
DLH-16498	5'GAATTCCCCGGTCTTGTAACCC3'
Thr 15910	5'CCTGAACTAGGAACCAGATG3'

La reacción fue llevada a cabo en un volumen de reacción de 25µL conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos: Buffer 10x [2.5µL], MgCl₂ [2.5mM], dNTPs [2.5mM], primer 1 25pmol, primer 2 25 pmol, BSA 0.28 mg/mL Taq ADN polimerasa 0.2U, ADN [100 ng/µL].

Se utilizó un termociclador programable Hybaid Omnigene y se incluyeron controles negativos en todas las reacciones con las siguientes condiciones de ciclado que se detallan a continuación.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min.	
Desnaturalización	94 °C	2 min.	
Asociación	50 °C	1 min.	35
Extensión	72 °C	1 min. 50seg	
Extensión final	72 °C	8 min.	

La correcta amplificación de los productos de PCR fue comprobada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, pH 8.0. La misma se reveló por tinción con Bromuro de Etidio (5mg/mL), incluido en el gel y posterior exposición a luz UV.

Finalmente se realizó la purificación y secuenciación automática en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador ABI3130, Applied Biosystems) y Macrogen Inc. de Corea (secuenciador ABI3730XL, Applied Biosystems)

4.2.2 Amplificación de un fragmento del gen *Citocromo b* mitocondrial

La región polimórfica informativa del gen del *Citocromo b*, de aproximadamente 460pb, fue amplificada empleando los primers universales H-15149 y L-14724 (Irwin & Kocher, 1991) cuya secuencia se muestra a continuación:

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
H-15149	5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3'
L-14724	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG3'

La reacción fue llevada a cabo en un volumen de reacción de 25µL conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos: Buffer 10x [2.5µL], MgCl₂ [2.5mM], dNTPs [2.5mM] , primer 1 25pmol, primer 2 25 pmol, BSA 0.28 mg/mL Taq ADN polimerasa 0.2U, ADN [100 ng/µL].

Se utilizó un termociclador programable Hybaid Omnigene y se incluyeron controles negativos en todas las reacciones con las condiciones de ciclado que se indican a continuación.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min.	
Desnaturalización	94 °C	1 min.	
Asociación	56 °C	1 min.	35
Extensión	72 °C	1 min.	
Extensión final	72 °C	10 min.	

La correcta amplificación de los productos de PCR fue comprobada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, pH 8.0. La misma se reveló por tinción con Bromuro de Etidio (5mg/mL) incluido en el gel y posterior exposición a luz UV.

Finalmente se realizó la purificación y secuenciación automática en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador ABI3130, Applied Biosystems) y Macrogen Inc. de Corea (secuenciador ABI3730XL, Applied Biosystems)

4.3. Análisis de los datos

Una vez obtenidas las secuencias, los espectroferogramas fueron visualizados y editados manualmente empleando el software MEGA version 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar 2011). Se realizó la exploración de los datos de las secuencias calculando, para cada set de datos: número de sitios informativos, tasas de transiciones, transversiones y composición nucleotídica.

También se realizaron alineamientos múltiples para cada grupo de datos, por un lado para *D-Loop* y por otro lado para *Citocromo b*, empleando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Efectuamos una búsqueda heurística del mejor alineamiento a partir de un árbol guía construido por el método de unión de vecinos, según la matriz de distancias producida con los alineamientos pareados entre secuencias.

Además, dado que todos los métodos filogenéticos hacen asunciones acerca del proceso de sustitución del ADN (Felsenstein 1988 en Posada & Crandall, 2001) establecimos el modelo de evolución del ADN que mejor se ajusta a los datos, entre los 24 dispuestos en el análisis implementado con MEGA version 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar 2011) y de acuerdo al criterio de Akaike (Akaike 1974).

4.3.1. Diversidad Genética

El nivel de variación genética en *Cerdocyon thous* fue medido, empleando la versión para Windows del software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), en términos de sitios polimórficos (S), de diversidad haplotípica (Hd) (Nei 1987 citado en Schneider *et al.*, 2000) y diversidad nucleotídica (π) (Tajima 1983).

El número de Sitios polimórficos es una medida de la variabilidad genética que indica el número de loci que presentan más de un alelo por locus. Para calcularlo Hartl (2000) plantea la siguiente fórmula: $S = \text{sitios polimórficos} / \text{sitios totales}$.

La Diversidad haplotípica indica la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes dentro de la muestra, lo cual se expresa de acuerdo con la siguiente fórmula: $Hd = X_i / n$ donde X_i es el número de copias que contiene el gen en la muestra, n es el número de muestras y P_i es la frecuencia en la muestra del i -ésimo haplotipo. (Nei 1987)

La Diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición y tomados al azar, sean diferentes (Tajima 1983; Nei 1987). Ello se expresa en la siguiente fórmula: $\pi = \sum p_i p_j \pi_{ij}$ donde π_{ij} es la proporción de diferentes nucleótidos entre la secuencia i y la secuencia j ; p_i es la frecuencia de la secuencia i y p_j es la frecuencia de la secuencia j .

4.3.2. Análisis Filogenéticos

Las secuencias fueron colapsadas en haplotipos con DnaSP v.5 (Librado & Rozas 2009) a partir de los cuales se realizaron las inferencias filogenéticas.

La reconstrucción de la filogenia entre haplotipos fue obtenida empleando varios métodos de agrupamiento clasificados dentro de los métodos de distancias, parsimonia y verosimilitud. Se entiende esto una estrategia que da robustez a la topología obtenida.

Para ello se utilizó el software MEGA version 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar 2011) con el cual previamente también se estableció, de acuerdo con el criterio de Akaike (Akaike, 1974), que el modelo de evolución de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a los datos de *D-Loop*, es el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (Hasegawa *et al.*, 1985) con distribución gama = 0.2067. La distribución gama permite ajustar tasas evolutivas no uniformes entre sitios nucleotídicos, considerando 4 categorías y tomando una fracción de los sitios como evolutivamente invariantes. Para el fragmento del *Citocromo b*, el modelo Tamura Nei (T93) (Tamura, 1992) resultó más adecuado, siguiendo el mismo criterio.

El modelo HKY85 incorpora múltiples factores; por un lado las tasas de evolución nucleotídica desiguales para los 4 nucleótidos, asumiendo entonces que las frecuencias

de las bases difieren entre sí. Por otro lado también incluye otros parámetros que definen las tasas de transversiones y transiciones separadamente. Además dentro de las transiciones puede distinguirse entre purinas (Adenina y Guanina) y pirimidinas (Citosina y Timina). Ello es tenido en cuenta en el modelo T93 que introduce los parámetros α_1 y α_2 en reemplazo del parámetro α , presente en el modelo HKY85 que considera una única tasa para las transiciones.

Una vez determinado el modelo de sustitución nucleotídica para cada marcador genético se realizaron las reconstrucciones filogenéticas de acuerdo con 3 criterios de optimización distintos: i) Unión de Vecinos (Saitou & Nei 1987) a partir de una búsqueda heurística empleando una matriz de distancias nucleotídica según el modelo de Tamura Nei 1993 + G (Tamura 1992) para ambos marcadores; ii) Máxima Parsimonia (Fitch 1971), empleando una búsqueda heurística con el algoritmo CNI (Close Neighbor interchange) a partir de 1000 réplicas con adiciones al azar de secuencias y considerando 4 estados de carácter (Kumar *et al.*, 1993; Nei & Kumar 2000), también se calculó el índice de consistencia y el de retención; y iii) Máxima Verosimilitud (Felsenstein 1981) incorporando el modelo de Tamura Nei 1993 + G (Tamura 1992), para ambos marcadores, implementando una búsqueda heurística con el algoritmo CNI (Close Neighbor interchange).

En los tres casos se ignoraron los gaps para el análisis y el apoyo a los nodos fue evaluado mediante Bootstrap no paramétricos sobre 1000 réplicas (Felsenstein 1985).

También se realizó un análisis filogenético utilizando inferencia bayesiana con el software BEAST 1.6.4 (Drummond & Rambaut 2007), a partir de una corrida de cadenas de Markov (Drummond *et al.*, 2002) con 10^5 generaciones recogiendo los árboles filogenéticos obtenidos cada 10^2 generaciones, siendo descartados los primeros 2500 (que equivalen al 25% de los 10000 árboles obtenidos).

El apoyo de la topología intraespecífica fue evaluada mediante probabilidad posterior bayesiana (BPP).

En todos los análisis se estableció como grupo externo a secuencias de dos especies del Género *Pseudalopex*, también generadas en este trabajo de tesis. El tiempo del Ancestro Común Más Reciente (TMRCA) para dicho grupo externo fue utilizado para calibrar los nodos en la filogenia inferida con Cadenas de Markov. Este dato corresponde con 2.8

Millones de Años y se basa en comparaciones entre el tiempo de divergencia de secuencias de ADN y las primeras apariciones de las especies en el registro fósil, estimadas por Wayne y colaboradores (1997). Ello nos permitió estimar la tasa de evolución para ambos marcadores, bajo un modelo de reloj molecular relajado (Drummond *et al.*, 2006) y el tiempo de coalescencia del linaje de *Cerdocyon thous*.

4.3.3 Estimación de Redes de Haplotipos

Otra forma de inferir las relaciones intraespecíficas entre haplotipos fue usando el algoritmo de “Red Mediana de Uniones” (Median Joining Network, por su nombre en inglés) (Bandelt *et al.*, 1999). Esta aproximación para estimar genealogías intraespecíficas toma en cuenta fenómenos propios del nivel poblacional como la coexistencia en una genealogía, de genes derivados y ancestrales, o la ocurrencia de eventos de recombinación; aunque en nuestro caso utilizamos marcadores mitocondriales. Dichos eventos producen relaciones reticuladas que no siempre son representadas de forma adecuada a través de un árbol que se bifurca.

Para implementar el método de “Median Joining Network” utilizamos el software Network 4.5.1.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/>), a partir del número de sustituciones pareadas. Además el criterio de optimización, Máxima Parsimonia, introduce vectores medios que representan haplotipos intermedios ausentes (Polzin *et al.*, 2003).

Para ello utilizamos los parámetros fijados en el software por defecto, seleccionando el algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) por tratarse de datos de ADN, que son multiestado, con un valor de $\epsilon = 0$ (ponderación de la distancia genética). También se incluyó una secuencia de *Pseudalopex gymnocercus*, como grupo externo para aumentar la resolución de la red. Asimismo para reducir la complejidad de la red y evidenciar las relaciones entre haplotipos, en el caso de los datos de *D-Loop*, el análisis se realizó en cada clado por separado y seleccionando, previo al procesamiento de los datos, la opción “Star Contraction” (Forster *et al.*, 2001) que además contribuye a evidenciar topologías tipo estrella, características de eventos de expansión poblacional.

4.3.4 Análisis de la Estructura Poblacional

La diferenciación geográfica de haplotipos fue cuantificada usando el análisis jerárquico de varianza (AMOVA), implementado en el software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), evaluado en permutaciones aleatorias múltiples (Excoffier *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1999). Esta aproximación permite incorporar información sobre diferencias entre haplotipos así como también sobre frecuencias de los mismos. A los efectos del análisis definimos estructuras genéticas particulares entre los haplotipos. Agrupamos las localidades de colecta, de acuerdo a las provincias Biogeográficas encontradas en el área de estudio, formando lo que denominamos “Agrupación poblacional”, al entender que la distribución de los biomas condiciona en parte la distribución de las especies animales. Así determinamos 4 “Agrupaciones Poblacionales: i) Sureste, donde se incluyen las muestras obtenidas de localidades ubicadas en los Llanos venezolanos, Pará y Caatinga (Venezuela, Ceará, Maranhao; Pernambuco, Alagoas, Paraíba y Bahía); ii) Cerrado, donde se agrupan localidades de colecta correspondientes a dicha provincia biogeográfica y el Chaco (Asunción, Mato Grosso, Tocantins, Goiás); iii) Bosques-Sur, corresponde a las localidades ubicadas en el sur de las provincias biogeográficas del Bosque Paranaense y de *Araucaria angustifolia* (Minas Gerais, San Pablo, Paraná y Santa Catarina); iv) Pampa, en la distribución más austral de distribución del “Zorro de monte” (Río Grande y varios departamentos del Uruguay).

Luego los posibles escenarios de subdivisión poblacional fueron determinados, a partir del Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA, por sus siglas en inglés) implementado con el software SAMOVA 1.0. (Dupanloup *et al.*, 2002). Para ello asumimos que el número de agrupaciones geográficas (K), al contar con 4 “Unidades poblacionales”, podía ser de 2 o 3, para el conjunto de datos tanto de *Citocromo b* como de *D-Loop*. De esta forma se cubre tanto el muestreo de localidades individuales, agrupadas según las provincias biogeográficas, en las “Unidades Poblacionales”, hasta agrupaciones mayores. El uso de múltiples niveles (K) nos permitió investigar hasta qué punto geográfico las unidades son anidadas para aclarar mejor los patrones jerárquicos de la estructura de la población. Aquellas agrupaciones que maximizan los porcentajes de la varianza entre grupos (F_{CT}), y minimizan los porcentajes dentro de grupos (F_{SC}), se asume que reflejan la subdivisión geográfica más probable (Excoffier *et al.*, 1992).

En algunos casos las coordenadas geográficas fueron identificadas para cada sitio mediante Google Earth (<http://www.google.com/earth/index.html>); en el caso de las “Agrupaciones poblacionales” se obtuvo un consenso entre los puntos geográficos de las localidades de colecta incluidas en cada una.

También fueron obtenidos valores de F_{ST} (Wright 1951 citado en Slatkin 1993), que pueden usarse para obtener un estimador indirecto del nivel promedio de flujo génico entre poblaciones. La significancia estadística (p -valor= 0.05) del valor de F_{ST} fue evaluada sobre 10000 permutaciones. Se generó una matriz de valores pareados de F_{ST} estimados a partir de las frecuencias haplotípicas (Weir & Cockerham 1984).

El flujo génico dentro y entre provincias biogeográficas también fue aproximado como N_m , el número de migrantes hembras por generación, que es estimado empleando la expresión $F_{st} = 1/(1+2N_m)$ donde N es el tamaño efectivo de la población de hembras y m es la tasa de hembras migrantes (Slatkin 1987, 1993; Baker *et al.*, 1994).

4.3.5 Aislamiento por Distancia

Para identificar las barreras geográficas históricas más probables evaluamos el grado al cual las diferencias genéticas entre los ejemplares distribuidos en el área de estudio, puede ser explicada mediante aislamiento por distancia. Para ello implementamos el Test de Mantel (Mantel 1967; Mantel & Valand 1970), utilizando el software Past versión 2.11 (Hammer & Harper 2001).

Para realizar la correlación se utilizaron 2 matrices completas que fueron computadas, a partir de datos originales. Una de ellas correspondiente a las diferencias nucleotídicas, utilizando la corrección del modelo Kimura 2 parámetros (Kimura 1980) (el software implementado no dispone de otros modelos); la otra incorpora las distancias geográficas expresadas en valores Euclidianos. A partir de la correlación entre ellas, se obtuvo el valor del coeficiente de correlación de Pearson (R) a partir de la comparación entre la correlación observada y la esperada por el azar para 5000 permutaciones aleatorias con un nivel de significación para un p -valor = 0.05.

CUADRO 2. TEORÍA DEL COALESCENTE. (Kingman 1980)

La teoría del coalescente constituye un marco conceptual para el estudio de los procesos que influyen históricamente sobre las poblaciones, dando lugar a la distribución actual de su variabilidad genética. Mediante un tratamiento probabilístico vincula los parámetros poblacionales con las genealogías de genes. Se basa en la teoría neutralista (Kimura & Ohta 1969; Kimura 1980). Considera que las mutaciones neutras se acumulan a lo largo de las ramas de los árboles (o filogramas) que reconstruyen las relaciones filogenéticas estimadas.

El tiempo de coalescencia es aquel hasta un ancestro común donde inicia la separación de linajes por deriva génica. La coalescencia para herencias matrilineales fue formulada por Avise y colaboradores (1987) a partir de una enunciación de Tajima (1983) para árboles de genes nucleares bajo selección neutral. Dichas formulaciones permiten calcular las probabilidades para los tiempos de coalescencia de pares de linajes y de conjuntos de linajes. Asimismo, debe tenerse en cuenta que en el proceso de coalescencia influyen de un modo determinante factores demográficos poblacionales y la dinámica de los procesos de extinción y recolonización, por lo cual se han analizado distintos modelos de estructura metapoblacional (Griffiths & Tavaré 1997).

4.3.6 Demografía histórica: Estimación de la Expansión Poblacional

Los parámetros históricos-demográficos fueron estimados empleando dos aproximaciones diferentes, una basada en "Mismatch Distribution" (Rogers & Harpending 1992; Schneider & Excoffier 1999) y la otra según el modelo de "Bayesian Skyline Plot" (Drummond *et al.*, 2005).

Ambos métodos estiman la dinámica poblacional en el tiempo basados en la teoría del coalescente, un proceso estocástico que describe cómo los factores genéticos en las poblaciones determinan la forma de la genealogía, basada en las secuencias genéticas de los distintos linajes.

El modelo de "Bayesian skyline plot" es un modelo de tramos constantes del tamaño poblacional que puede ajustarse en un amplio rango de escenarios demográficos. A diferencia del modelo de "Mismatch Distribution", no depende de un modelo paramétrico de demografía histórica preestablecido, el cual es básicamente una función matemática que describe el cambio en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo. Esta diferencia lo hace un método más flexible y sensible para detectar la dinámica poblacional subyacente a los datos de las secuencias.

El análisis de la distribución de diferencias pareadas ("Mismatch Distribution") fue realizado, para ambos marcadores, con el software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Representa de acuerdo a un patrón unimodal o multimodal la distribución observada del número de diferencias entre pares de haplotipos y consecuentemente

informa sobre la historia de cambios en el tamaño poblacional. También permite obtener información de parámetros demográficos mediante la aproximación no lineal de Schneider & Excoffier (1999) para el modelo de “Expansión repentina” desarrollado por Rogers & Harpending (1992). Dichos parámetros son: tamaño poblacional efectivo antes y después de ocurrida la expansión poblacional (θ_0 y θ_1 respectivamente) y tiempo de expansión (τ medido como $1/2\mu$ generaciones, siendo μ la tasa de mutación). El cálculo fue realizado a partir de 100 réplicas para un p-valor de 0.05.

Para evaluar la validez de este modelo de expansión por etapas, nos basamos en el estadístico de la distribución de la suma de los desvíos cuadrados (SSD) entre las frecuencias observadas y las esperadas de acuerdo al “Mismatch Distribution”. Los parámetros también fueron estimados, para ambos marcadores y a través del software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010); el nivel de significación (p-valor = 0.05) está dado a partir de 1000 permutaciones. Otro estimador calculado que complementa al SSD fue el valor de Raggednes (r).

El modelo de “Bayesian Skyline Plot” utiliza Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar la distribución posterior del tamaño poblacional efectivo en la muestra a través del tiempo y directamente de los datos de secuencias, sin especificar ningún modelo de sustitución nucleotídica. A diferencia de métodos anteriores, incluye intervalos de confianza para las estimaciones del tamaño poblacional efectivo en cada punto en el tiempo, hasta el Ancestro Común más Reciente en el Tiempo (TMRCA) para el conjunto de genes. Los intervalos de confianza representan la incertidumbre de la inferencia del coalescente así como también de la filogenia resuelta.

Los análisis del “Bayesian Skyline Plot” fueron realizados con el software BEAST 1.6.4 (Drummond, Ho, Rawlence & Rambaut 2007) para ambos marcadores y en ambos clados a excepción del clado Sureste con el Citocromo *b* en cuyo caso, dado el bajo número de individuos muestreados no fue posible correr el análisis. Las estimaciones del tamaño poblacional efectivo durante el tiempo se obtuvieron a partir de los datos de las secuencias, seleccionando un reloj molecular estricto (Drummond & Suchard, 2010) de acuerdo a lo calculado, seleccionando el modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos (HKY o T93, según se trate de *D-Loop* o *Citocromo b*) y estableciendo 10 grupos que determinan los intervalos de confianza para el cálculo de los parámetros poblacionales.

Para ello se corrieron 10^6 iteraciones, muestreando la genealogía obtenida y los parámetros cada 10^3 generaciones. En el caso del clado Sur para *Citocromo b* se repitió la corrida para 10^7 iteraciones, muestreando la genealogía obtenida y los parámetros cada 10^4 generaciones. De esta forma todos los factores fueron optimizados de acuerdo al criterio establecido por el programa basado en el Tamaño poblacional efectivo (ESS) donde valores menores a 100 indican que hay muchas muestras correlacionadas y por tanto que no representan una buena probabilidad posterior que apoye el resultado obtenido.

