

**Utilización de microsatélites para el estudio de  
poblaciones silvestres de zorro de monte  
(*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766)**

**Daniel Lassevich**

Licenciatura en Ciencias Biológicas, Profundización en Ecología  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Departamento de Biodiversidad y Genética  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tutora: Dra. Mariana Cosse

Montevideo, Uruguay

**2014**

# ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Hipótesis y Objetivos.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Resultados.....	20
Discusión.....	28
Conclusiones finales.....	32
Bibliografía.....	33
Anexos.....	38

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda la gente que quiero mucho, familia, novia, amigos, perro, por siempre acompañarme y hacerme el aguante.

A la tutora y a cada uno de los integrantes del laboratorio del IIBCE por ser tan amables y ayudarme a aprender e integrarme al laboratorio.

A la ANII por otorgarme la beca de iniciación a la investigación.

## RESUMEN

El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) habita en el territorio uruguayo, siendo una especie generalista de amplia distribución en nuestro país. Las técnicas de genética son una herramienta muy útil para realizar estudios poblacionales. Dentro de estas herramientas moleculares, los microsatélites son secuencias de ADN repetidas en tándem que por ser hipervariables permiten responder preguntas a nivel ecológico. Sin embargo, las regiones que flanquean estas secuencias se mantienen conservadas en especies filogenéticamente relacionadas, es así que se pueden ajustar las condiciones para amplificar en reacciones de PCR, muestras de zorro utilizando cebadores diseñados para perro doméstico.

Los objetivos de este trabajo son: establecer las condiciones para la amplificación en PCR de multiplex de microsatélites en muestras de zorro utilizando cebadores diseñados para perro doméstico, encontrar un set de microsatélites suficientemente polimórfico para realizar estudios poblacionales en *Cerdocyon thous*, y analizar un conjunto de muestras de zorro de monte tomadas del territorio uruguayo.

Se caracterizó un set de 8 microsatélites suficientemente polimórfico para realizar análisis poblacionales. El contenido de información polimórfica fue alto ( $PIC=0,75$ ) y los valores de probabilidad de no exclusión resultaron aceptables para realizar estudios de parentesco y de identificación individual ( $NE-1P=0,007$ ;  $NE-2P=0,00034$ ;  $NE-PP=1 \times 10^{-6}$ ;  $P_{(ID)}=2,4 \times 10^{-10}$ ).

Se analizó un conjunto de 36 muestras con este set, resultando estar el conjunto en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se analizó si existía algún grado de estructuración poblacional, concluyendo que el conjunto forma parte de una sola población. Existe un pequeño grado de endogamia ( $Fis=0,123$ ). Se calculó el número efectivo poblacional, estimado en 715 individuos activamente reproductivos.

Se concluyó que el set de microsatélites es adecuado para realizar estudios poblacionales en zorro de monte, pero se recomienda aumentar el número de muestras para obtener resultados más ajustados a la realidad de esta especie en nuestro país.

# INTRODUCCIÓN

## Situación actual de la biodiversidad

Uno de los principales desafíos globales que debe afrontar el hombre moderno, es la colosal pérdida de biodiversidad que está afectando el planeta (Brazeiro *et al.* 2008). Esta pérdida tiene como consecuencia un descenso de los beneficios que los ecosistemas brindan a los seres humanos (servicios ecosistémicos), como por ejemplo: regulación del clima, fertilidad del suelo y ciclos biogeoquímicos (Benayas *et al.* 2009). Es por esto que es importante tomar medidas para la conservación de las áreas naturales, estableciendo planes de manejo de fauna y flora así como la implementación de áreas protegidas (Lee & Jetz 2008). Uruguay no queda exento de esta situación y cada vez más sufre la alteración y pérdida de hábitats naturales y biodiversidad (Brazeiro *et al.* 2008).

Dados los recursos limitantes para la conservación, es crucial identificar áreas prioritarias para su protección, así como también analizar la conectividad funcional del territorio total. Para esto es importante conocer la historia de vida y los hábitos, así como también realizar el estudio de la estructura poblacional de especies con una amplia distribución en nuestro país (Caro *et al.* 2004).

## Aportes de la ecología molecular

En las últimas décadas se ha desarrollado una nueva disciplina que une la ecología con la genética, llamada ecología molecular, la cual responde a las preguntas de la ecología mediante el uso de métodos moleculares (DeYoung & Honeycutt 2005).

La información genética constituye una fuerte herramienta para la ecología y el manejo de vida salvaje, especialmente si se la combina con la etología y biogeografía. Se pueden definir unidades de manejo, identificar individuos, sexo, especie, incluso analizar patrones demográficos asociados a la expansión o reducción de poblaciones. La ecología molecular en asociación a métodos de muestreo no invasivo es muy eficiente para el estudio de aspectos eco-etológicos en animales elusivos, nocturnos y en baja densidad poblacional. Esta herramienta permite también la observación de patrones de hibridación entre especies, flujo génico, sistemas de apareamiento, tamaño efectivo de una población, y viabilidad poblacional (DeYoung & Honeycutt 2005).

## Microsatélites

Un poderoso marcador molecular para responder a las preguntas de la ecología son los microsatélites. Éstos son secuencias de ADN repetidas en tándem de 2 a 6 pares de bases de largo, siendo muy abundantes en los genomas de diversos taxones (Zane *et al.* 2002). Esta herramienta brinda la posibilidad de utilizar ADN extraído por métodos no invasivos como fecas y pelo (Taberlet *et al.* 1999). Su relativa neutralidad ante la selección natural y su alta tasa de mutación, junto con los altos niveles de variabilidad que presentan, permiten responder preguntas a una escala (ecológica) temporal más fina que otros marcadores moleculares (Maudet *et al.* 2002).

Los loci de microsatélites son fácilmente tipificables por PCR, aunque para la mayoría de las especies no se han desarrollado cebadores para amplificar los microsatélites (Zane *et al.* 2002). Una alternativa a este problema es utilizar cebadores diseñados para especies filogenéticamente relacionadas. La amplificación cruzada de microsatélites se puede realizar debido a la existencia de regiones conservadas, que flanquean la región hipervariable, sobre las cuales se diseñan los cebadores (Cosse *et al.* 2007; Galan *et al.* 2003; Mannise *et al.* 2011; Maudet *et al.* 2002). De esta forma es posible caracterizar un set de microsatélites para una especie, a partir de cebadores desarrollados para estudios de microsatélites en otra especie filogenéticamente relacionada, para luego realizar análisis ecológicos de poblaciones.

Es importante que la cantidad de loci utilizados para el análisis no sea ni muy baja (puesto que carece de poder informativo suficiente) ni muy alta (puesto que aumentaría el error de los resultados). Se busca encontrar el mínimo número de microsatélites que permitan resolver con buena confiabilidad las preguntas que se busca responder acerca de una población.

Antes de hacer estudios de ecología molecular que permitan proponer unidades de conservación y pautas para el ordenamiento territorial, es necesario determinar una metodología para el análisis genético de las especies.

## Zorro de monte (*Cerdocyon thous*)

En este trabajo se busca caracterizar un set de microsátélites y las condiciones para su amplificación, que permita estudiar una especie en particular, *Cerdocyon thous*, también conocido como zorro de monte, zorro perro, zorro cangrejero, zorro de patas negras, zorro sabanero, cachorro do mato, aguará-í.

Este cánido de estatura mediana, que pesa entre 4-7kg, puede ser reconocido por tener el lomo marrón negruzco, los flancos