Para el tratamiento de los datos tuvimos en cuenta analizar por separado los clados Sur y Sureste, obtenidos de acuerdo al quiebre filogeográfico encontrado, que corresponde al hallado por Tchaicka y colaboradores (2007). De esta forma evitamos el efecto de estructuración poblacional que puede confundirse con una señal de expansión demográfica y conducir a un sesgo en los estimadores de los parámetros poblacionales así como también del tamaño poblacional (Strimmer & Pybus 2001). Este sesgo implica que en la gráfica demográfica obtenida con “Skyline plot” los patrones reflejen cambios en el grado de estructuración más que en el tamaño promedio de la población. De hecho un aumento en la subdivisión podría causar un ajuste en los tiempos promedio de coalescencia y un incremento en la variación genética (Jesus *et al.*, 2006)

Otra forma de evaluar aspectos demográficos recientes de la muestra en estudio se realizó mediante la prueba de neutralidad de Tajima, (1989) y la prueba de neutralidad de Fu (1997). Estas fueron calculadas para los dos clados reconocidos Sur y Sureste, empleando el software Arlequín 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) para Windows. Se encuentran valores negativos y significativos cuando ha habido una barrida selectiva reciente o cuando la población ha sufrido recientemente un incremento brusco de su tamaño con lo cual tiende a aparecer un exceso de mutaciones recientes (Excoffier *et al.*, 2006).

5. RESULTADOS

5.1 *Análisis descriptivo de las secuencias*

Hemos obtenido secuencias de dos marcadores del ADN mitocondrial: *Citocromo b* y *D-Loop*. (Figura 7)

A T T A A T G G C T T G C C C A T G C A T A T A A G C A T G T A C A T A

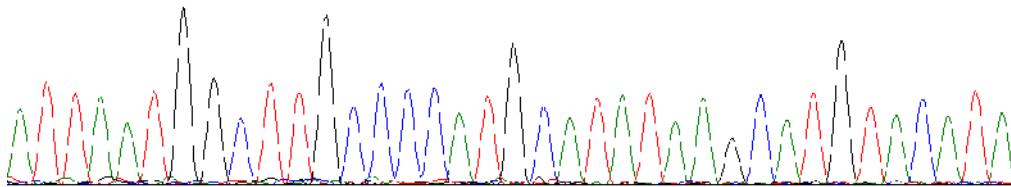


Figura 7 Sección de un espectroferograma, entre los 180pb. y 200pb. –aprox–, de la secuencia editada de *D-Loop* para la muestra Z54 colectada en la localidad de Río Negro – Uruguay. Cada nucleótido es asignado con un color de acuerdo a la siguiente codificación: **Adenina**, Guanina, **Citosina** y **Timina**.

De un total de 51 muestras colectadas se amplificaron y secuenciaron con éxito 24 muestras para el gen del *Citocromo b* (460 pb.). También incluimos 8 secuencias tomadas de Genbank obteniendo un total de 32 secuencias. De éstas, 28 corresponden al género *Cerdocyon* y las 4 restantes al género *Pseudalopex*, utilizado como grupo externo en los análisis filogenéticos.

Las secuencias de Genbank en general pertenecían a un fragmento mayor, por lo cual todo el conjunto fue alineado logrando un fragmento con una misma longitud de 347pb, donde el solapamiento era completo. Ello es necesario para hacer comparables las secuencias en los análisis posteriores.

Con estos datos cubrimos 18 localidades y 4 países (Venezuela, Paraguay, Brasil y Uruguay), dentro del rango de distribución del “Zorro de monte”. Asimismo detectamos 21 transiciones y 7 transversiones, de acuerdo al sesgo esperado que

muestra en general una tasa aproximada de $\frac{1}{2}$ para la relación N° transversiones / N° transiciones. Estos tipos de sustitución nucleotídica implican para el caso de las transversiones un cambio de base nitrogenada (de purina a pirimidina) mientras en el caso de las transiciones el cambio ocurre pero manteniendo la base nitrogenada, es decir entre purinas (Adenina $\leftrightarrow$ Guanina) o pirimidinas (Citosina $\leftrightarrow$ Timina). Entonces existen 8 tipos de transversiones y 4 de transiciones, con lo cual es mayor la probabilidad de que ocurra una transición sobre la probabilidad de que ocurra una transversión. En consecuencia se espera encontrar una proporción mayor de transiciones que de transversiones, como la observada en este trabajo. Esta información es empleada para determinar el tipo de modelo de Sustitución nucleotídica de las secuencias de estudio.

También determinamos 12 haplotipos (Tabla 3), de los cuales 7 constituyen haplotipos nuevos (Anexo III), mientras los 5 restantes han sido reportados previamente (Tchaicka *et al.*, 2007; Wayne *et al.*, 1997).

Para el marcador *D-Loop* amplificamos y secuenciamos con éxito una región de 460pb., para el total de las 51 muestras colectadas e incluidas en este trabajo. De ellas 47 corresponden a ejemplares del género *Cerdocyon* mientras las 4 restantes pertenecen al género *Pseudalopex* que fue utilizado como grupo externo en los análisis filogenéticos, del mismo modo que para el marcador *Citocromo b*. Además utilizamos 62 secuencias, también de ejemplares del género *Cerdocyon*, provenientes de Genbank haciendo un total de 113 secuencias. Nuevamente la longitud de las secuencias de Genbank superaba en general, la extensión de las generadas por nosotros por lo cual realizamos un alineamiento con todo el conjunto obteniendo un fragmento de 313pb. donde el solapamiento era completo.

De las 113 secuencias recuperamos 49 haplotipos (Tabla 4), 5 de los cuales constituyen haplotipos nuevos (Apéndice IV) mientras los 44 restantes han sido publicados previamente (Tchaicka *et al.*, 2007 y Carnielli *et al.*, 2009).

El conjunto cubre 30 localidades, y 4 países del rango de distribución del “Zorro de monte”, que coinciden con los ya mencionados para el *Citocromo b*. Asimismo observamos 70 transiciones y 25 transversiones, nuevamente de acuerdo con el sesgo esperado.

En ambos marcadores, observamos que la mayoría de los haplotipos obtenidos son específicos de una localidad, aunque también tenemos en cuenta que el tamaño muestral es limitado y varias de las localidades sólo cuentan con un ejemplar colectados.

Los haplotipos específicos acotados a una localidad corresponden con el 65,3% del total, para *D-Loop*, y el 58.4%, en el caso del *Citocromo b*. Los haplotipos compartidos ocurren entre localidades restringidas a áreas geográficas próximas, dentro del área de estudio. El haplotipo hallado para el marcador *D-Loop*, más común y ampliamente distribuido (DL2) es compartido por 19 individuos y se encuentra ausente, dentro del área de estudio, sólo en las provincias biogeográficas de Llanos Venezolanos y Chaco. Análogamente, para el *Citocromo b*, el haplotipo más frecuente (Cb2), no se encuentra en algunas de las provincias biogeográficas pertenecientes a la región sureste de Brasil y al norte del río Amazonas (Pará, Caatinga y Llanos Venezolanos).

El análisis estadístico para las medidas de diversidad genética de las secuencias mostró un nivel elevado de variación haplotípica (H_d) observada entre individuos. Otros resultados obtenidos que caracterizan a las secuencias de *C. thous* indican que tanto el *Citocromo b* como el *D-Loop* poseen niveles de polimorfismo nucleotídico entre moderado y elevado. El *Citocromo b* presenta 28 sitios polimórficos mientras el *D-Loop* cuenta con 103.

Los resultados que obtuvimos nos indican que, para los fragmentos amplificados en *C. thous*, dichos marcadores también presentan diferencias en los valores relativos de la composición nucleotídica. Las secuencias de *Citocromo b* presentan un sesgo composicional con un déficit de guanina: C = 12.52%, T = 32.58%, A = 28,34%, G = 16,55%. Las secuencias de *D-Loop* también muestran un sesgo composicional pero con un déficit de citosina: C = 17.09%, T = 27.02%, A = 30,11%, G = 25,78%.

5.2 Análisis Filogenéticos y Redes de Haplotipos

Los distintos métodos de reconstrucción filogenética que utilizamos (Unión de Vecinos, Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) generaron topologías altamente concordantes

Mediante el método de parsimonia se obtuvieron con *Citocromo b* 57 árboles igualmente parsimoniosos de 58 pasos y con *D-Loop* 179 árboles igualmente parsimoniosos de 169 pasos.

Las muestras analizadas se agruparon en dos clados monofiléticos recíprocos con buen soporte estadístico. Sin embargo los árboles obtenidos con Inferencia Bayesiana fueron más informativos, exhibiendo un mejor apoyo estadístico con valores elevados (>0.6) de probabilidad posterior para todos los nodos de mayor orden (Figuras 8 y 9).

Los clados obtenidos muestran un quiebre filogeográfico concordante con una segregación geográfica Sur – Sureste de los haplotipos.

La gran concordancia que encontramos nos indica que existe una asociación entre haplotipos de provincias geográficamente vinculadas. Denominamos clado Sur a aquel que incluye los especímenes pertenecientes a las provincias biogeográficas de Pampa, Cerrado, Chaco, Bosque Paranaense y Bosque de *Araucaria angustifolia*. Éstas ocupan la mayoría del área muestreada e incluyen casi todos los ejemplares pertenecientes a localidades del Sur (Tabla 4). Análogamente denominamos Sureste al clado que incluye los haplotipos de especímenes pertenecientes a las provincias biogeográficas de Llanos Venezolanos, Pará y Caatinga.

Ambos haplogrupos no presentaron apoyo estadístico en las ramas internas, formando politomías. La estructura poco robusta y la presencia de ramas cortas son características de una filogenia estrella que se relaciona con un patrón de expansión poblacional reciente (Avice 2000).

Las muestras del género *Pseudalopex* utilizadas como grupo externo se situaron basales a ambos clados de *Cerdocyon thous*.

Tabla 3 Distribución de los haplotipos obtenidos, a partir de secuencias de *Citocromo b* con 347pb., de 28 ejemplares del “Zorro de monte”. Las 18 localidades de colecta fueron agrupadas, de acuerdo a las provincias biogeográficas y a su distribución en el área de estudio, constituyendo 4 agrupaciones poblacionales. Los individuos con haplotipos idénticos dentro de cada localidad de colecta son listados horizontalmente, en forma consecutiva y en la columna anterior inmediata se correlacionan con el haplotipo correspondiente

Localidad de Colecta	“Agrupación Poblacional”	Haplotipos	Individuos	N° Hap./N° Ind.
Venezuela	1 SURESTE (Llanos Venezolanos + Pará + Caatinga)	Cb6	Z111	1/1
Brasil-Maranhao		Cb4	EF106992	1/1
Brasil-Ceará		Cb4	EF106991	1/1
Brasil-Sureste		Cb1	AF028145	1/1
Brasil-Pernambuco	2 CERRADO (Cerrado + Chaco)	Cb5	EF106993	1/1
Paraguay		Cb2	Z84	1/1
Brasil-Tocantins		Cb8	Z118	1/1
Brasil Mato Grosso		Cb2	EF106994	1/1
Brasil-Goiás		Cb2	Z95	1/1
Brasil-San Pablo		Cb3, Cb2	Z82, Z103	2/3
Brasil-Paraná	3 BOSQUES-SUR (Bosque Paranaense + Bosque de <i>Araucaria angustifolia</i>)	Cb3	Z83	2/3
		Cb2, Cb3	Z81, Z102	
		Cb3	EF106990	
Brasil-Río Gde. del Sur	4 PAMPA	Cb2	EF106989	1/1
Uruguay-Artigas		Cb9	Z40	1/1
Uruguay-Salto		Cb10	Z113	1/1
Uruguay-Tacuarembó		Cb2, Cb9	Z110, Z23	2/2
Uruguay-Durazno		Cb9	Z42	4/6
Uruguay-Rocha		Cb9, Cb11, Cb12, Cb7	Z35, Z38, Z109, Z58	
		Cb9 Cb7	Z24 Z77	
Uruguay-Montevideo		Cb2	Z64	1/1

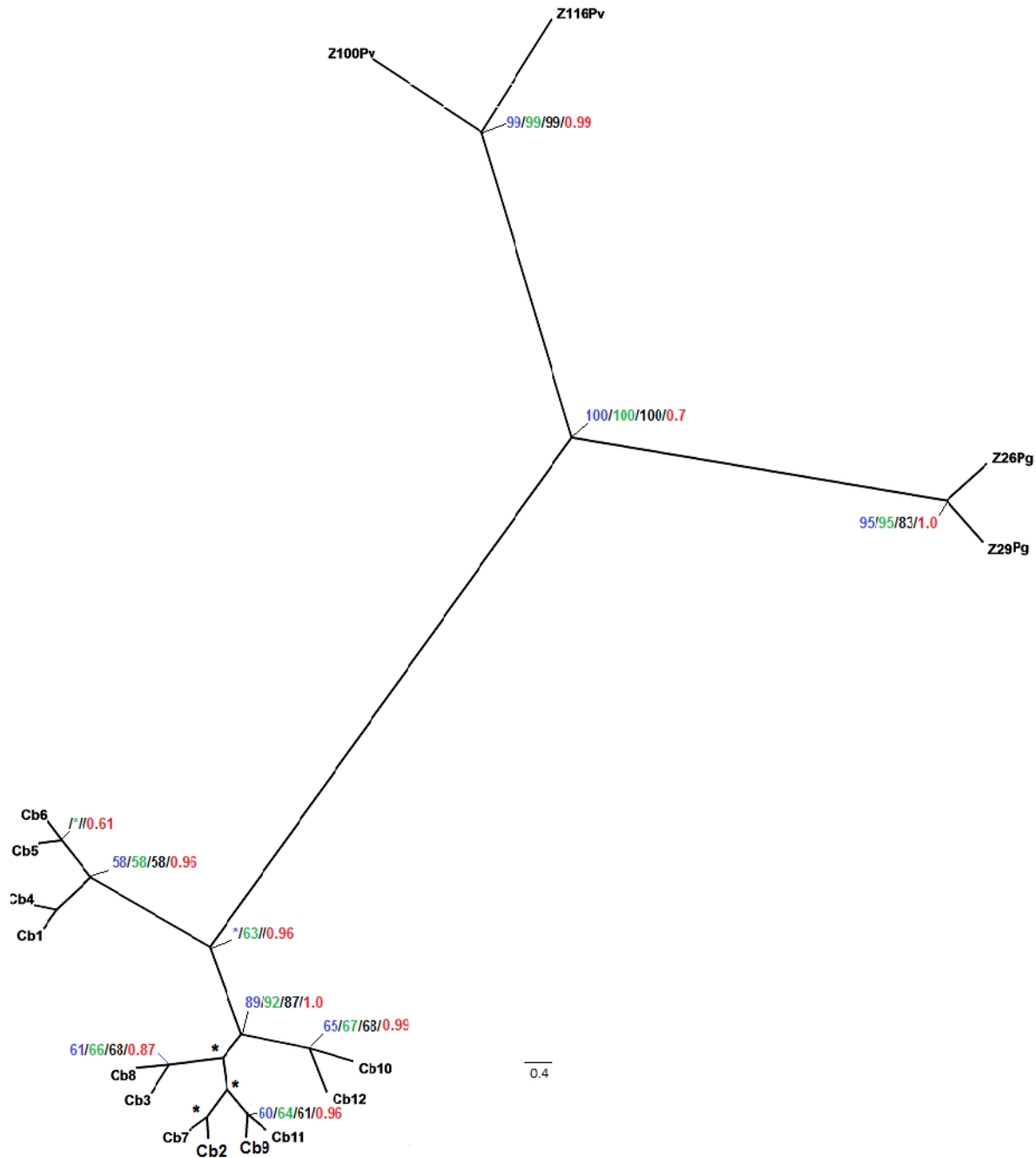


Figura 8 Arbol de Consenso por regla de la mayoría, de *Citocromo b*. Se obtuvo con Inferencia Bayesiana (■), bajo el modelo evolutivo T93, para 12 haplotipos de 347 pb. de especímenes de *C. thous*. La misma topología fue reconstruida con los siguientes métodos: Unión de vecinos (■), Máxima Parsimonia (■) y Máxima Verosimilitud (■). Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior bayesiana (BPP) y bootstrap obtenidos con los distintos métodos mencionados, de acuerdo al código de colores indicado. Se muestran los valores de apoyo $\geq 50\%$, señalando con un asterisco (*) los valores inferiores. *Pseudalopex vetulus* (Pv) y *Pseudalopex gymnocercus* (Pg) constituyen el grupo externo.

Tabla 4 Distribución de los 49 haplotipos obtenidos, a partir de secuencias de *D-Loop* con 313pb., de 105 ejemplares del “Zorro de monte”. Las 30 localidades de colecta fueron agrupadas, de acuerdo a las provincias biogeográficas y a su distribución en el área de estudio, constituyendo 4 agrupaciones poblacionales. Los individuos con haplotipos idénticos dentro de cada localidad de colecta son listados en la misma columna, encabezada con el nombre del haplotipo (*DL*) destacado en letra cursiva.

Localidad de Colecta	“Agrupación Poblacional”	Haplotipos /Individuos	N° Hap./ N° Ind.
Venezuela	1 SURESTE (Llanos Venezolanos + Pará + Caatinga)	<i>DL40</i> Z111	1/1
Brasil-Maranhao		<i>DL18</i> <i>DL28</i> <i>DL26</i> <i>DL34</i> <i>DL25</i> EF107012, EF107004, EF107003, EF107011, EF107000 EF107001	5/6
Brasil-Ceará		<i>DL40</i> <i>DL38</i> <i>DL36</i> <i>DL41</i> EF107025, EF107026, EF107017, EF107028	4/4
Brasil-Paraíba		<i>DL13</i> EF107015	1/1
Brasil-Pernambuco		<i>DL9</i> <i>DL10</i> <i>DL11</i> <i>DL12</i> <i>DL13</i> <i>DL14</i> <i>DL15</i> <i>DL17</i> <i>DL16</i> <i>DL23</i> EF194176, EF194177, EF194178, EF194179, EF194181, EF194182, EF194183, EF194186, EF194184, EF106998 EF194180, EF194185	10/12
Brasil-Alagoas		<i>DL14</i> <i>DL17</i> EF194194, EF194193	2/2
Brasil-Bahía		<i>DL25</i> <i>DL1</i> <i>DL19</i> <i>DL3</i> <i>DL4</i> <i>DL5</i> <i>DL6</i> <i>DL7</i> <i>DL8</i> EF107014, EF194168, EF194169, EF194170, EF194171, EF194172, EF194173, EF194174, EF194175	9/9
Paraguay	2 CERRADO (Cerrado + Chaco)	<i>DL30</i> EF107006 Z84	1/2
Brasil-Piauí		<i>DL18</i> <i>DL20</i> <i>DL22</i> <i>DL24</i> <i>DL21</i> <i>DL19</i> EF194187, EF194189, EF194191, EF106999, EF194190, EF194188 EF194192	6/7

Tabla 4 Continuación

Localidad de Colecta	“Agrupación Poblacional”	Haplotipos/ Individuos	N° Hap./ N° Ind.
Brasil-Tocantins	CERRADO (Cerrado + Chaco) (continuación).	DL19 DL13 Z115, EF107013	2/2
Brasil-Goiás		DL2 DL48 DL35 EF107027, Z95, EF107019 EF107023	3/4
Brasil-Mato Grosso		DL19 DL29 DL37 DL39 DL42 DL43 DL44 EF107007, EF107005, EF107018, EF107020, EF107029, EF107030, EF107031 EF107021	7/8
Brasil-San Pablo	3 BOSQUES-SUR (Bosque Paranaense + Bosque de <i>Araucaria angustifolia</i>)	DL2 DL44 DL31 Z83, Z82, EF107008 Z103	3/4
Brasil-Minas Gerais		DL2 Z119	1/1
Brasil-Paraná		DL2 DL35 DL27 Z43, Z81, EF107002	3/3
Brasil-Santa Catarina	4PAMPA	DL32 DL33 EF107009, EF107010	2/2
Brasil-Río Gde del Sur		DL2 DL33 EF106997, EF107016	2/2
Uruguay		DL2 DL46 Z70, Z72	2/2
Uruguay-Artigas		DL33 Z40	1/1
Uruguay-Rivera		DL2 Z121	1/1

Tabla 4 Continuación

Localidad de Colecta	“Unidad Poblacional”	Haplotipos/ Individuos	N° Hap./ N° Ind.
Uruguay-Salto	PAMPA (continuación)	DL30 Z22 Z113 Z30	1/3
Uruguay-Paysandú		DL33 DL30 Z51, Z112	2/2
Uruguay-Río Negro		DL2 DL30 Z49, Z146 Z54	2/3
Uruguay-Tacuarembó		DL45 Z23	1/1
Uruguay-Durazno		DL2 Z42	1/1
Uruguay-Treinta y Tres		Z33	1/1
Uruguay-Rocha		DL2 DL32 DL33 DL30 DL46 DL49 DL47 Z28, Z21, Z38, Z31, Z24, Z58, Z118 Z35, Z36, Z39, Z41, Z32, Z77 Z109,	7/14
Uruguay-Montevideo		DL2 DL30 DL46 Z61, Z76, Z64 Z131	3/4
Uruguay-Canelones		DL2 Z57	1/1
Uruguay-Colonia		DL2 Z138	1/1

Abreviaciones: Hap. = Haplotipos, Ind. = Individuos)

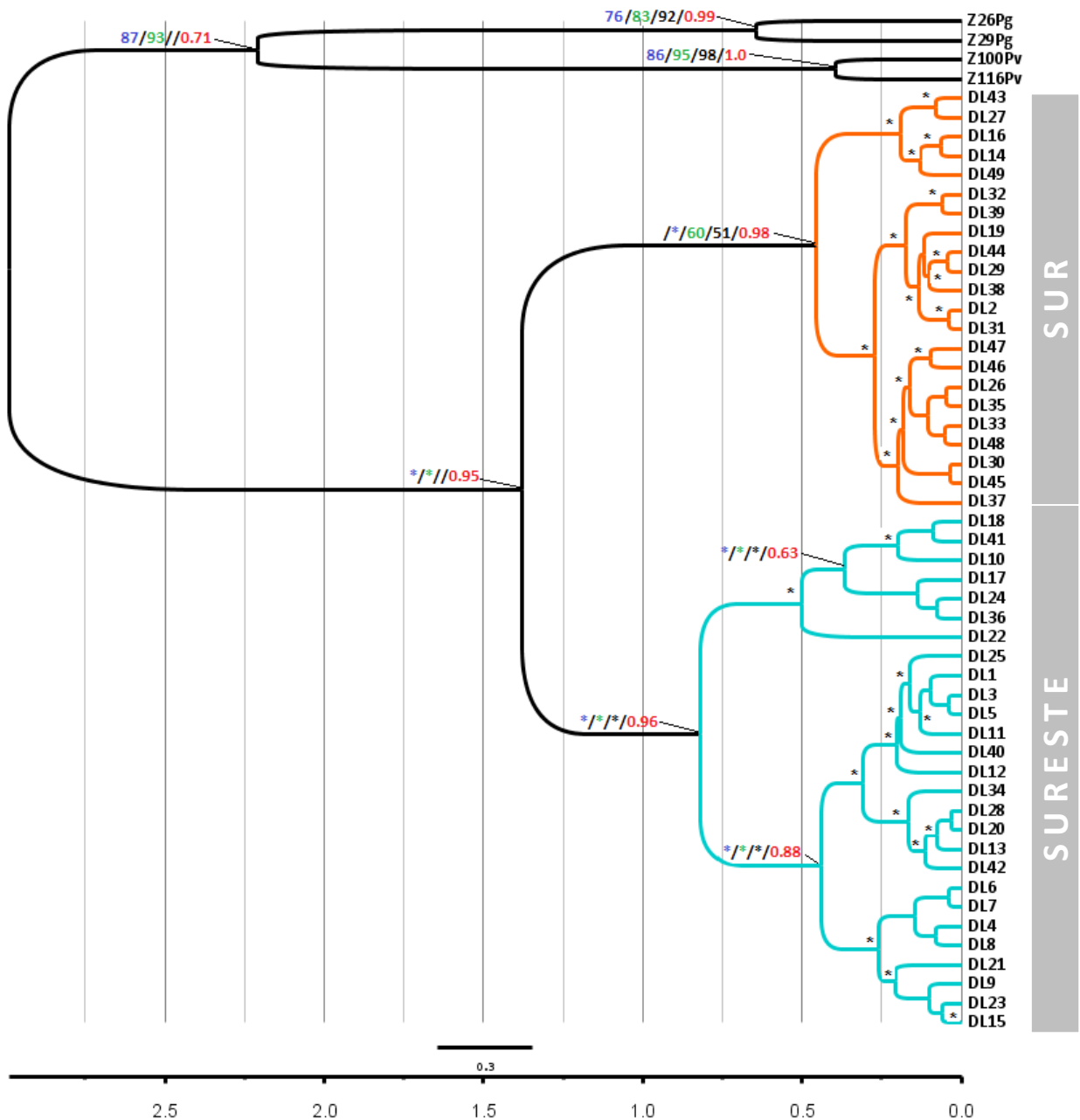


Figura 9 Cladograma consenso, obtenido por la regla de la mayoría, con secuencias de 313pb, de *D-Loop*. Se obtuvo con Inferencia Bayesiana, bajo el modelo evolutivo HKY + G, empleando 49 haplotipos de especímenes de *C. thous*. La misma topología fue reconstruida con los siguientes métodos: Unión de vecinos (■), Máxima Parsimonia (■) y Máxima Verosimilitud (■). Los números adyacentes a los nodos son valores de probabilidad posterior bayesiana (BPP) y bootstrap obtenidos con los distintos métodos mencionados, de acuerdo al código de colores indicado. Se muestran los valores de apoyo $\geq 50\%$, señalando con un asterisco (*) los valores inferiores. *Pseudalopex vetulus* (Pv) y *Pseudalopex gymnocercus* (Pg) constituyen el grupo externo. También se señalan los clados e indica la escala de tiempo de divergencia para ubicar la edad de los nodos.

5.2.1 Red de Haplotipos - Median Joining Network.

La genealogía intraespecífica de las secuencias del “Zorro de Monte”, tanto de *Citocromo b* como de *D-Loop*, también la representamos en una red de haplotipos, generada como Median Joining Network (Bandelt 1999).

Para el *Citocromo b* utilizamos las secuencias de los 28 haplotipos y obtuvimos una red con buena resolución (Figura 10) donde nuevamente observamos la formación de dos agrupaciones concordantes con las previamente designadas, con los árboles filogenéticos, como Sur y Sureste. En este caso ambos clados se conectan por 4 pasos mutacionales, entre las poblaciones en el Sureste, ocupando Caatinga (Cb5), con poblaciones del Sur que ocupan Pampa, Cerrado, Chaco, Bosque Paranaense y Bosque de *Araucaria angustifolia* (Cb2).

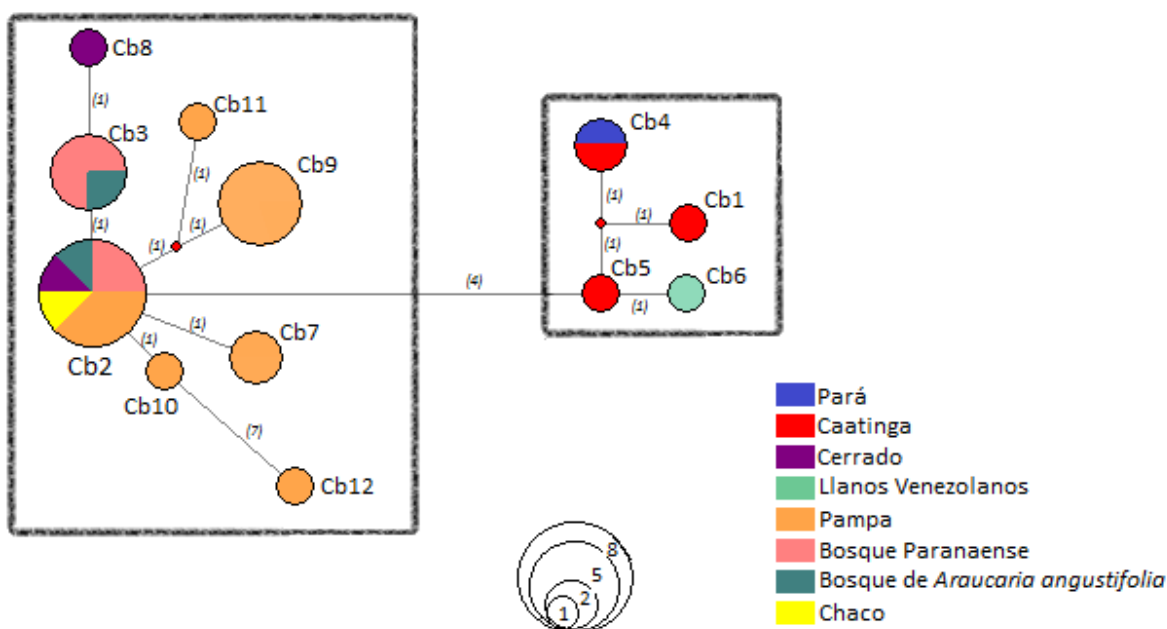
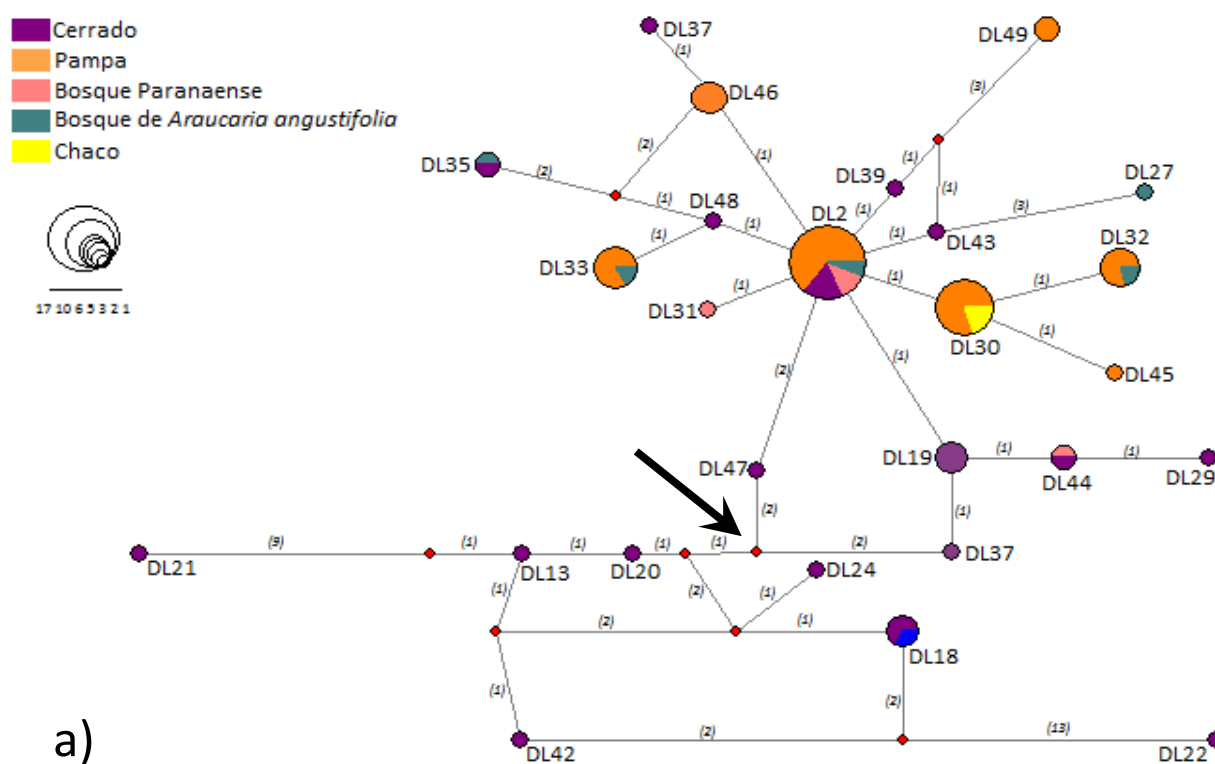


Figura 10 Red de haplotipos (Median Joining Network) construida en base a secuencias de *Citocromo b* (347pb, n=28). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia haplotípica. Además el color de los círculos está de acuerdo con el origen geográfico de los 12 haplotipos (Cb) a excepción de los círculos rojos más pequeños que corresponden con nodos intermedios inferidos. El origen designado coincide con las provincias biogeográficas del área de estudio. La flecha indica el haplotipo que se conecta al Grupo externo (*Pseudalopex gymnocercus*) con el cual se enraizó la red. Los valores entre paréntesis sobre las líneas que conectan haplotipos indican el número de sustituciones (22 en total). Los clados han sido enmarcados en línea plena.

Para el *D-Loop*, teniendo en cuenta que las redes de haplotipos son consideradas una representación apropiada de la variación intraespecífica (Posada & Crandall 2001), también intentamos reconstruir una red que vinculara todos los haplotipos obtenidos de dicho marcador. Sin embargo, a pesar de que los procesos evolutivos, actuando a nivel poblacional, comúnmente generan relaciones reticulares dentro de las poblaciones, en este caso ella resultó demasiado compleja y no logramos simplificar los datos de forma de obtener una representación gráfica que mostrara con claridad las conexiones allí establecidas. Finalmente hemos logrado presentar una red de haplotipos por clado (Figuras 11a y 11b).



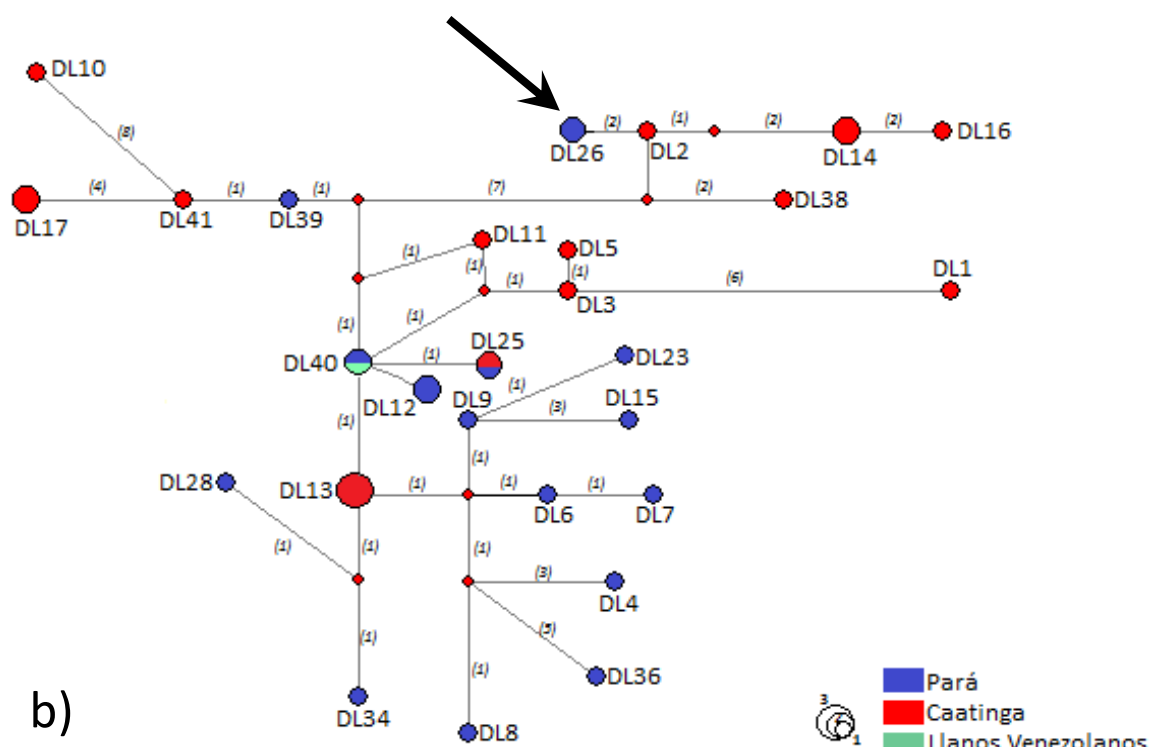


Figura 11 Median Joining Network mostrando las relaciones filogenéticas y la asignación geográfica de las secuencias de *D-Loop* (313pb, n=105) para *C. thous* según al clado al que pertenecen: a) Sur y b) Sureste. Los  rculos rojos de menor tamaño indican los nodos intermedios inferidos, mientras el resto de los  rculos indican los haplotipos observados (49 en total), siendo su tamaño proporcional a la frecuencia de los mismos. El número entre paréntesis, sobre cada línea que conecta dos haplotipos, indica el número de pasos mutacionales entre ambos (65 en total). La flecha indica el haplotipo que se conecta al Grupo externo (*Pseudalopex gymnocercus*) con el cual se enraizó cada red.

Las redes de unión (Median Joining Network) de las secuencias mitocondriales del “Zorro de monte” ofrecen un apoyo adicional para los dos grupos, Sur y Sureste, definidos en los árboles filogenéticos para la región de estudio, que ocupa desde la costa atlántica del estado de Ceará, en Brasil, hasta la frontera oeste del Uruguay, incluyendo una muestra proveniente de los Llanos venezolanos y otra del Chaco paraguayo. En ambos marcadores el diagrama que exhibimos para el clado Sur se asemeja más a una filogenia en estrella con la mayoría de los haplotipos derivados de un haplotipo que ocupa una posición central; ello sugiere la ocurrencia de un evento de expansión poblacional relativamente reciente (Eizirik *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2006). El haplotipo central (DL2 y Cb2 según

se trate de *D-Loop* o *Citocromo b*) es el más frecuente en la muestra y está representado por individuos provenientes de las 4 agrupaciones poblacionales, representando varias de las localidades de colecta distribuidas tanto dentro del clado Sur como del Sureste. Sin embargo ese no es el escenario más común ya que sólo 3 (DL2, DL13 y DL30) de los 49 haplotipos que hemos identificado con el marcador de *D-loop*, son compartidos entre haplogrupos. Del mismo modo, en el caso del *Citocromo b*, sólo 1 (Cb2) de los 12 haplotipos es compartido por ambos clados. Esto evidencia una restricción al flujo génico, en una dinámica que propicia la diferenciación de los haplotipos de cada región geográfica.

De acuerdo con la teoría del coalescente puede inferirse que los haplotipos más frecuentes son también los más antiguos. Estos en general presentan una amplia distribución por lo cual cuentan con muchas conexiones con otros haplotipos, tendiendo a ocupar posiciones interiores de la red. En el clado Sureste los haplotipos se encuentran en baja frecuencia, siendo muchos de ellos haplotipos únicos por lo cual no ha sido posible inferir un haplotipo ancestral propio del clado.

Debemos destacar que, a pesar de la tendencia general hacia una filogenia tipo estrella, detectable con ambos marcadores, y derivada de haplotipos ancestrales potenciales que se ubican en el clado Sur (Cb2 y DL2), el patrón es más complejo. Ello lo evidenciamos mejor en la red de haplotipos de *D-Loop*, debido a que el tamaño muestral es mayor. Allí la conexión entre algunos haplotipos (DL13, DL18, DL20, DL21, DL22, DL24, DL42) muestra lazos donde la optimización del análisis que implementamos (Median joining) no logró definir entre conexiones alternativas. Dichos lazos pueden romperse en cualquier lugar resultando en diferentes redes. Estas ambigüedades indican la ocurrencia de mutaciones convergentes, reversas o paralelas. Otra causa probable es la recombinación que en este caso, por tratarse de un marcador mitocondrial, no la consideramos.

A partir de lo mencionado en párrafos anteriores es posible deducir la raíz de la red. Nuestros resultados apoyan, para el *Citocromo b*, el haplotipo Cb2; mientras para el *D-*

Loop el candidato es el haplotipo DL2, aunque en este último caso hemos realizado el análisis por separado para el clado Sur y el Sureste.

Otra forma de enraizar la filogenia intraespecífica es mediante la inclusión de un grupo externo. Para ello utilizamos una secuencia del “Zorro gris” (*Pseudalopex gymnocercus*). Los haplotipos a los cuales la raíz (Grupo externo) se conecta, en cada red haplotípica, han sido indicados con una flecha en las figuras correspondientes (10, 11a y 11b). Sin embargo ese resultado no concuerda con DL2 y Cb2, los cuales inferimos como haplotipos ancestrales, según se trate de la red de haplotipos de *D-Loop* o de *Citocromo b* respectivamente, aplicando los criterios de la teoría del coalescente. Ella predice que por definición el haplotipo ancestral es la raíz de la filogenia y es determinado por: su elevada frecuencia en la población, número de conexiones y posición en la red haplotípica.

La discordancia encontrada para los resultados que obtuvimos con procedimientos distintos nos muestra que enraizar las filogenias intraespecíficas a partir de un Grupo externo, para el caso de redes de haplotipos es dificultoso. A menudo la separación entre el Grupo externo y el Grupo interno está dada por muchos pasos mutacionales, mientras los individuos dentro de una especie son similares unos de otros. Ello obstaculiza precisar con exactitud dónde debe colocarse la raíz (Posada & Crandall, 2001).

5.2.2 TMRCA (Tiempo del Ancestro Común más Reciente)

El punto estimado para la tasa de sustitución del *D-Loop* fue $\mu = 0.0591$ sustituciones/sitio/millón de años (considerando los datos reales a partir del alineamiento generado con 105 secuencias de 313pb). Para dicho valor también obtuvimos, teniendo en cuenta el intervalo de confianza del 95%, un límite superior e inferior de: 0.109 y 0.019 respectivamente.

La tasa de divergencia que estimamos para *Citocromo b* fue $\mu = 0.0163$ sustituciones/sitio/millón de años (considerando los datos reales a partir del alineamiento generado con 28 secuencias de 347pb). Para este valor, el límite superior e inferior, teniendo en cuenta nuevamente un intervalo de confianza del 95%, fue de: 0.0303 y

0.004 respectivamente. Ello es esperable de acuerdo a las características propias de cada marcador, ya mencionadas, según las cuales el *D-loop* debe exhibir tasas de divergencia más aceleradas que el *Citocromo b*, lo cual encontramos con nuestros resultados.

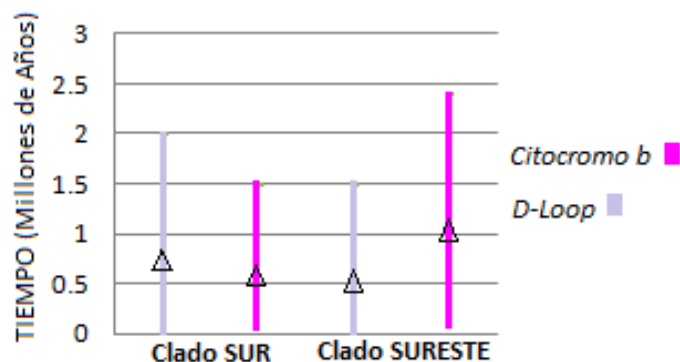


Figura 12 Valores de TMRCA obtenidos con ambos marcadores genéticos a través de la aproximación al coalescente. Se indican los valores medios (Δ) y el rango del intervalo de confianza al que pertenecen, dado por el límite superior e inferior de dicho valor.

También estimamos tiempos de divergencia estableciendo la separación entre el clado Sur y Sureste del “Zorro de monte” hace 550.000 años, con un intervalo de confianza (IC) entre 50.000 años y 1.500.000 años. Estos valores de TMRCA los obtuvimos a partir de la coalescencia estimada con las secuencias de la región *D-Loop* y se solapan con los hallados por

Tchaicka y colaboradores (2007). Estos tiempos son mayores que los estimados a partir de las secuencias de *Citocromo b*. Sin embargo a pesar de las diferencias observadas en los valores medios que obtuvimos para los tiempos de coalescencia con uno y otro marcador, al considerar los intervalos de confianza, estos se solapan indicando que ambos marcadores son congruentes en su predicción (Figura 12). Sin embargo, dado dicho solapamiento, no podemos discernir cuál de estos dos clados es el más antiguo.

Otro resultado que obtuvimos es el tiempo de divergencia entre *C. thous* y el Grupo Externo, integrado por *Pseudalopex gymnocercus* y *Pseudalopex vetulus*, que resultó en 1.048.000 años (IC: 100.000 – 2.400.000).

5.3 Índices de Diversidad Genética de las poblaciones del “Zorro de monte”

Encontramos niveles entre moderados y altos de diversidad haplotípica y niveles moderados de diversidad nucleotídica en los individuos del “Zorro de monte”, con ambos marcadores mitocondriales. (Tablas 5 y 6)

Tabla 5 Diversidad haplotípica y nucleotídica de las secuencias de *Citocromo b* de 347 pb, para cada una de las 4 agrupaciones poblacionales, para todos los especímenes del Sur, para todos los especímenes del Sureste y para todos ellos combinados.

“Agrupación Poblacional”	<i>n</i>	N° de Haplotipos	Diversidad Haplotípica (Hd)	Diversidad Nucleotídica (pi)
1 SURESTE (Llanos Venezolanos + Pará + Caatinga)	5	4	0.9000 ± 0.1610	0.0058 ± 0.0045
2 BOSQUES-SUR (Bosque Paranaense + Bosque de <i>Araucaria angustifolia</i>)	6	2	0.5333 ± 0.1721	0.0015 ± 0.0017
3 CERRADO (Cerrado + Chaco)	4	2	0.5000 ± 0.2652	0.0073 ± 0.0059
4 PAMPA	13	6	0.8205 ± 0.0817	0.0103 ± 0.0063
Ejemplares del Sureste	5	4	0.9000 ± 0.1610	0.0058 ± 0.0045
Ejemplares del Sur	23	8	0.8221 ± 0.0531	0.0082 ± 0.0050
Todos los ejemplares	28	12	0.8783 ± 0.0407	0.0118 ± 0.0067

Tabla 6 Diversidad haplotípica y nucleotídica de las secuencias de *D-Loop* de 313 pb, para cada una de las 4 agrupaciones poblacionales, para todos los especímenes del Sur, para todos los especímenes del Sureste y para todos ellos combinados.

“Agrupación Población”	<i>n</i>	N° de Haplotipos	Diversidad Haplotípica (Hd)	Diversidad Nucleotídica (pi)
1 SURESTE (Llanos Venezolanos + Pará + Caatinga)	35	27	0.9849 ± 0.0104	0.0585 ± 0.0296
2 BOSQUES-SUR (Bosque Paranaense + Bosque de <i>Araucaria angustifolia</i>)	9	7	0.9167 ± 0.0920	0.0280 ± 0.0162
3 CERRADO (Cerrado + Chaco)	25	18	0.9633 ± 0.0235	0.0583 ± 0.0298
4 PAMPA	36	7	0.8143 ± 0.0370	0.0304 ± 0.0159
Ejemplares del Sureste	35	27	0.9849 ± 0.0104	0.0585 ± 0.0296
Ejemplares del Sur	70	25	0.9010 ± 0.0233	0.0418 ± 0.0211
Todos los ejemplares	105	49	0.9504 ± 0.0126	0.0560 ± 0.0278

Al comparar entre clados se mantienen los niveles que observamos en el conjunto de los ejemplares en cuanto a diversidad nucleotídica y haplotípica aunque la diversidad nucleotídica evidenciada con el *Citocromo b* es una décima parte de la indicada con *D-Loop*. Ello muestra que el *Citocromo b* y el *D-Loop* a pesar de ser ambos marcadores mitocondriales presentan características propias.

Dentro de los grupos poblacionales correspondientes a las provincias biogeográficas, para el área de estudio, la población de “Bosques-Sur” presenta la diversidad nucleotídica más baja con ambos marcadores genéticos y también una diversidad haplotípica relativamente baja, para el *Citocromo b*. La población “Pampa” tuvo el nivel más elevado de diversidad nucleotídica, con *Citocromo b*. Esto probablemente es debido a la naturaleza variada de la agrupación poblacional con muchos haplotipos compartidos con otras agrupaciones poblacionales (Figura 9). Sin embargo con *D-Loop* la misma población tuvo un valor bajo, en relación a las poblaciones “Sureste” y “Cerrado” esta discordancia podría estar indicando que el *D-Loop* al acumular tanta cantidad de cambios puede también presentar un alto nivel de homoplasia en sus secuencias donde la ocurrencia de sustituciones reversas nos permiten explicar la discrepancia hallada entre ambos marcadores para una misma agrupación.

Para el *Citocromo b* la agrupación de “Sureste” así como cuenta con el mayor índice de diversidad haplotípica, también posee el de diversidad nucleotídica junto con la agrupación de “Pampa”. Geográficamente estas poblaciones están ubicadas en los extremos del rango de distribución del área de estudio; entre ellas se localizan las agrupaciones de “Bosques-Sur” y “Cerrado” cuya diversidad haplotípica es muy similar pero difieren en la diversidad nucleotídica, mayor para la agrupación de “Cerrado”.

5.4 Estructura poblacional del “Zorro de monte”

Para investigar la existencia de estructuración poblacional en el “Zorro de monte” comparamos distintos escenarios de subdivisión geográfica, según los haplotipos hallados, para ambos marcadores del ADN mitocondrial.

Basados en el conjunto de secuencias de *Citocromo b*, identificamos con SAMOVA una división principal en dos grupos. Esto es concordante con los dos clados monofiléticos recíprocos: Sur y Sureste, identificados a partir del análisis filogenético (Tabla 7). Ellos reflejan una distribución geográfica bien definida de los haplotipos (Figura 13). El clado que denominamos Sureste coincide con la “Agrupación poblacional” que lleva el mismo nombre e incluye haplotipos pertenecientes a localidades de colecta distribuidas en las provincias biogeográficas de Caatinga, Llanos Venezolanos y Pará.

El clado que denominamos Sur, incluye las “Agrupaciones poblaciones” que denominamos “Pampa”, “Cerrado-Chaco”, y “Bosques-Sur”, las cuales cuentan con las localidades de colecta distribuidas en las provincias biogeográficas de Cerrado, Chaco, Bosque Paranaense, Bosque de *Araucaria angustifolia* y Pampa.

El resultado obtenido con datos de secuencias de *D-Loop*, *sin embargo* no indicó la ocurrencia de una estructuración poblacional a ningún nivel. Los valores de F_{CT} (índice de fijación debido a las diferencias entre grupos de poblaciones) obtenidos, fueron no significativos para los dos niveles de subdivisión propuestos a partir de SAMOVA (Tabla 7). Esta discordancia con el resultado del *Citocromo b* nos indica que, a diferencia de dicho marcador, *D-Loop* mostró una escasa sensibilidad para distinguir niveles de divergencia profundos entre clados (Sur versus Sureste).

De todos modos ambos marcadores confirman una ausencia de subestructuración dentro de cada haplogrupo, consistente con las politomías obtenidas (también dentro de cada clado) en la reconstrucción filogenética.

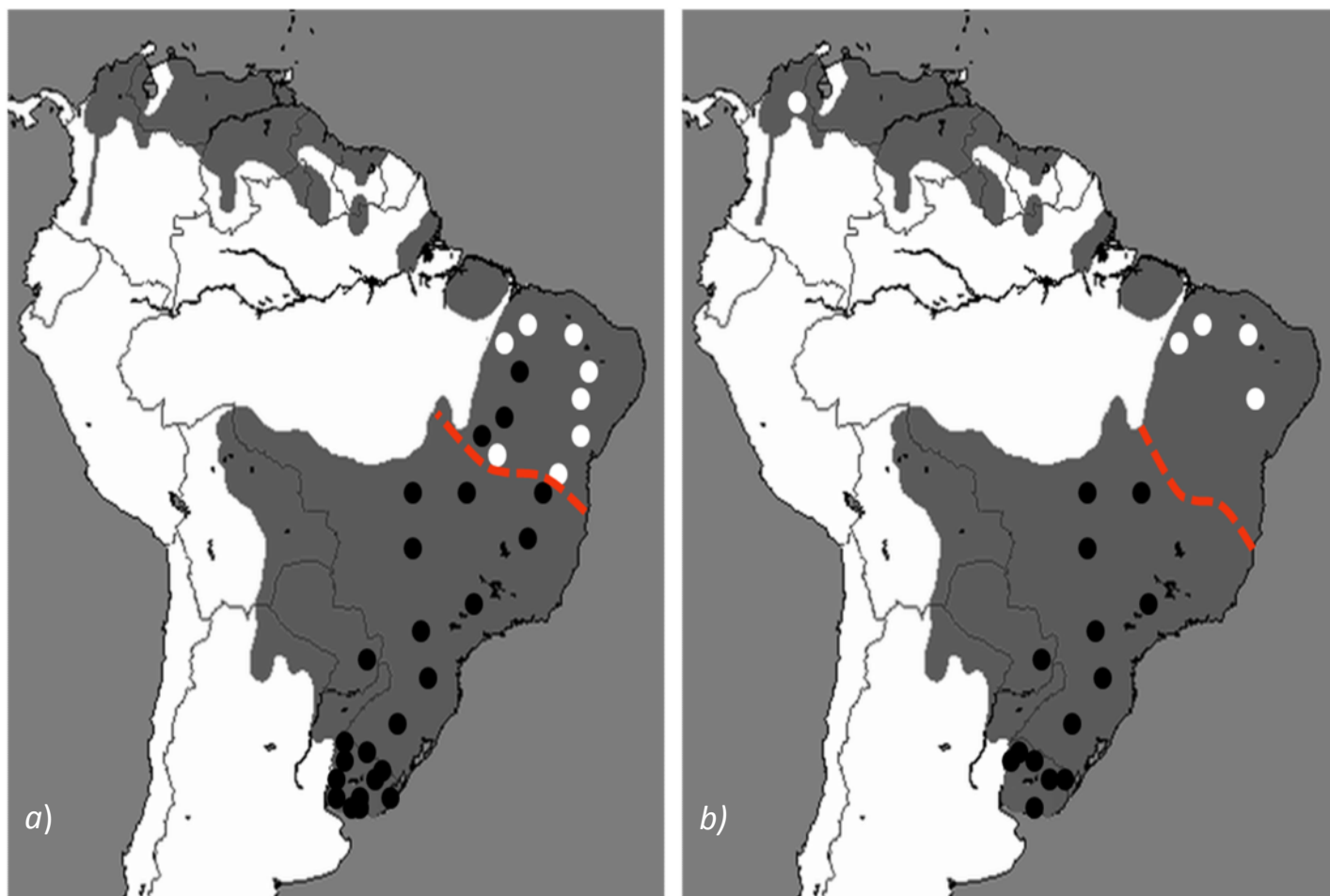


Figura 13 Distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales de a) D-Loop y b) Citocromo b. Se indican las localidades de colecta con puntos coloreados de acuerdo al clado donde se ubican los haplotipos, con dicha procedencia, en las reconstrucción filogenética. La línea punteada indica la partición geográfica que se reconoce y separa ambos grupos de haplotipos, Sur y Sureste.

Referencias: ○ Clado Sureste, ● Clado Sur, - - - División Filogeográfica.

Tabla 7 Resultados del AMOVA para distintas subdivisiones tomando las “Agrupaciones poblacionales” formadas de acuerdo a la distribución observada de los haplotipos en las distintas provincias biogeográficas y de manera tal que cada una contara con un número no menor a 5 individuos. Las agrupaciones fueron asignadas como las mejores posibles con SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) para ambos marcadores mitocondriales. Se indican los índices de fijación debido a las diferencias entre grupos de poblaciones (F_{CT}), las diferencias de las poblaciones dentro de los grupos de poblaciones (F_{SC}) y debido a las diferencias entre las poblaciones a partir de los individuos que la forman y en relación al conjunto total de individuos (F_{ST}).

Agrupación	Fuente de Variación	% de Variación	Estadístico F	p-valor
<i>Citocromo b</i>				
<u>SURESTE</u> + (<u>CERRADO</u> + <u>BOSQUES-SUR</u> + <u>PAMPA</u>)	Entre Grupos	59.55	F_{CT} : 0.595	0
	Entre Poblaciones dentro de Grupos	5.75	F_{SC} : 0.142	0
	Dentro de Poblaciones	34.71	F_{ST} : 0.653	0
<u>SURESTE</u> + (<u>CERRADO</u> + <u>BOSQUES-SUR</u>) + <u>PAMPA</u>	Entre Grupos	51.61	F_{CT} : 0.516	0.152
	Entre Poblaciones dentro de Grupos	-1.84	F_{SC} : -0.038	0
	Dentro de Poblaciones	50.24	F_{ST} : 0.498	0
<i>D-Loop</i>				
<u>(SURESTE + CERRADO)</u> + (<u>BOSQUES-SUR</u> + <u>PAMPA</u>)	Entre Grupos	28.05	F_{CT} : 0.281	0.322
	Entre Poblaciones dentro de Grupos	5.38	F_{SC} : 0.0747	0
	Dentro de Poblaciones	66.57	F_{ST} : 0.334	0
<u>SURESTE</u> + <u>CERRADO</u> + (<u>BOSQUES-SUR</u> + <u>PAMPA</u>)	Entre Grupos	31.95	F_{CT} : 0.320	0.173
	Entre Poblaciones dentro de Grupos	-2.51	F_{SC} : -0.034	0.002
	Dentro de Poblaciones	70.56	F_{ST} : 0.294	0

(Aclaración: la agrupación denominada como CERRADO equivale a CERRADO-CHACO).

Los resultados del Análisis Molecular de Varianzas (AMOVA) indican que la mayoría de la variación genética observada se explica a través de una única partición Sur vs Sureste con un $F_{ST} = 0.653$. A partir de este índice de fijación, elevado y significativo ($p < 0.005$) rechazamos la hipótesis nula que establece ausencia de estructuración y apoyamos la existencia de una barrera histórica al flujo génico entre ambos clados.

Los valores pareados de F_{ST} , para el *Citocromo b* y el *D-Loop*, entre “Agrupaciones poblacionales” indican que las localidades muestreadas dentro de la “Agrupación Sureste” son homogéneas entre sí y significativamente diferentes del resto (Tablas 8 y 9). De esa forma constituyen el clado Sureste señalado en las filogenias reconstruidas.

Ello también lo observamos en la Red de haplotipos, para *Citocromo b*, donde se agrupan aquellos haplotipos asignados a las localidades en el sureste del Brasil, que corresponden al área de estudio, más la muestra de Venezuela.

Entre las “Agrupaciones poblacionales” de Pampa, Cerrado y Bosques-Sur, los valores de F_{ST} , reducidos y no significativos, también apoyan la ausencia de diferenciación entre ellas y consecuentemente homogeneidad entre las localidades allí reunidas. Éstas constituyen el clado Sur, indicado previamente con el análisis filogenético. El valor de F_{ST} entre todas las “Agrupaciones poblacionales” que lo componen, en promedio y para el *Citocromo b*, es de 0.20650. Concomitantemente el valor de migrantes por generación es de 0.96. Con *D-Loop* el mismo clado presenta un valor promedio de $F_{ST} = 0.11565$, con un valor de 1.91 para el número de migrantes por generación.

Asimismo los valores pareados del número de migrantes por generación (N_m) se muestran elevados entre las “Agrupaciones Poblacionales” de Pampa, Cerrado y Bosques-Sur, a la vez que son reducidos (próximos a cero) entre ellas y la agrupación poblacional Sureste, que de hecho coincide con el clado del mismo nombre (Tablas 8 y 9).

Los altos valores de N_m conducen a una aproximación a la panmixia entre las “Agrupaciones poblacionales” de Pampa, Cerrado y Bosques-sur, constituyendo una unidad poblacional independiente correspondiente al clado Sur. Del mismo modo el clado Sureste constituye una unidad poblacional independiente.

Tabla 8 Matriz de estimadores pareados de F_{ST} y N_m , para las “Agrupaciones poblacionales” analizadas, a partir de los datos de las secuencias de *D-loop*. Por debajo de la diagonal, las medidas están basadas en la varianza debida a las diferencias entre las “Agrupaciones poblacionales” (F_{ST}); por encima de la diagonal, las medidas del número de migrantes por generación (N_m). Los asteriscos (*) indican el nivel de significación estadístico (p -valor ≤ 0.05).

“Agrupación Poblacional”	SURESTE	CERRADO	BOSQUES-SUR	PAMPA
SURESTE	-	0.13	0.07	0.15
CERRADO	0.66595*	-	1.47	5.69
BOSQUES-SUR	0.80287*	0.11111	-	1.14
PAMPA	0.60369*	0.04842	0.19620	-

Tabla 9 Matriz de estimadores pareados de F_{ST} y N_m , para las “Agrupaciones poblacionales” analizadas, a partir de los datos de las secuencias de *Citocromo b*. Por debajo de la diagonal, las medidas están basadas en la varianza debida a las diferencias entre las “Agrupaciones poblacionales” (F_{ST}); por encima de la diagonal, las medidas del número de migrantes por generación (N_m). Los asteriscos (*) indican el nivel de significación estadístico (p -valor ≤ 0.05).

“Agrupación Poblacional”	SURESTE	CERRADO	BOSQUES-SUR	PAMPA
SURESTE	-	1.47	0.60	0.69
CERRADO	0.12849*	-	5.71	2.89
BOSQUES-SUR	0.31920*	0.04607	-	9.16
PAMPA	0.37775*	0.09179*	0.02735	-

Finalmente el grado de diferenciación genética que observamos entre las “Agrupaciones poblacionales” parece seguir una relación predecible con la distancia geográfica. Esto fue corroborado a partir de los resultados que obtuvimos con el test de Mantel. Este fue aplicado, para cada marcador mitocondrial, sobre toda la muestra pero también sobre cada una de las unidades poblacionales identificadas: Sur y Sureste.

Detectamos una señal moderada y estadísticamente significativa, de aislamiento por distancia para el conjunto de los datos de secuencias de *D-Loop*, y de *Citocromo b*. También para el clado Sureste con haplotipos de *D-Loop* (Tabla 10 y Figura 14). Este

resultado indica para esta población una aproximación al modelo de aislamiento por distancia (Wright, 1951 citado en Slatkin, 1993) donde los apareamientos ocurren con mayor probabilidad entre individuos cercanos y como consecuencia de ello se espera que a medida que aumenta la distancia geográfica entre ejemplares también aumente la diferenciación genética entre ellos.

Tabla 10 Resultados del Test de correlación de Mantel entre las distancia genética y geográfica para las 28 secuencias del *Citocromo b* y las 105 secuencias del *D-Loop*.

	<i>Citocromo b</i>		<i>D-Loop</i>	
	N	Test de Mantel	N	Test de Mantel
Todos los ejemplares	28	R = 0.5592; p-valor = 0	105	R = 0.3037; p-valor = 0
Sureste	5	R = 0.4313; p-valor = 0.1928	35	R = 0.3821; p-valor = 0
Sur	23	R = 0.05897; p-valor = 0.1562	70	R = 0.08714; p-valor = 0.7206

En ambos clados para secuencias de *Citocromo b*, los resultados no dieron significativos, pero el tamaño muestral pequeño (<30) sugiere que una muestra poblacional mayor podría lograr un resultado significativo y siguiendo la tendencia de aislamiento por distancia.

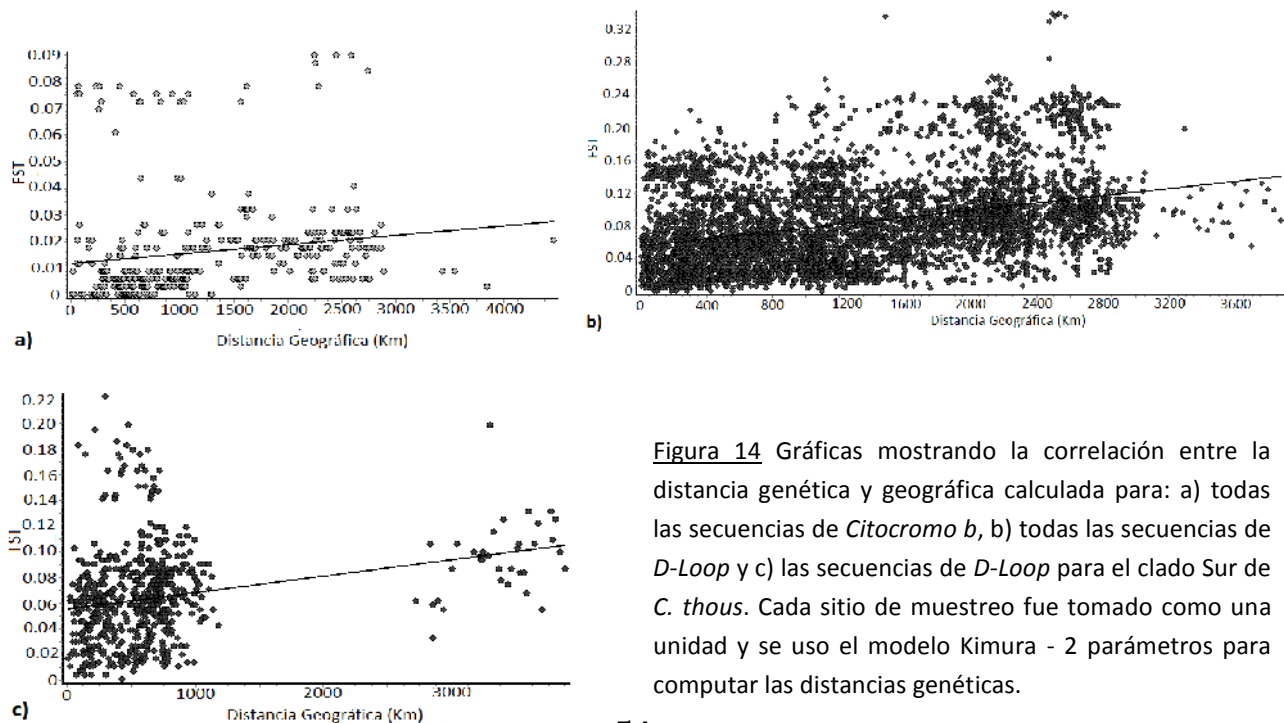


Figura 14 Gráficas mostrando la correlación entre la distancia genética y geográfica calculada para: a) todas las secuencias de *Citocromo b*, b) todas las secuencias de *D-Loop* y c) las secuencias de *D-Loop* para el clado Sur de *C. thous*. Cada sitio de muestreo fue tomado como una unidad y se usó el modelo Kimura - 2 parámetros para computar las distancias genéticas.

Sin embargo en el caso del clado Sur con las secuencias de *D-Loop*, a pesar de contar con un tamaño muestral adecuado, el resultado corresponde con una leve correlación pero no significativa. Esta ausencia de un patrón de aislamiento por distancia es consistente con una serie rápida de expansión seguida por un aislamiento (Sacks *et al.*, 2010). Esto concuerda con la topología de la red de haplotipos obtenida para el mismo agrupamiento. Además al evidenciar nuevamente el evento de expansión poblacional con el marcador *D-Loop* pero no con el *Citocromo b* es un indicio de que dicho evento de expansión es relativamente reciente lo cual también es concordante con la ausencia de subestructuración observada en los árboles obtenidos mediante inferencia bayesiana.

5.5 Análisis Demográficos

Al detectar una partición filogeográfica profunda, a partir de la cual definimos un clado Sur y otro Sureste, realizamos este análisis poblacional, con ambos marcadores, para cada grupo por separado y también para el total de la muestra. Los resultados de los test de neutralidad de Fu y Tajima, mostraron diferencias que presentamos en la Tabla 11.

Tabla 11 Índices del análisis de la historia demográfica en *C. thous*. Los valores indicados con asterisco resultaron significativos.

	<i>Citocromo b</i>				<i>D-Loop</i>			
	<i>n</i>	Ragedness	Fu's Fs	Tajima's D	<i>n</i>	Ragedness	Fu's Fs	Tajima's D
Todos los ejemplares	28	0.01562	-2.07013	-1.42642	105	0.01289*	-7.01567	-1.06285
Sureste	5	0.2900	-1.01160	0.27345	35	0.00501	-5.00741	-0.71578
Sur	23	0.03079	-0.72726	-1.54913*	70	0.04588*	0.02618	-1.63195*

Asimismo el análisis de Mismatch Distribution entre Sur y Sureste, con ambos marcadores, evidencia distintas historias demográficas (Figura 15).

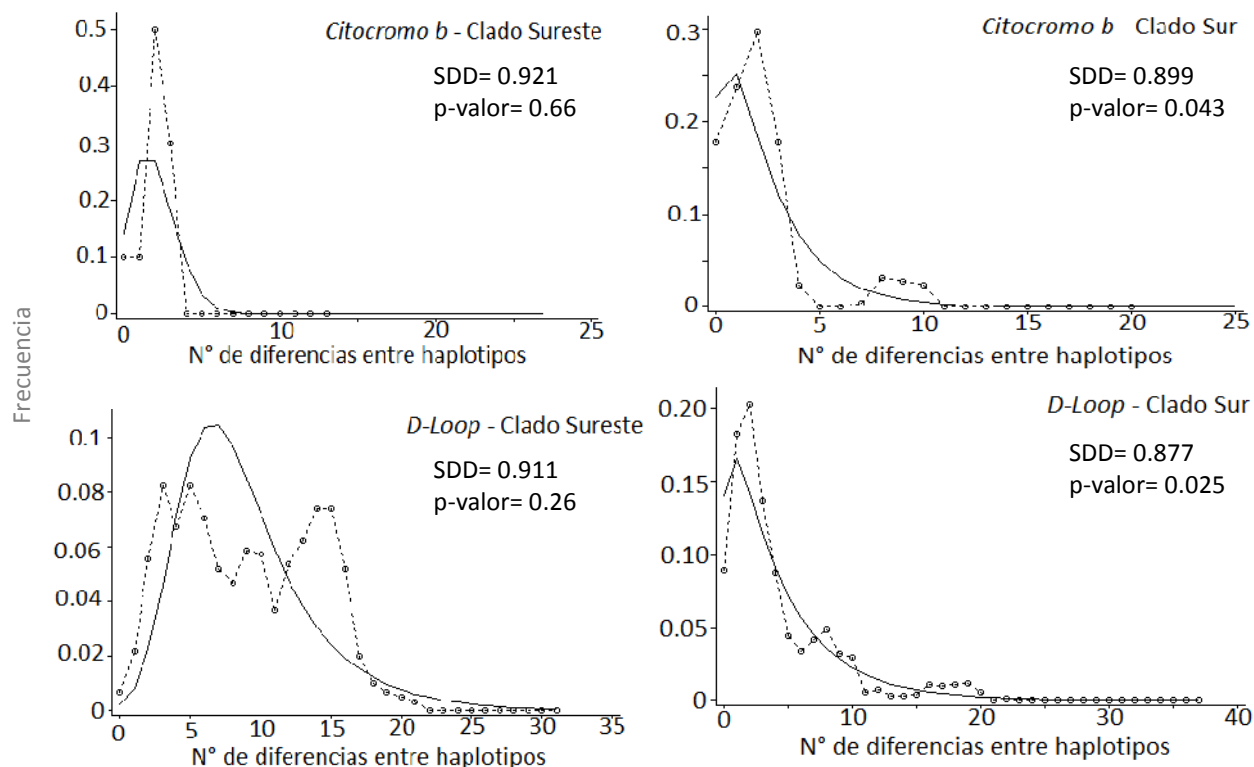


Figura 15 Mismatch Distribution basada en la distribución de frecuencia de las diferencias pareadas entre haplotipos de los individuos de *Cerdocyon thous* por clado para cada marcador mitocondrial. La frecuencia esperada está basada en el modelo de crecimiento/disminución poblacional determinado y es representada por la línea continua. La frecuencia observada es representada por la línea punteada.

Los haplotipos de *D-Loop* para el clado Sur presentan una suave distribución de Poisson cuya forma, aproximadamente unimodal es compatible con un escenario de expansión poblacional reciente. Esto es apoyado por un valor significativo del índice de Raggedness ($r=0.04588$, $p\text{-valor}=0$) que nos permite rechazar la hipótesis nula y asumir un proceso de expansión poblacional. Además los test de neutralidad de Tajima ($D=-1.54913$, $p\text{-valor}=0.036$; $D=-1.63195$, $p\text{-valor}=0.025$) corroboran esta inferencia, para el mismo clado con ambos marcadores, también rechazando el modelo nulo que asume un tamaño poblacional constante. Sin embargo el resultado del Test de Fu es incongruente, principalmente con *D-Loop* que da positivo aunque no significativo mientras con el *Citocromo b*, a pesar de dar negativo tampoco es significativo. Debe tenerse en cuenta que cuando los datos no se ajustan a un modelo de evolución neutral puede explicarse

también que el exceso de polimorfismos raros o de baja frecuencia, pueden producirse tanto en una situación de expansión poblacional como en la de un severo cuello de botella.

El análisis para el grupo de los haplotipos del Sureste, con ambos marcadores, también reveló un patrón unimodal de Mismatch Distribution, pero no podemos afirmar la ocurrencia de una expansión poblacional ya que los test de neutralidad y el valor del índice de Raggednes no son significativos.

Al trabajar con ambos grupos, como si fueran una única población, los resultados indican un patrón multimodal, congruente con los valores no significativos, aunque negativos, para los test de neutralidad y un valor no significativo también del índice de Raggedness.

Finalmente, el estimador SSD es significativo para el clado Sur con ambos marcadores, permitiéndonos sugerir que la tendencia del comportamiento demográfico que exhibe dicho clado es consistente con un evento de expansión pasado. En la Tabla 12 se muestran los parámetros estimados para el modelo de Expansión Poblacional a partir del Mismatch Distribution para el clado Sur.

Tabla 12 Estimación de parámetros poblacionales, con el modelo basado en Mismatch Distribution (Rogers & Harpending 1992; Schneider & Excoffier 1999) que asume una expansión reciente en la población.

Parámetros estimados de Expansión basados en el modelo "Mismatch Distribution"	Intervalos de Confianza (método de percentiles) p-valor = 0.05		
	Límite Inferior	Límite Superior	Valor Medio
<i>D-Loop</i>			
$\tau = 11.535$	$\tau = 4.738$	32.000	19.750
$\theta_0 = 6.274$	$\theta_0 = 0.000$	10.839	1.142
$\theta_1 = 21.892$	$\theta_1 = 9.687$	74.705	33.172
Valores Absolutos			
$t = 97754$	$t = 40152$	271186	167372
$N_0 = 53169$	$N_0 = 0.000$	91855	9677
$N_1 = 185525$	$N_1 = 82093$	633093	281118
<i>Citocromo b</i>			
$\tau = 2.000$	$\tau = 0.553$	4.971	2.369
$\theta_0 = 0.522$	$\theta_0 = 0.000$	1.422	0.130
$\theta_1 = 6.829$	$\theta_1 = 3.115$	99999.000	51016.744
Valores Absolutos			
$t = 62500$	$t = 17281$	155343	74031
$N_0 = 16312$	$N_0 = 0.000$	44437	4062
$N_1 = 213406$	$N_1 = 97343$	3120×10^6	1594×10^6

El valor absoluto del tiempo de la expansión, a partir del marcador *D-Loop* y expresado en años está alrededor de los 98000 años. Los límites de confianza para el 95% generan un intervalo amplio entre 40000 y 257000 años. Asumiendo 1 año de tiempo de generación para calcular el número absoluto de individuos antes y después de la expansión, estimamos que la dimensión de la expansión en términos del número efectivo de hembras está en el orden de 10^5 .

A partir de los parámetros estimados con el *Citocromo b*, encontramos que el tiempo absoluto de la expansión fue alrededor de 62000 años, con una magnitud inferida de hembras de cientos de miles. En el caso que se infiere un valor de 0 para el tamaño poblacional, la población debió ser muy reducida antes de la expansión.

A pesar de las diferencias en los valores absolutos inferidos, ambos marcadores son congruentes en sus resultados de acuerdo con los intervalos de confianza.

Otra forma de inferir la historia demográfica de *Cerdocyon thous*, fue empleando el modelo del “Bayesian Skyline Plot” (Drummond & Rambaut 2007). Realizamos este análisis, para ambos marcadores (*D-Loop* y *Citocromo b*) en el clado Sur y Sureste por separado, para cumplir con la asunción de panmixia.

El modelo demográfico del “Bayesian Skyline Plot” (BSP) construido a partir de los datos de *D-Loop* para cada clado, indican un amplio rango de expansión de *C.thous*, seguido de un período de estabilidad (Figura 16).

Sin embargo la expansión se muestra más pronunciada en el clado Sureste que en el Sur, allí el tamaño poblacional estimado aumenta 16 veces del inicial mientras en el clado Sur aumenta en 11 veces. En relación al análisis de Mismatch Distribution, aunque tanto el clado Sur como el Sureste exhiben gráficas unimodales características de eventos de expansión sólo los valores del clado Sur fueron significativos.

En el resultado, más sensible obtenido mediante el análisis del BSP las respuestas de expansión poblacional para ambos clados y con el marcador *D-Loop* figuran asociadas al período interglacial entre la Glaciación Llanquihue (200.000-140.000 años) y la Glaciación Santan María (80.000 y 8.000 años). En definitiva ubicamos la expansión de ambos clados

hace entre 150.000 y 50.000 años, aproximadamente. También observamos un cuello de botella, en el clado Sur, previo a la expansión poblacional.

El modelo del BSP para *Citocromo b* pudo ser inferido sólo para el clado Sur ya que el clado Sureste cuenta con un tamaño muestral demasiado bajo que no permitió realizar los cálculos correspondientes. El resultado obtenido para el clado Sur también indica un rango de expansión poblacional pero no tan drástico sino más gradual y continuo (Figura 16).

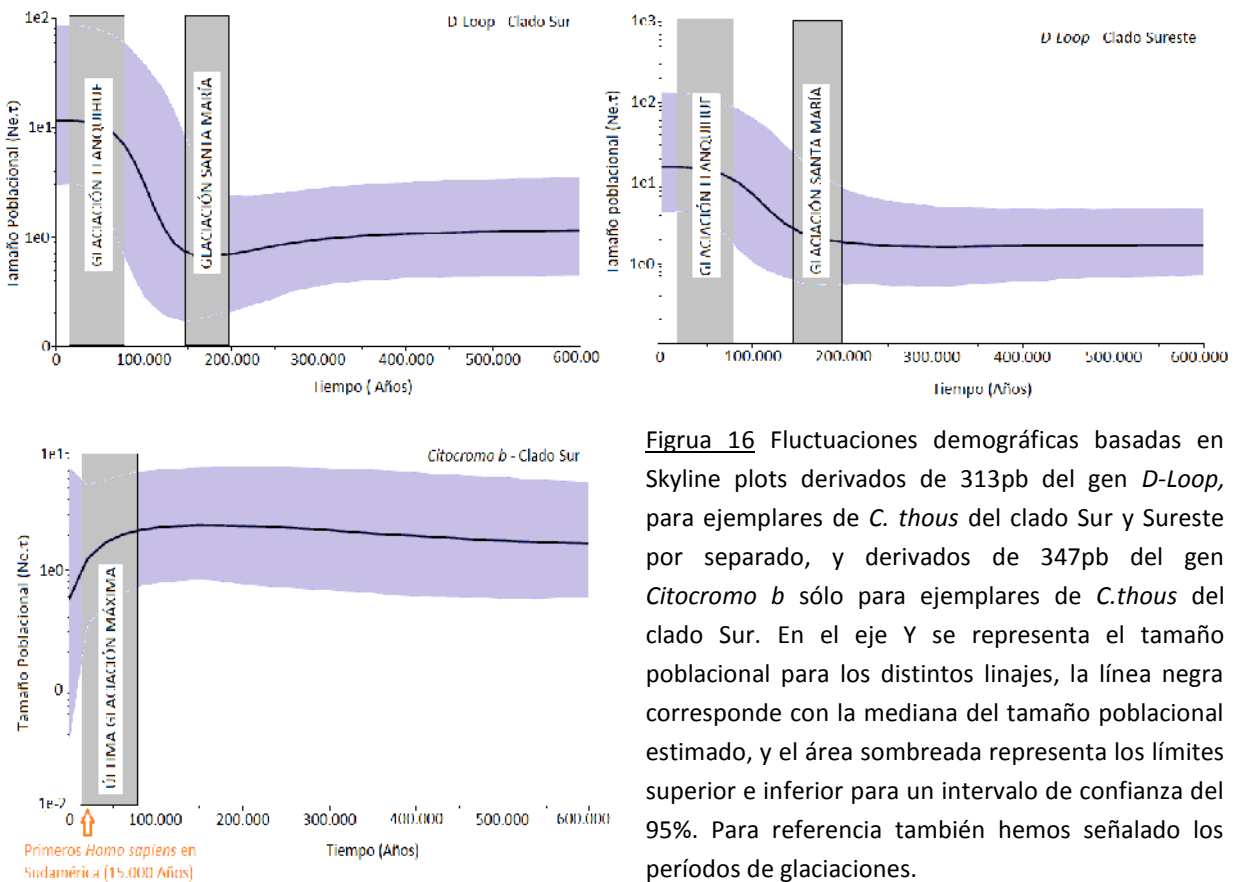


Figura 16 Fluctuaciones demográficas basadas en Skyline plots derivados de 313pb del gen *D-Loop*, para ejemplares de *C. thous* del clado Sur y Sureste por separado, y derivados de 347pb del gen *Citocromo b* sólo para ejemplares de *C. thous* del clado Sur. En el eje Y se representa el tamaño poblacional para los distintos linajes, la línea negra corresponde con la mediana del tamaño poblacional estimado, y el área sombreada representa los límites superior e inferior para un intervalo de confianza del 95%. Para referencia también hemos señalado los períodos de glaciaciones.

También se diferencia del modelo del BSP con *D-Loop* para el mismo clado porque muestra evidencia de una respuesta poblacional asociada con la Última Gran Glaciación (LGM, por sus siglas en inglés). A diferencia del *D-Loop* que a partir de los 50.000 años hasta el presente la gráfica indica un mantenimiento del tamaño poblacional constante, el *Citocromo b* indica un marcado descenso en el tamaño poblacional efectivo.

Esto podría indicar que las condiciones extremas del LGM posiblemente hayan incidido de forma negativa en las poblaciones del “Zorro de Monte”, lo cual eventualmente también podría haberse potenciado con la aparición del ser humano en Sudamérica.

La diferencia observada en la dinámica demográfica reconstruida con los distintos marcadores más que una diferencia indica que cada marcador reconstruye con una señal más fuerte momentos distintos de la historia demográfica del “Zorro de monte”.

6. DISCUSIÓN

El estudio de la historia biogeográfica de la biota neotropical generalmente ha sido enfocado en base a patrones de distribución amazónicos encontrados en diversas especies (Haffer 1969). Luego también se suman estudios filogeográficos de géneros y especies particulares empleando marcadores moleculares. Dentro de éstos, nuestro estudio realizado en una especie de cánido neotropical muestra que pese a las diferentes respuestas de las especies a los cambios climáticos históricos, existe regularidad en los mecanismos que han dado lugar a los patrones locales y regionales de diversidad y endemismo en la zona neotropical. Al respecto nuestro trabajo contribuye a la evidencia ya aportada por otros autores (Quijada-Mascareñas 2007; Tchaicka *et al.*, 2007) en referencia a la fragmentación del Bosque Atlántico, en parches de bosque durante el Pleistoceno medio y temprano. Ello muestra la contribución potencial de estudios filogeográficos en especies de hábitats abiertos, para dilucidar la historia de esta región.

6.1 Patrones Filogeográficos y Filogenia intraespecífica

El análisis de la filogenia intraespecífica y las redes de haplotipos, tanto para las secuencias de *D-loop* como para las de *Citocromo b* identifican una estructuración en dos clados. Estos corresponden a distintas provincias biogeográficas que son: Caatinga, Pará y Llanos Venezolanos para el clado Sureste y Cerrado, Bosque de *Araucaria angustifolia*, Bosque Paranaense, Chaco y Pampa para el clado Sur. Para esta región que forma un área compuesta, dominada por un ambiente de vegetación semidecidual pero también de un mosaico de subunidades que varían desde Praderas a Bosque seco (Costa 2003), varios autores han visualizado patrones de distribución disyuntos de especies y subespecies, evidenciando una partición latitudinal a partir de datos de anfibios, reptiles y aves empleando análisis parsimonioso de endemismos (Martins *et al.*, 2007). Recientemente esta división, generalmente asociada al Bosque Atlántico, también ha sido descrita para mamíferos no voladores (ratones y marsupiales Costa, 2003), serpientes (Grazziotin *et al.*, 2006), lagartos (Glor *et al.*, 2001), anfibios (Sousa

et al., 2010) y especies de murciélagos (Ditchfield 2000; Martins *et al.*, 2007) empleando una aproximación filogenética. La fragmentación en el pasado pleistocénico del neotrópico, en áreas más secas y abiertas (esteparias) (de Vivo & Carmignotto 2004) ha sido comúnmente utilizada para explicar los patrones filogeográficos como los enunciados en párrafos anteriores. En nuestro caso hemos confirmado el quiebre filogeográfico hallado en el “Zorro de monte,” que comparte dicho patrón. A pesar de no encontrar una barrera geográfica, el límite se localiza entre el estado de Bahía y Minas Gerais. Este además concuerda con la frontera entre las provincias biogeográficas de Caatinga por un lado y el Cerrado por el otro. De acuerdo con Irwin (2002) la existencia de dos filogrupos sin una barrera al flujo génico, como en nuestro caso para el “Zorro de monte” (clados Sur y Sureste) puede ser explicado de dos formas (que se discuten más adelante):

1. A partir de una especie ancestral separada en dos por una barrera geográfica hasta que posteriormente las poblaciones se expanden y retoman el contacto.
2. A partir de una especie que ha estado distribuida siempre en toda el área, donde la diferenciación del ADN mitocondrial es el resultado de la baja dispersión individual asociada a la estructura social produciendo filopatría en alguno o ambos sexos, para especies sexuadas con capacidad dispersiva.

El patrón filogeográfico manifiesto exhibe una marcada subdivisión genealógica entre haplogrupos y una marcada estructuración espacial por alopatría. Esto ha sido caracterizado por Avise (1987) como propio de pequeños mamíferos, insectos y herpetofauna dada su poca vagilidad en escalas regionales amplias. Sin embargo para una especie con un gran potencial de dispersión como los cánidos, y entre ellos el “Zorro de monte” como nuestro objeto de estudio, ésta marcada diferenciación geográfica no sería un hallazgo esperado. Esto indica que las tasas de dispersión por sí mismas no alcanzan para explicar por qué algunos carnívoros, como nuestro “Zorro de monte” exhiben una estructura filogeográfica y otros no. El grado de especialización en contraposición con la plasticidad adaptativa son factores a tener en cuenta. En este sentido una misma especie el “Zorro rojo” (*Vulpes vulpes*) exhibe una estructuración llana en sus poblaciones de Europa (Amber *et al.*, 2011), mientras en Norteamérica están fuertemente estructuradas geográficamente (Aubry *et al.*, 2009), revelando

además historias demográficas diferentes a pesar de responder a eventos climáticos similares asociados a las oscilaciones entre los períodos glaciares e interglaciares del Cuaternario en el Hemisferio Norte.

En el caso concreto del “Zorro de monte” su rango de distribución se extiende por gran parte de los biomas existentes en el Neotrópico, desde bosques estacionales hasta ambientes semiáridos, mostrando una gran adaptabilidad a los distintos hábitats.

Sin embargo el nivel de alopatría de estos dos filogrupos reconocidos para *C. thous* es completo de acuerdo con los datos para el *Citocromo b* y casi completo para *D-Loop*. En este caso sólo 2 haplotipos proceden de muestras colectadas en una región geográfica, distinta del clado al que fueron asignados en la filogenia intraespecífica. Es decir 2 haplotipos (DL2 y DL30) asignados al clado Sur fueron recuperados en secuencias (EF194169, EF194192) obtenidas a partir de muestras colectados en localidades pertenecientes a la región geográfica del clado Sureste. Mientras un haplotipo (DL13) asignado al clado Sureste también fue recuperado de una secuencia (EF107013) colectada en una localidad perteneciente a la región geográfica del clado Sur (Tabla 1). Aunque en general hemos encontrado una ausencia de haplotipos compartidos estas excepciones pueden explicarse a través de un flujo génico reciente asociado a eventos esporádicos de introgresión, dado que es el mismo haplotipo recuperado de uno y otro grupo.

Las localidades de los individuos portadores están muy alejadas (entre 800 y 2000 kilómetros) entre sí permitiéndonos sugerir que dicho haplotipo consiste en un polimorfismo ancestral. De hecho en la red de haplotipos se ubican en posiciones centrales y en frecuencias mayores a 1, características propias de los haplotipos más ancestrales.

Finalmente debemos tener presente que la asociación que hemos encontrado entre haplotipos, tanto de *D-Loop* como de *Citocromo b* está dada por las similitudes halladas al comparar sólo un fragmento de ambas secuencias que equivale aproximadamente a un 20% de la secuencia total de cada marcador. Entonces si se aumenta el tamaño de las secuencias a comparar, podrían modificarse las relaciones entre haplotipos apareciendo una separación total entre clados, Sur y Sureste respectivamente.

6.2 Diferenciación genética y Filopatría de las hembras

El valor de divergencia estimado para las secuencias de *Citocromo b* entre clados es de 6.66 % mientras para las de *D-Loop* es de 8.11%. Una tasa de divergencia mayor en *D-Loop* es esperable por tratarse de un fragmento no codificante, dentro de la Región Control del ADN mitocondrial. Dicho marcador se identifica como un sitio caliente en cuanto a los cambios, debido a su elevada tasa de mutación, estimada por Taberlet (1998) para mamíferos en una décima parte superior a la de *Citocromo b*, que le permite acumular mayor número de variantes en el tiempo (Rutledge *et al.*, 2010).

Sin embargo, en relación con otros cánidos sudamericanos no hemos podido comparar con otros datos de divergencia genética, evidenciando un vacío de información al respecto en la bibliografía consultada.

También comparamos con los datos reportados por Avise (1987) en mamíferos norteamericanos que exhiben una estructura filogeográfica que se ajusta a la categoría I (Discontinuidad genética con separación espacial) dentro de los patrones filogeográficos descritos por el mismo autor, y encontramos que los valores de divergencia nucleotídica oscilan entre el 1% y el 4%. La divergencia genética hallada en las secuencias mitocondriales de *C. thous* excede un poco dicho rango.

Otra característica particular de los cánidos es su amplia capacidad de dispersión; una filopatría de hembras como la reportada en estudios de campo de cánidos de tamaño pequeño a mediano del género *Vulpes* (Koopman *et al.*, 2000) podría contrarrestar su efecto. Al respecto MacDonald y Courtenay (1996) sugieren que ambos sexos de *C. thous* tienen cierta tendencia a la filopatría pero no descartan la posibilidad de que los machos dispersen en promedio más que las hembras. Entonces si asumimos como condición una filopatría de hembras, donde la dispersión estaría restringida, esperaríamos encontrar un patrón de diferenciación debido a un aislamiento por distancia. De hecho en nuestro estudio encontramos una correlación entre la distancia genética y la geográfica para toda la muestra, con ambos marcadores mitocondriales; lo cual es esperable dado que el área que se abarcó en este trabajo es muy grande. Luego a nivel del clado Sur con *D-Loop*, el patrón no es tan claro. Al comparar tanto F_{ST} como niveles de diferenciación nucleotídica pareados entre las "Agrupaciones

poblacionales” dentro de dicho clado, la correlación entre distancia genética y geográfica es evidente. Encontramos una baja divergencia nucleotídica entre sitios cercanos, y a medida que aumenta la distancia también tiende a aumentar la diferenciación nucleotídica entre grupos poblacionales, que oscila entre 0.8 y 6.7%. A partir de ello podríamos decir que ambos clados de *C. thous* pueden reducirse a un modelo poblacional tipo stepping-stone donde se manejan unidades discretas pero con un criterio de aislamiento por distancia al encontrarse conectadas por migración. De todos modos debemos tener en cuenta que la dinámica poblacional que subyace a los fenómenos de flujo génico es compleja y por tanto los modelos nos permiten hacer una aproximación pero dejan de ser útiles cuando se profundiza en el conocimiento de la población de estudio. De hecho no podemos discernir si el patrón observado de variación genética es compatible con un modelo de barrera al flujo génico, una filopatría de las hembras, o la combinación de ambos. Para ello deberíamos incluir marcadores nucleares que serían más informativos si a su vez permiten sexar las muestras, tales como ZFX y ZFY (Ortega *et al.*, 2004).

Los 3 intrones utilizados por Tchaikca y colaboradores (2007) muestran una ausencia de estructuración geográfica por lo cual sugieren que el flujo génico es principalmente mediado por los machos. Entonces teniendo en cuenta todo ello sugerimos que el quiebre filogeográfico observado es compatible con un efecto simultáneo de ambos procesos.

Para las especies con poblaciones fuertemente estructuradas, la restricción del hábitat puede ser invocada bajo el modelo de refugios pleistocénicos. El Tiempo del Ancestro Común más reciente de ambos clados de *C. thous* es congruente con una historia Pleistocénica pasada por lo cual es posible ubicar el evento de vicarianza en una ventana temporal hace 2 Millones de años.

Sin embargo no hemos podido precisar cuál de estos clados se originó primero, debido a la amplitud de los intervalos de confianza para cada estimación, que se solapan. Esto puede ocurrir debido a limitaciones metodológicas, un marcador genético con una tasa de evolución demasiado acelerada que no permite discernir eventos profundos en el tiempo, o porque efectivamente ambos clados surgen simultáneamente. Ello podría haber ocurrido debido a un proceso de dispersión a través de los corredores

propuestos por Quijadas-Mascareñas y colaboradores (2007). En este sentido una hipótesis para explicar la estructuración encontrada sería que dos oleadas de migración simultáneas, una a través del corredor costero (a nivel de la costa atlántica desde Venezuela) y otra a través del corredor que pasa por el centro de la cuenca amazónica dieron lugar a la colonización y establecimiento de las dos unidades poblacionales que encontramos actualmente y, que habrían sido mantenidas cada una en un refugio donde alcanzaron el grado de diferenciación actual. Posteriormente expanden su rango de distribución, durante el período interglacial y entran en contacto. La elevada diversidad encontrada en las secuencias obtenida de la agrupación de poblaciones de Cerrado puede ser explicada en parte debido a la mezcla de los haplotipos de ambos clados: Sur y Sureste. De esa forma parte de la provincia biogeográfica de Cerrado actuaría como zona de contacto, un sumidero entre las regiones del Sur y Sureste (Vallianatos *et al.*, 2001).

Otra hipótesis sería una única oleada a través del corredor central o del corredor costero a partir del cual se produjera luego una dispersión hacia toda el área ocupada actualmente por el “Zorro de monte”. De hecho el resultado de las redes de haplotipos reconstruidas, además de reforzar la estructuración filogeográfica que fue revelada en los árboles filogenéticos, apoyando la asociación genética y geográfica entre haplotipos, nos sugiere la existencia de un corredor central de sabana y bosque seco comunicando las regiones al norte y sur de la cuenca amazónica, como plantean Quijadas-Mascareñas y colaboradores (2009) para una especie de serpiente (*Crotalus durissius*). En ese caso los autores proponen que la ocurrencia de haplotipos ancestrales del clado del sur en localidades geográficas del sur pero no del sureste apoya la dispersión de la especie a través de un corredor central y no de uno costero. Los resultados similares, obtenidos para *C. thous* nos permitirían sugerir un mismo comportamiento biogeográfico para la especie. Sin embargo la falta de registro fósil asociado al área donde presuntamente se formó dicho corredor, que debió ser transitado por individuos del “Zorro de monte” hasta alcanzar el área ocupada actualmente por el clado Sur, debilita esta posibilidad. Para corroborar la hipótesis de un corredor costero para la dispersión del “Zorro de monte” en Sudamérica carecemos

de datos de secuencias de ejemplares colectados al norte de la cuenca amazónica para compararlos con los hallados al sur.

De todas formas independientemente si la colonización por parte del “Zorro de monte” del área que actualmente ocupa, ocurrió en una o más oleadas, las evidencias que hemos recogido nos conducen a sugerir un escenario consistente con un evento de vicarianza, donde la distribución continua de *C. thous* es fragmentada produciendo el aislamiento por un período prolongado de los dos filogrupos que hemos reconocido. Estos además son congruentes con dos de las subespecies establecidas por Cabrera (1931) como *C. t. entrerrianus* (clado Sur) y *C. t. azarae* (clado Sureste). Para estos dos grupos también definidos desde el punto de vista genético por Tchaicka y colaboradores (2007) y morfológico por Machado y Hingst Zaher (2009) sugerimos, a partir del estado de diferenciación filogeográfica observado, que han alcanzado una monofilia recíproca en su ADN mitocondrial.

La conjunción de evidencia de origen independiente (morfológica y genética, etc.), como con la que cuenta *C. thous*, generalmente apoya el aislamiento de las poblaciones por períodos largos así como su divergencia (Vázquez, 2007). En ese sentido es posible adjudicar el quiebre filogeográfico hallado a la disrupción continua del hábitat ocasionada por ciclos de oscilación climática durante el Pleistoceno, donde la fragmentación del hábitat facilitó el aislamiento de estos dos grupos del “Zorro de monte” que se diferenciaron en alopatria y retoman el contacto a través de una expansión posterior. Como consecuencia de ello es posible observar actualmente una diferenciación genética sin la presencia de una barrera geográfica actual.

De todas formas existe evidencia de la presencia de refugios y fragmentación del hábitat en el Sureste de Sudamérica durante el período entre el Terciario tardío y el Cuaternario (Nores 1999; Bush 1994). También se cuenta con evidencia que apoya que las oscilaciones climáticas durante todo el Pleistoceno produjeron pulsos de fragmentación del hábitat que fueron constituyendo una barrera para el entrecruzamiento en base a sutiles diferencias ambientales y genéticas que finalmente constituyen con el paso del tiempo un proceso que pudo acotar estos dos grupos a áreas disjuntas. Su separación fue datada hace 550.000 años y parece ser un tiempo suficiente para alcanzar la monofilia recíproca a nivel del ADN mitocondrial.

El tiempo de divergencia entre ambos clados fue estimado a partir de marcadores mitocondriales lo cual desde la perspectiva de la genética poblacional actúa como un único locus dado que todos los genes mitocondriales están ligados y no recombinan (Avice, 1994). Esta aproximación ofrece limitaciones que conducen a la sobreestimación del tiempo debido a la presencia de polimorfismos ancestrales en la población y a la varianza de la naturaleza estocástica del modelo del coalescente, como una consecuencia natural del proceso de deriva. La varianza asociada se reduce con la variabilidad incorporada a partir de nuevos locus, dado que cada uno constituye una réplica independiente del proceso del coalescente a partir del cual se obtienen estimaciones del tamaño poblacional ancestral. En consecuencia una mayor precisión en el cálculo del tamaño poblacional podría ser obtenida al utilizar varios marcadores genéticos, obteniendo a partir de un análisis multilocus una mejor estimación del tiempo de divergencia. De todos modos la calibración obtenida coincide con lo reportado por Tchaicka y colaboradores (2007), que es congruente con una historia pleistocénica. Asimismo el tiempo de divergencia estimado para el ancestro común de ambos clados de *C. thous* (1.048 Ma) es congruente con el origen sudamericano de estos grupos, teniendo en cuenta que las calibraciones de datos fósiles indican la entrada, desde Norteamérica, del ancestro de la especie hace 3 Millones de Años, una vez establecido el Istmo de Panamá.

6.3 Dinámica Demográfica

La estimación de Skyline plot, para ambos clados Sur y Sureste, analizados por separado para no violar la premisa de panmixia, reveló en cada uno un escenario de expansión poblacional durante los últimos 150000 años aproximadamente. Sin embargo otros resultados, test de neutralidad y mismatch distribution no son congruentes en ese sentido para el clado Sureste. Para el clado Sur la tendencia general de su comportamiento demográfico es consistente con un evento de expansión pasado, con una limitada diferenciación respecto del clado Sureste, tal vez producto de un evento de vicarianza. Esto es apoyado por los índices de Tajima y Ragedness indicando que el clado Sur fue el resultado de un crecimiento y

consecuente expansión poblacional. Ello es concordante con el resultado de la red de haplotipos donde principalmente el *D-Loop* indica la ocurrencia de una dinámica poblacional inestable. Por el contrario para el clado Sureste los bajos valores de las frecuencias haplotípicas y su restricción geográfica a especímenes de Caatinga, Pará y Llanos Venezolanos (localidades de Bahía, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Ceará, Maranhao y Venezuela) apoyan una historia demográfica que no corresponde con un escenario de expansión poblacional. La falta de significación en los resultados obtenidos tanto de los estimadores de los test de neutralidad así como también con los test para el análisis de mismatch distribution es congruente con ello. Entonces podemos sugerir que como unidades poblacionales independientes el clado Sur y Sureste también presentan historias demográficas independientes. Ello puede estar asociado a la localización del clado Sur, que ocupa una región a una latitud levemente mayor respecto de la localización del clado Sureste. De hecho a medida que nos movemos hacia latitudes mayores se registran señales más fuertes de las oscilaciones climáticas, al producir en algunos sitios casquetes glaciares que fragmentaron propiamente el hábitat modificando la dinámica de las poblaciones en esos lugares. En ese sentido previo a la expansión poblacional el análisis del Skyline plot muestra un cuello de botella a partir de los datos de *D-Loop*, que no se registra en el clado Sureste y puede ser tomado como un indicio de cómo el cambio climático afectó de forma diferencial estos clados. Sin embargo los valores de diversidad genética del clado Sur expresados tanto en la diversidad nucleotídica como haplotípica no son bajos como se esperaría luego de una reducción del tamaño poblacional. Por el contrario tienden a ser elevados y mostrar un rango similar a los valores para el clado Sureste. Esto puede deberse a un cuello de botella muy pequeño que no alteró las frecuencias nucleotídicas o haplotípicas observadas.

Al momento de interpretar los resultados debe tenerse en cuenta las diferencias de ambas aproximaciones; mientras la tasa de crecimiento estimada con los estadísticos de neutralidad está basada en un punto que representa el promedio para toda la historia de la población, Skyline plot estima cambios poblacionales a través del tiempo lo que permite detectar con significancia estadística expansiones del tamaño poblacional más recientes y patrones de diversificación (Ho & Shapiro 2011). Entre los

dos test de neutralidad considerados, el test de Fu es el más robusto (Xin-Fu 1997; Ramos-Onsins & Rozas 2002) y sensible (Fu 1997 citado en Excoffier & Lischer 2010) para detectar escenarios de expansión demográfica. Sin embargo debemos tener en cuenta que los valores significativos tanto del estimador D (Test de Tajima) como F_s (Test de Fu) se deben a diversos factores además de la expansión poblacional tales como el efecto de la selección natural, cuellos de botella y heterogeneidad de las tasas mutacionales que producen alelos raros en baja frecuencia (Excoffier & Lischer 2010). Los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno en la región Neotropical pueden explicar el origen y diversificación de estos clados, geográficamente estructurados cuya divergencia se establece, hace menos de 1 Millón de Años (MA). Al realizar estimaciones demográficas con Skyline plot debe tenerse en cuenta que los datos necesitan ser informativos, ya que la señal demográfica varía entre poblaciones y especies. Por ello el diseño de muestreo es algo importante aunque muchas veces está condicionado por la disponibilidad económica y el acceso a los sitios de colecta. El método de Skyline plot es aplicado al nivel poblacional por lo cual es preferible utilizar loci con una alta tasa de evolución, para apreciar la variación entre las muestras individuales. Para aumentar la cantidad de información en el alineamiento se puede aumentar el largo de la secuencia o utilizar una región variable para mejorar la precisión de la estimación filogenética de la genealogía. Para ello hemos elegido el ADN mitocondrial que evoluciona rápidamente, usualmente no recombina y es de herencia materna. En nuestro caso utilizamos dos marcadores mitocondriales el *Citocromo b* y el *D-Loop* y hemos observado que si bien de acuerdo a las características mencionadas del ADN mitocondrial y a que ambos marcadores son tomados como un único locus, ofrecen información distinta. Del mismo modo Aubry y colaboradores (2009), para el “Zorro rojo” en Norteamérica, indican que el *D-Loop* resultó menos sensible a los cambios poblacionales evidenciados por el Skyline plot con el *Citocromo b*. Lo mismo ocurrió en nuestro caso para el “Zorro de campo” ya que encontramos un marcado descenso de la población asociado al Último Glacial Máximo (LGM) que es observado únicamente con el *Citocromo b*.

De acuerdo con las características propias de cada marcador, el *Citocromo b* presenta una secuencia relativamente conservada, que en general lo haría propicio para

resolver divisiones filogenéticas profundas y evidenciar señales en el ADN correspondientes a eventos más alejados del presente. Mientras tanto el marcador *D-Loop*, que constituye una secuencia no codificante de la Región Control, acumula una alta diversidad nucleotídica que se espera le confiera un mayor poder de resolución en eventos más recientes en el tiempo (Aise 1994, 2000). Por el contrario en nuestro caso el *D-Loop* indica señales de una expansión poblacional anterior a una declinación del tamaño poblacional revelado con *Citocromo b*.

En las tasas de evolución calculadas para ambos marcadores genéticos, también se observan diferencias. Ellas fueron estimadas (en sustituciones/sitio/MA), resultando un valor, para la secuencia parcial de *D-Loop*, mayor al obtenido por Tchaicka y colaboradores (2007), pero que no es incongruente con este ya que los intervalos de confianza de ambas estimaciones se solapan completamente.

Además dado que la estimación es en relación a los nucleótidos por sitio y que la secuencia que utilizamos en nuestro trabajo tiene una longitud relativamente menor, la diferencia obtenida es esperable.

Para la secuencia parcial de *Citocromo b* el valor es menor al de *D-Loop* lo cual también es esperable. De todos modos debemos tener en cuenta que el cálculo realizado se basa en el modelo del coalescente, utilizando como punto de calibración el tiempo de divergencia entre *Pseudalopex vetulus* y *Pseudalopex gymnocercus*, calculado a partir de datos fósiles. Esto introduce un error propio de las dataciones del registro fósil, eventos biogeográficos y de especiación que son combinados para calibrar el reloj molecular del marcador genético utilizado. El cálculo también depende del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajuste a los datos, de lo contrario la estimación se basa únicamente en el número de sustituciones observadas (Arbogast *et al.*, 2002). Finalmente el incremento poblacional entre los 100000 y 50000 años, corresponde con un período durante el cual varios autores han citado la contracción y expansión de los bosques como proceso recurrente. La estimación de la edad de la expansión poblacional determinada como intervalo no permite puntualizar la fecha y correlacionarla con un evento más específico. Aunque ello también lo estimamos a partir de los parámetros demográficos obtenidos con el modelo de “Mismatch distribution” podemos sugerir que la expansión comenzó mucho antes del LGM

(datado entre 27500 y 14500 años aproximadamente). Nuestras estimaciones para *D-Loop* con Skyline plot (entre 50000 y 150000 años) y con Mismatch distribution (97752 años) son congruentes entre ellas y con el momento estimado por Tchaicka y colaboradores (2007) para la expansión poblacional del clado Sur en 108625 años ya que los intervalos de confianza se solapan.

El mismo patrón fue revelado para otros vertebrados neotropicales, distribuidos en la misma región como por ejemplo para la “Yarará” (*Bothrops jararacá*), y coincide con un período interglaciar, previo a la última gran glaciación, en una ventana de tiempo entre los 150000 y 50000 años aproximadamente. Dicho período es denominado para Sudamérica como Valdivia (MIS 5), ubicado entre la Glaciación Llanquihue (MIS 6) y la Santa María (MIS 4). Originalmente los períodos glaciares e interglaciares del Cuaternario fueron nombrados, a partir de factores geológicos característicos de cada región pero actualmente es más común referirse a ellos por el número del estadio isotópico marino (MIS). Ello es un indicador del volumen de los casquetes de hielo a escala global, a partir de la relación isotópica entre el oxígeno 18 y el oxígeno 16. Un valor bajo indica un volumen reducido y consecuentemente condiciones del clima más cálidas. (Lambeck *et al.*, 2002; Gibbard & van Kolfschoten, 2004). El período interglacial con el que se asocia la expansión poblacional del “Zorro de monte” se caracteriza por un nivel del mar entre 4 y 6 m de altura por encima del actual y una temperatura entre 1 y 2°C menor. En general la evidencia acumulada revela un patrón de cambio complejo a través del período del Pleistoceno, debido a la incidencia de diversos eventos, a nivel del mar, atmosférico y terrestre (en la superficie continental como de los casquetes glaciares) que interaccionan generando la variación climática vinculada a dicho período.

Con *Citocromo b*, para el clado Sur se observa un crecimiento menos conspicuo y luego un marcado descenso del tamaño poblacional que coincide con la aparición del género *Homo* en Sudamérica. En América del Norte el bison, extinto, también muestra para el mismo período una expansión exponencial del tamaño poblacional seguido por un rápido declive, donde los cambios ambientales durante el LGM fueron la principal causa de los cambios observados en la diversidad genética de la especie (Shapiro *et al.*, 2004).

Históricamente los carnívoros han mantenido una relación mayoritariamente conflictiva con el hombre y aunque ello es más evidente en los carnívoros de mayor tamaño, también se manifiesta en especies de tamaño mediano y pequeño. Estas mantienen áreas de acción generalmente extensas que los exponen a una competencia recurrente con el ser humano (Funes *et al.*, 2006). Sin embargo durante el Holoceno, asociado al LGM se observan también gaps en la ocupación humana en las tierras bajas de Brasil donde la aridez y disponibilidad de agua fueron limitantes como consecuencia de un clima marcado por períodos de aridez (Araujo *et al.*, 2005). Sin lugar a dudas estas condiciones climáticas afectaron también al “Zorro de monte” produciendo la señal de un declive poblacional que hemos detectado en nuestro estudio. Sin embargo la diversidad genética tanto del clado Sur como del Sureste no exhiben en la actualidad niveles que alarmen sobre el estado de conservación de la especie con lo cual sugerimos que con la llegada del Holoceno tardío un clima más méxico permitió su recuperación poblacional mostrando una gran capacidad de adaptación a los cambios en el hábitat para el “Zorro de monte”.

Finalmente la reconstrucción de la historia demográfica realizada no puede ser explicada sólo en función de un escenario de refugios pleistocénicos. De hecho nuestros resultados sugieren que la diversificación de estos dos clados está asociada con la fragmentación de las formaciones de Bosque de *Araucaria angustifolia*, Bosque Paranaense y Cerrado durante el Pleistoceno temprano; como parte del proceso que originó la biodiversidad Neotropical. A diferencia de la existencia de refugios glaciares y la subsiguiente expansión interglaciar de las especies, ampliamente documentada en las zonas templadas de Europa y Norteamérica mediante análisis palinológicos y de macrofósiles (Webb 1978); en los trópicos se observa que los cambios climáticos del Pleistoceno no conducen a la especiación pero producen una variabilidad de respuestas que inciden en las historias demográficas. Dejan huellas genéticas de ello en las poblaciones, y son producto de un ambiente heterogéneo (Lessa *et al.*, 2003). Allí los patrones locales y regionales de diversidad y endemismo requieren modelos de diversificación más complejos para ser explicados (Rull, 2006). En este sentido se considera que las intensas y periódicas oscilaciones climáticas del Pleistoceno han sido decisivas para conformar la estructura genética de las poblaciones y comunidades

(Hewitt, 1996) La distribución actual de varios organismos como por ejemplo el “Zorro de monte” sugieren la ocurrencia de una considerable fragmentación del hábitat.

6.4 Implicancias para la conservación

Este estudio constituye el contexto filogenético necesario para evaluar la validez de la clasificación taxonómica de *Cerdocyon thous* en las poblaciones localizadas al sur de la cuenca amazónica. Hemos reconocido dos linajes que coinciden con datos morfológicos y son asignados por Cabrera (1931) como dos subespecies: *Cerdocyon thous entrerrianus* y *Cerdocyon thous azarae* distribuidas en las regiones de Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina y Uruguay la primera y el sureste brasileño la segunda. El reconocimiento de estas subespecies constituye una primera aproximación al conocimiento, para delinear unidades intraespecíficas para la conservación y el manejo de organismos.

Basados en la monofilia recíproca encontrada entre estos dos clados podemos definir dos Unidades Evolutivamente Significativas (Moritz, 1994) que corresponden también con dos Unidades de Manejo al no haber encontrado ningún tipo de subestructuración poblacional dentro de estos grupos mayores. Éstos concuerdan con filogrupos y áreas de endemismo ya descritas para otras especies de vertebrados asociados al Bosque Atlántico. Este es, junto con el Bosque Amazónico, una de las dos áreas de bosque más diversas dentro del bosque tropical lluvioso en Sudamérica; también es uno de los ambientes más fragmentados y distorsionados, considerado un punto caliente de biodiversidad con 567 especies de vertebrados endémicas (Myers *et al.*, 2002 citado en Barros-Moraes *et al.*, 2007). El “Zorro de monte” es una especie que, con una amplia distribución también se distribuye allí y aunque no se la considera amenazada desde el punto de vista de su conservación el estudio de su diversidad intraespecífica apoya la identificación de ésta área y las regiones biogeográficas que incluye, para implementar planes de conservación en otras especies que sí se encuentran amenazadas y con las que comparte el rango de distribución en el Bosque Atlántico. Además desde una perspectiva ecosistémica tener un amplio conocimiento de la biología de las especies

de carnívoros y dentro de ellos de los cánidos es importante ya que se ubican al tope de la cadena trófica.

En cuanto a la historia demográfica particular de *C. thous*, hemos revelado para el clado Sur el descenso en el pasado reciente del tamaño poblacional efectivo, asociado al LGM. A pesar de ello hemos constatado también elevados índices de diversidad dentro de cada clado y para el conjunto de las muestras, dentro del área de estudio que incluye el Bosque Atlántico. Podemos sugerir que la fragmentación del ambiente ya sea por efectos globales como las oscilaciones climáticas o locales a través de la acción antrópica han incidido sobre estas poblaciones.

Debe procurarse mantener la estabilidad poblacional y variabilidad genética encontradas asegurando la continuidad de la zona de contacto y el área de distribución de estas unidades de forma tal que el nivel de introgresión se mantenga sin afectar la integridad de alguna de estas unidades. Además la respuesta observada en estas poblaciones a los cambios climáticos pasados nos dan indicios de cuál podría ser su comportamiento demográfico frente a oscilaciones climáticas futuras.

7. CONCLUSIONES

- A partir de secuencias de dos marcadores mitocondriales y basados en la variación genética, los niveles de estructuración genética y de flujo génico encontrados, hemos confirmado que *C. thous* en el área de estudio, al sur de la cuenca amazónica presenta un quiebre filogeográfico en dos clados. La diferenciación es debida al aislamiento por distancia y no a un gradiente ecológico. Estos dos linajes que denominamos Sur y Sureste presentaron una segregación completa a nivel de los marcadores utilizados con elevados niveles de divergencia. El patrón de diferenciación encontrado es congruente con las subespecies reconocidas con datos morfológicos y genéticos como *C. t. entrerrianus* y *C. t. azarae*. Dentro de esta distribución, las poblaciones localizadas en el territorio de Uruguay pertenecen al clado de *C. t. entrerrianus* sin mostrar ningún tipo de subestructuración dentro del clado Sur, a pesar de constituir la distribución más austral para la especie.
- El TMRCA para ambos clados ubica su diferenciación durante el Pleistoceno pero previo al LGM (Holoceno). La datación indica que ambos linajes alcanzan la monofilia recíproca a nivel de marcadores mitocondriales en un período de tiempo aproximado al medio millón de años.
- La profunda estructuración hallada, en ausencia de una barrera geográfica al flujo génico y los tiempos de divergencia calculados evidencian que las oscilaciones climáticas durante el Pleistoceno, que fragmentaron el ambiente incidieron en el modelado de la estructura poblacional de este cánido neotropical. Concomitantemente la historia demográfica del clado Sur apoya una dinámica de expansión-contracción del Bosque Atlántico reflejada en los cambios de su tamaño efectivo. Por el contrario el clado Sureste exhibe una dinámica demográfica más estable con lo cual concluimos que ambos clados constituyen unidades poblacionales y demográficas independientes.
- La información filogenética contenida en las secuencias de ADN mitocondrial ha probado ser de gran utilidad para deducir el patrón de diferenciación y demografía histórica entre poblaciones de esta especie de cánido neotropical. Los niveles de

diversidad genética son elevados e indican que pese a la incidencia de los cambios climáticos del pleistoceno estos no han afectado a las poblaciones. A pesar que su estado de conservación no se encuentra amenazado hemos definido dos ESU correspondientes al clado Sur y Sureste. Ellas son congruentes con otros filogrupos del Bosque Atlántico, evidenciando la importancia de este tipo de estudios como una herramienta para entender los patrones biogeográficos de la región neotropical y contribuir a delimitar áreas geográficas para la conservación de unidades en el Bosque Atlántico.

8. PERSPECTIVAS

Un estudio filogeográfico como el que presentamos en este trabajo es sólo uno de los muchos aspectos que se requieren como información definitoria para determinar cambios taxonómicos de especies y entender la dinámica de las poblaciones. El uso de dos marcadores de ADN mitocondrial nos permitió obtener con un mayor nivel de confianza nuestros resultados, al poder discernir frente a potenciales ambigüedades. Sin embargo para obtener un resultado más robusto deberíamos amplificar un fragmento más largo de los marcadores utilizados (*D-Loop* y *Citocromo b*). Ello nos permitiría corroborar si comparando un mayor número de caracteres genéticos se mantiene la identidad haplotípica hallada o se distinguen nuevos haplotipos únicos.

Teniendo en cuenta que este estudio fue conducido en un área parcial de la distribución de la especie deberíamos aumentar el esfuerzo de muestreo para analizar la diversidad genética de este cánido neotropical también en localidades al norte de la cuenca amazónica. Allí se reconocen 2 subespecies aunque datos morfológicos aportados más recientemente apoyan la cohesión en una única unidad. Un muestreo detallado de dicha área podría revelar más unidades intraespecíficas divergentes. Además hay un vacío en la información sobre esta especie para poblaciones localizadas en las Guayanas y Suriname.

Por último sería interesante profundizar en los factores históricos y ecológicos que han conducido a la resolución de estos linajes empleando marcadores nucleares. De esa forma obtendríamos un panorama más completo de la historia demográfica, a través de la diversidad genética y el flujo génico entre poblaciones que nos indiquen como incide en ellos la fragmentación del hábitat. En este sentido el patrón evidenciado a través del ADN mitocondrial muestra solamente la evolución de la historia matrilineal lo cual no es suficiente para descartar posibles sesgos debido a una migración diferencial entre hembras y machos o eventos de introgresión. Utilizar marcadores moleculares adicionales no ligados, también permitiría corroborar las ESU identificadas, considerando la diversidad genética en dos dimensiones, una en relación con la variación adaptativa y la otra vinculada a la divergencia neutral causada por el aislamiento. Los dos filogrupos reconocidos hasta el momento definen dos Unidades

Evolutivamente Significativas sin embargo el análisis tanto filogenético como poblacional con ADN mitocondrial no reveló una resolución de las relaciones a nivel de subclados; incorporar otro tipo de marcador por ejemplo microsatélites podría revelar subestructuración dentro de los clados a partir de la cual sería posible definir Unidades de Manejo, concretamente para nuestro país, constituyendo un concepto más operativo aunque actualmente el estado de conservación de las poblaciones del “Zorro de monte” no reviste amenaza.

9. APÉNDICE I. Lista de las 63 secuencias parciales del gen *D-Loop* del ADN mitocondrial, obtenidas de Genbank y utilizados en el estudio. Se indica su procedencia y también la provincia biogeográfica correspondiente.

N° Acceso	Localidad de procedencia	Referencia	Provincia Biogeográfica
EF 106997	Brasil-Río Grande del Sur	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Pampa (n = 3)
EF 107016	Brasil-Río Grande del Sur	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107018	Brasil-Río Grande del Sur	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107009	Brasil-Santa Catarina	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Bosque de <i>Araucaria angustifolia</i> (n = 3)
EF 107010	Brasil-Santa Catarina	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107002	Brasil-Paraná	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107008	Brasil-San Pablo	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Bosque Paranaense (n = 1)
EF 107005	Brasil-Minas Gerais	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Cerrado (n = 18)
EF 107019	Brasil-Goiás	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107022	Brasil-Goiás	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107023	Brasil-Goiás	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107027	Brasil-Goiás	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107007	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107021	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107020	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107029	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107030	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107031	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF107013	Brasil-Tocantins	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 106999	Brasil-Piauí	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194187	Brasil-Piauí	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194188	Brasil-Piauí	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194189	Brasil-Piauí	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194191	Brasil-Piauí	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194192	Brasil-Piauí	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107006	Paraguay	Tchaicka <i>et al.</i> , 2006.	Chaco (n = 1)

Continuación Apéndice I.

EF 107017	Brasil-Ceará	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107026	Brasil-Ceará	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107025	Brasil-Ceará	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107028	Brasil-Ceará	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107015	Brasil-Paraíba	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF106998	Brasil-Pernambuco	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194176	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194177	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194178	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194179	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194180	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194181	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194182	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194183	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194184	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	Caatinga (n = 29)
EF 194185	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194186	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194190	Brasil-Pernambuco	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194193	Brasil-Alagoas	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194194	Brasil-Alagoas	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107014	Brasil-Bahía	Tchaicka <i>et al.</i> , 2006.	
EF 194168	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194169	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194170	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194171	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194172	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194173	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194174	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	
EF 194175	Brasil-Bahía	Carnieli <i>et al.</i> , 2007.	

Continuación Apéndice I.

EF 107000	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107001	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107003	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107004	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Pará
EF 107011	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	(n = 7)
EF 107000	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	
EF 107012	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	

10. APÉNDICE II. Lista de las 8 secuencias parciales de *Citocromo b*, obtenidas de Genbank y utilizados en el estudio. Se indica su procedencia y también la provincia biogeográfica correspondiente.

N° Acceso	Localidad de procedencia	Referencia	Provincia Biogeográfica
EF 106989	Brasil-Río Grande del Sur	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Pampa
EF 106990	Brasil-Paraná	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Bosque de <i>A. angustifolia</i> (n = 1)
EF 106994	Brasil-Mato Grosso	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Cerrado (n = 1)
EF 106992	Brasil-Maranhao	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Pará (n = 1)
EF 106991	Brasil-Ceará	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Caatinga (n = 1)
EF 106993	Brasil-Pernambuco	Tchaicka <i>et al.</i> , 2007.	Caatinga (n = 1)
AF 028145	Brasil-Sureste	Wayne <i>et al.</i> , 1997.	(n = 1)

11. APÉNDICE III. Secuencias de los 7 haplotipos nuevos (347pb.) hallados para el marcador *Citocromo b*.

#Cb6

1

TAGCTAAAATTGTTAACAACCTCATTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATGA
AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCTA
TGCACTATACATCGGACACAGCCACAGCCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATGTCAA
TTACGGCTGAATTATCCGCTACATACATGCAAATGGTGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
TACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAG
TCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

#Cb7

1

TAGCTAAAATTGTTAACAACCTCATTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATGA
AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCTA
TGCACTATACATCGGACACAGCCACAGCCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATGTTAA
TTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCAAATGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
TACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGGTCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAG
TCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

#Cb8

1

TATCNANAATGGCTAGCANCTNATTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATG
AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCT
ATGCACTATACATCGGACACAGCCACAGCCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATGTTA
ATTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCAAATGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
ATACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGA
GTCGTACTATTATTCGCAACTATAGCT

#Cb9

1

TAGCTAAAATTGTTAACAACCTCATTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATGA
AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCTA
TGCACTATACATCGGACACAGCCACAGTCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATGTTAA
TTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCAAACGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
TACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAG
TCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

#Cb10

1

NNGCTACCTTGTTAACTCACTTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATGA
 AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCTA
 TGCACTATACATCGGACACAGCCACAGCCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATGTTAA
 TTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCAAATGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
 TACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAG
 TCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

#Cb11

1

TAGCTAAAATTGTTAACTCACTTTATTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGATGA
 AACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTGCAACAGGTTTATTCTTAGCTA
 TGCACTATACATCGGACACAGCCACAGTCTTTTCATCAGTCGCTCACATCTGCCGAGATGTTAA
 TTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCAAATGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTGTTCA
 TACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTGGAG
 TCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

#Cb12

1

NNNNNNCTCCCGNTNNCNACTCACTTTNTTGACCTCCCAACACCATCTAATATTTCCGCTTGAT
 GAACTTCGGATCCTTGCTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGANNGCGGGGGGNTATTCTTA
 GCTATGCACTATACATCGGACACAGCCACAGCCTTTTCATCAGTCACTCACATCTGCCGAGATG
 TTAATTATGGCTGAATCATTGCTACATACATGCNAATGGCGCCTCCATATTCTTTATCTGTCTG
 TTCATACATGTAGGACGAGGTCTGTACTATGGATCATATGTATTCATAGAAACATGAAATATTG
 GAGTCGTACTATTATTCGCAACTATAGCC

12. APÉNDICE IV. Secuencias de los 5 haplotipos nuevos (313pb.) hallados para el marcador *D-Loop*.

#DL45

1

CCCTGAAGTAGGANC-

AGATGCCAGGTATAGTTCCATGATAGAAACCCCCCGTTAACATGGGCCCCGGAGCGAGAAGA
GGAGCATTACGAGCAAGGATTGATGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAATCCCTTATTGGACTA
AGTGATATGCATTCACTACTGTCCTGAGTTAAGGTATAGTTAGAGTTGAACTAGTATGTCCTAT
GTAATAATATAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGGCAAGCCATTAATGCACGACGTAC
ATAGGGG-AGGGGTTTTGGAAGTACTGACATAGCACAGGAGGGCT

#DL46

1

CCCTTAAGTAGGAACCAGATTCCAGGTATAGTTCCATGATAGAAACCCCCACGTTAACATGGG
CCCGGAGCGAGAAGAGGAGCATTACGAGCAAGGATTGATGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTA
ATCCCTTATTGGACTAAGTGATATGCATTCACTACTGTCCTAAGTTAGGGTATAGTTAGAGTTG
AACTAGTATGTCCTATGTAATAATATAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGGCAAGCCAT
TAATGCACGACGTACATAGGGG-AGGGGTTTTGGAAGTACTGACATAGCACAGGAGGGCT

#DL47

1

CAGATGCCAGGTATAGTTCCATGATAGAAACCCCCACGTTAACATGGGCCCCGGAGCGAGAAG
AGGAGCATTACGAGCAAGGATTGATGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAATCCCTTATTGGACT
AAGTGATGTGCATTCACTACTGTCCTGAGTTAGGGTATAGTTAGAGTTGAACTAGTATGTCCTA
TGTAATAATATAATATTATGTACATGCTTATNTGCATGGGGCAAACCATTAATGCACGACGTAC
ATAGGGG-AGGGGTTTTGGAAGTACTGACATAGCACAGGAGGGCN

#DL48

1

-----GG-

ACCAGATGCCAGGTATAGTTCCATGATAGAAACCCCCACGTTGACATGGGCCCCGGAGCGAGA
AGAGGAGCATTACGAGCAAGGATTGATGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAATCCCTTATTGGA
CTAAGTGATATGCATTCACTACTGTCCTGAGTTAGGGTATAGTTAGAGTTGAACTAGTATGTCC
TATGTAATAATATAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGGCAAGCCACTAATGCACGACGT
ACATAGGGGAGGGG-TTTTGAAGTACTGACATAGCACAGGAGGGCT

#DL49

1

-----GG-

ACCAGATGCCAGGTATAGTTCCATGATAGAAACCCCCACATTAAACATGGGCCCCGAGCGAGA
AGAGGAGCATTACGAGCAAGGATTGATGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAATCCCTTATTGGA
CTAAGTGATATGCATTCATTACTGTCCTGGGTAGAGTATAGTTAGAGTTGGACTAGTATGTCC
TATGTAATAATATAATATCATGTACATGCTTATATGCATGGGGCAAGCCATTAATGCACGACGT
ACATAGGGGAGGGG-TTTTGGAAGTACTGACATAGCACAGGAGGGCT

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amber GF, Thomas JA, Barnes I (2011) Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing response within the carnivores to historical climatic change. *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 214.
- Araujo A, Neves W, Piló L, Atui J (2005) Holocene dryness and human occupation in Brazil during the “Archaic Gap”. *Quaternary Research*, **64**, 298-307.
- Arbogast BS, Edwards SC, Wakeley J, Beerli P, Slowinski JB (2002) Estimating divergence times from molecular data on population genetic and phylogenetic time scales. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 707–740.
- Aubry KB, Statham MJ, Sacks BN, Perrine JD, Wisely SM (2009) Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology*, **18**, 2668-2686.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Control*, **19**, 716-723.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NS (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Avice JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. (ed Springer) Chapman & Hall, New York, 511pp.
- Avice JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**, 371–379.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, 447pp.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Barros-Moraes N, Miyaki CY, Morgante JS (2007) Identifying management units in non-endangered species: the example of the sloth *Bradypus variegatus* Schinz, 1825. *Brazilian Journal of Biology*, **4**, 829-837.

- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367-369.
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, **10**, 2741-2752.
- Baker CS, Slade WR, Bannister JL (1994) Hierarchical structure of mitochondrial DNA gene flow among humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, world-wide. *Molecular Ecology*, **3**, 313-327.
- Berta A (1982) *Cerdocyon thous*. *Mammalian Species*, **186**, 1-4.
- Berta A (1984) The Pleistocene bush dog, *Speothos pacivorus* (Canidae) from the Lagoa Santa Caves, Brazil. *Journal of Mammalogy*, **65**, 549-559.
- Berta A (1987) Origin, diversification and zoogeography of the South American Canidae. *Fieldiana Zoology*, **39**, 455-471.
- Birky jr CW, Fuerst P, Maruyama T (1989) Organelle Gene Diversity Under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to nuclear Genes. *Genetics*, **121**, 613-627.
- Bowen BW (1999) Presrving genes, species, or ecosystem? Healing the factured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology*, **8**, 5-10.
- Bush MV (1994) Amazonian speciation: a necessarily complex model. *Journal of Biogeography*, **21**, 5-17.
- Cabrera A (1931) On some South American canine genera. *Journal of Mammalogy*, **12**, 54-67.
- Cabrera A, Yepes J (1940) *Historia Natural de los Mamíferos Sud-Americanos (vida, costumbres y descripción)*. Buenos Aires, pp 120 – 131. En: Compañía Argentina de Editores.
- Carnielli P jr, de Oliveira Fahll W, Galera Castilho J, de Novaes Oliveira R, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RSP, Morato RG, Spínola RO, Machado LM, de Sá U, Carrieri ML, Kotait I (2008) Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*, **131**, 33-46.

- Clutton-Brock J, Corbet GG, Hills M (1976) A review of the family Canidae, with a classification by numerical methods. *Bulletin of the British Museum of Natural History*, **29**, 119–199.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**, 71–86.
- Courtenay O, Maffei L (2008) *Cerdocyon thous*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1.
- Courtenay O, Maffei L (2004) Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). En: *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan* (eds. Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW and the IUCN/SSC Canid Specialist Group), pp. 32–38. IUCN – The World Conservation Union.
- Cowling SA, Maslin MA, Sykes MT (2001) Paleovegetation simulations of lowland Amazonia and implications for Neotropical allopatry and speciation. *Quaternary Research*, **55**, 140–149.
- Cracraft J (1988) Deep-history biogeography: retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Systematic Zoology*, **37**, 221–236.
- Cracraft J, Prum RO (1988) Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution*, **42**, 603–620.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne R (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*, **15**, 290–295.
- Cravino JL, Calvar ML, Poetti JC, Berrutti MA, Fontantna NA, Brando MF, Fernández JA (2000) Análisis holístico de la predación en Corderos: Un estudio de caso con énfasis en la acción de “zorros” (Mammalia: Canidae). *Veterinaria*, **35**, 24–41.
- Crawford MH (1973) The use of genetic markers of the blood in the study of the evolution of human populations. En: *Methods and Theories of Antropological Genetics*. (eds. Crawford MH, Workman PL), pp. 19–38. University of New Mexico Press, Albuquerque.
- De Arruda Bueno A, Motta-Junior JC (2004) Hábitos alimentarios de dos cánidos sintópicos, el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) y el zorro de monte

- (*Cerdocyon thous*), en el sudeste de Brasil. *Revista Chilena de Historia Natural*, **77**, 5-24.
- de Vivo M, Carmignotto AP (2004) Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography* **31**: 943–957.
- Di Bitteti MS, Di Blanco YE, Pereira JA, Paviolo A, Jiménez Pérez I (2009) Time partitioning favors the coexistence of sympatric Crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and Pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*). *Journal of Mammalogy*, **90**, 479-490.
- Ditchfield AD (2000) The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*, **9**, 1307–1318.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W (2002) *Genetics*, **161**, 1307-1320.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B Pybus OG (2005) Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 185-192.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) *PLoS Biology*, **4**, 88.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Drummond AJ & Suchard MA (2010) *BMC Biology* **8**, 114.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–2581.
- Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguar (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, **10**, 65–79.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2006) Arlequín ver. 3.1 *User manual. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*.
- Excoffier, L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.

- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. *Evolution*, **35**, 1229-1242.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783–791.
- Fitch WM (1971) Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology, *Systematic Zoology*, **20**, 406-416
- Forster P, Torroni A, Renfrew C, Röhl A (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **18**, 1864-1881.
- Fu Y-X (1997) Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Funes MC, Novaro AJ, Monsalvo B, Pailacura O, Sánchez Aldao G, Pessino M, Dosio R, Chehébar C, Ramilo E, Bellati J, Puig S, Videla F, Oporto N, González del Solar R, Castillo E, García E, Loekemeyer N, Bugnest F, Mateazzi G (2006) El manejo de zorros en la Argentina. En: Sitio argentino de producción animal: <http://www.produccionbovina.com/fauna/00-fauna.htm>
- Garrido G, Arribas A (2008) Generalidades sobre los carnívoros del Villafranquiense superior en relación con el registro fósil de Fonelas P-1. En: Cuadernos del Museo Geominero N° 10. Instituto Geológico y Minero, pp 85-146. Madrid, España.
- Gibbard P & van Kolfschoten T (2004) The Pleistocene and Holocene Epochs. En: *A Geologic Time Scale*, **22**, 441-452. Gradstein, F. M., Ogg, James G., and Smith, A. Gilbert (eds) Cambridge University Press, Cambridge.
- Graphodatsky AS, Perelman PL, Sokolovskaya NV, Bekelemisheva VR, Serdukova NA, Dobigny G, O'Brien SJ, Ferguson-Smith MA (2008) Phylogenomics of the dog and fox family (Canidae, Carnivora) revealed by chromosome painting. *Chromosome Research*, **16**, 129-143.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**, 3969–3982.

- Glor RE, Vitt LJ, Larson A (2001) A molecular phylogenetic analysis of diversification in Amazonian Anolis lizards. *Molecular Ecology*, **10**, 2661–2668.
- Griffiths, RC and Tavaré S (1997) Computational methods for the coalescent. En: *Progress in Populations Genetics and Human Evolution* (eds. Donnelly P, Tavaré S). *IMA Volumes in Mathematics and its Applications*, **87**, 165-182. Springer-Verlag, Berlin.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**, 131–137.
- Haffer J (1974) Avian speciation in tropical South America. *Publ. Nuttall Ornith. Club*, **14**, 390 pp.
- Haffer J (1979) Quaternary biogeography of tropical lowland South America, en *The South American herpetofauna. En: Its origin, evolution and dispersal* (ed. Duellman), pp 107-140. Monograph num. 7 of the Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas WE.
- Haffer, J (1997) Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 451–476.
- Haig SM (1998) Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*, **79**, 423-435.
- Hammer Ø, Harper, DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**. 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hartl DL (2000) *A Primer of Population Genetics*. Sunderland, Massachusetts: 3ed. Sinauer Associates, 221pp.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160–174.
- Hatanaka T, Tambasco A, Galetti jr PM (1998) Heterochromatin heterogeneity and chromosome heteromorphism in *Cerdocyon thous* (Mammalia, Canidae). *Genetics Molecular Biology*, **21**, 227-231.
- Hewitt G (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247–276.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.

- Ho YW & Shapiro B (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic distory from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 423-434.
- Irwin DM (2002) Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution*, **56**, 2383–2394.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the *cytochrome b* gene of mammals, *Journal of Molecular Evolution*, **32**, 128–144.
- Jesus FF, Wilkins JF, Solferini VN, Wakeley J (2006) Expected coalescence times and segregating sites in a model of glacial cycles. *Genetics Molecular Research*, **5**, 466-474.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Kimura M, Otha T (1969) The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics*, **71**, 763-771.
- Kingman JFC (1980) Mathematics of Genetic Diversity. *Regional Conference Series in Applied Mathematics*, **34**. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, 70pp.
- Kocher TD, Thomas WK, Edwards (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 6196 – 6200.
- Koopman ME, Cypher BL, Scrivner JH (2000) Dispersal patterns of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*) *Journal of Mammalogy*, **81**, 213–222.
- Kuchta SNR, Meyer D (2001) A genealogical view of geographical variation. *Molecular Ecology*, **10**, 2569-2576.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (1993) *MEGA, Version 1.1*. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Lambeck K, Tezer ME, & Potter E-K (2002) Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature*, **419**,199-206.
- Langguth A (1970) Una nueva clasificación de los cánidos sudamericanos. *Actas del IV Congreso Latinoamericano de Zoología*, **1**, 129–143.

- Langguth A (1979) Ecology and evolution in the South American canids. En: *The wild canids their sustematics, behavioural ecology and evolution*. (ed. Fox MW), pp. 192-206. New York, NY: Van Nostrand Reinhold.
- Lanteri AA, Confaloneri VA (2003) Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. (eds. Llorente Bousquets J, Morrone JJ), pp. 185-193. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Lessa EP, Cook JA, Patton JL (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100**, 10331–10334.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Macdonald DW, Courtenay O (1996) Enduring social relationships in a population of crab eating fox, *Cerdocyon thous*, in Amazonian Brazil. *Journal of Zoology London*, **239**, 329–355.
- Machado F, Hingst Zaher E (2009) Investigating South American biogeographic history using patterns of skull shape variation on *Cerdocyon thous* (Mammalia: Canidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**, 77-84.
- Maffei L, Taber AB (2003) Área de acción, actividad y uso de hábitat del zorro patas negras, *Cerdocyon thous*, en un bosque seco. *Mastozoología Neotropical*, **10**, 154-160.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- Mantel N, Valand RS (1970) A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*, **26**, 547-558.
- Márquez A, Maldonado JE, González S, Beccaceci MD, García JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demografich history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservaton Genetics*, **7**, 563-575.
- Martins FM, Ditchfield D, Meyer D, Morgante JS (2007) Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked popultaion structure in the common vampire

- bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of Zoological Systematics & Evolution Research*, **45**, 372-378.
- Martínez Guerrero Y, Cadena A (2000) Caracterización, evaluación y uso de hábitat del zorro perruno (*Cerdocyon thous*) en los llanos orientales de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, **24**, 383-391.
- Medrano JF, Aasen E, Sharrow L (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, **8**, 43.
- Mercure A, Ralls K, Koepfli RK, Wayne RK (1993) Genetic Subdivisions among Small Canids: Mitochondrial DNA Differentiation of Swift, Kit, and Arctic Foxes. *Evolution*, **47**, 1313-1328.
- Meserve PL (2007) Zoogeography of South America. En: *Physical geography of South America* (ed. Orme A), **8**, 112-132. Oxford University Press, Oxford, England.
- Moore WS (1995) Inferring Phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, **49**, 718-726.
- Moritz C (1994) Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Tree*, **9**, 373-375.
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B biological Sciences*, **349**, 113-118.
- Moritz C, Faith D (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, **7**, 419-429.
- Morrone JJ (2001) *Biogeografía de América Latina y el Caribe, Vol. 3*. En: Manuales & Tesis SEA Zaragoza, Spain, 148pp.
- Morrone JJ (2004) Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomología*, **48**, 149-162
- Morrone JJ (2005) Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annu. Rev. Entomol*, **51**, 467-494.
- Motta-Junior JC, Lombardi JA, Talamoni SA (1994) Notes on crab-eating fox (*Dusicyon thous*) seed dispersal and food habits in southeastern Brazil. *Mammalia*, **58**, 156-159.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333pp.
- Nores M (1999) An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, **26**, 475–485.
- Nores M (2004) The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, **13**, 149–161.
- Nowak RM (1999) *Walker's Mammals of the World* (ed Johns Hopkins) University Press, New York, 1936pp.
- Ortega J, Franco M, Adams B, Ralls K, Maldonado J (2004). A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics*, **5**, 715-718.
- Pedó E, Tomazzoni AC, Hartz SM, Christoff AU (2006) Diet of crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnivora, Canidae), in a suburban area of southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **23**, 637–641.
- Polzin T, Daneschmand SV (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, **31**, 12-20.
- Posada D, Crandall KA (2001) Intraespecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37-45.
- Quijadas-Macareñas A, Ferguson JE, Pook CE, Salomão MG Thorpe, Wüster W (2007) Phylogeography patterns of trans-Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus complex*) as an example. *Journal of Biogeography*, **34**, 1296-1312.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092–2100.
- Rocha VJ, dos Reis NR, Sekiama ML (2004) Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae), em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**, 871-876.
- Rodríguez Mazzini R, Molina Espinosa B, (2000) El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma. *Serie, documentos de trabajo- N°*

30. *Programa de Conservación de la Biodiversidad y Desarrollo Sustentable en los Humedales del Este*, 28pp.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552–569.
- Rull V (2006) Quaternary speciation in the Neotropics. *Molecular Ecology*, **15**, 4257–4259.
- Rutledge LY, Brent RP, Bradley NW (2010) Analysis of *Canis* mitochondrial DNA demonstrates high concordance between the control region and ATPase genes, *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 215.
- Sacks BN, Statham MJ, Perrine JD, Wisley SM, Aubry KB (2010) North American montane red foxes: expansion, fragmentation, and the origin of the Sacramento Valley red fox. *Conservation Genetics*, **11**, 1523-1539.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 1079–1089.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: A software for population genetic data. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 145 pp.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Shapiro B, Drummond A, Rambaut A, Wilson M, Matheus P, Sher A, Pybus O, Thomas M, Gilbert P, Barnes I, Binladen J, Willerslev E, Hansen A, Bryshnikov G, Burns J, Davydov S, Driver J, Froese D, Harington C, Keddie G, Kosintsev P, Kunz M, Martin L, Stephenson R, Storer J, Tedford R, Zimov S, Cooper A (2004). *Science*, **306**, 1561-1565.
- Sillero-Zubiri C, Macdonald DW (2004) Introduction. En: *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs: status survey and conservation action plan*. (eds. Macdonald DW, Sillero-Zubiri C, Hoffmann M), pp. 2-7. IUCN Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK

- Sillero-Zubiri C, Switzer D (2004) Management of wild canids in human-dominated landscape. En: *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. 2ª Edición.* (eds Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW), pp. 257-266. IUCN Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Simpson BB, Haffer J (1978) Speciation patterns in the Amazonian forest biota. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **9**, 497-518.
- Sites JW, Crandall KA (1997) Testing Species Boundaries in Biodiversity Studies. *Conservation Biology*, **11**, 1289-1297.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787-792
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Sousa R, Teixeira M jr, Cassimiro J, Camacho A, Trefaut M (2010) A new species of *Dendrophryniscus* (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brasil. *Zootaxa*, pp. 36-44.
- Strimmer K, Pybus OG (2001) Exploring the Demographic History of DNA Sequences Using the Generalized Skyline Plot. *Molecular Ecology*, **12**, 2298-2305.
- Taberlet P (1998) Biodiversity at the intraspecific level: The comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology*, **64**, 91-100.
- Tajima F (1983) Measurement of DNA polymorphism En: *Mechanism of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology* (eds. Takahata N, Clark AG), pp. 37-59. Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates Inc, Sunderland MA.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- 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* (submitted).

- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 678-687.
- Tchaicka L, Eizirik E, Oliveira TG, Cândido JF Jr, Freitas TRO. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, **16**, 819–838.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Udvardy MDF (1975) A classification of the biogeographical provinces of the world. En: *IUCN Occasional Paper N° 18 International Union for Conservation of Nature and Natural Resources Morges, Switzerland*, 50pp.
- Vallianatos M, Loughheed SC, Boag PT (2001) Phylogeography and genetic characteristics of a putative secondary-contact zone of the loggerhead shrike in central and eastern North America. *Canadian Journal of Zoology*, **79**, 2221-2227.
- Vázquez E Filogeografía y vertebrados (2007) En: *Ecología Molecular* (eds Eguiarte L, Souza V, Aguirre X), **14**, 441-461. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales instituto Nacional de Ecología UNAM. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Wang X, Tedford RH, Van Valkenburgh TB, Wayne RK (2004) Phylogeny, classification, and evolutionary ecology of the canidae. En: *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan* (ed. por Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW and the IUCN/SSC Canid Specialist Group), pp. 32–38. IUCN – The World Conservation Union.
- Wayne RK, O'Brien SJ (1987) Allozyme divergence within the canidae. *Systematic Zoology*, **36**, 339-355.
- Wayne RK, Valkenburgh BV, Kat PW, Fuller TK, Johnson WE, O'Brien, SJ (1989) Genetic and morphological divergence among sympatric canids. *Journal of Heredity*, **80**, 447- 454.

- Wayne RK (1993) Molecular evolution of the dog family. *Elsevier Science Publication*, **6**, 218-224.
- Wayne RK, Geffen E, Girman DJ, Koepfli KP, Lau LM, Marshall CR (1997) Molecular systematics of the Canidae. *Systematic Biology*, **46**, 622–653.
- Webb SD (1978) A history of savanna vertebrates in the New World. Part II: South América and the Great Interchange. *Ecology Systematic*, **9**, 393-426.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Xin-Fu Y (1997) Statistical Test of Neutrality of Mutations Against population Grown, Hitchiking and Background Slection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Zink RM (2004) The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *The Royal Society of London*, **271**, 561-564.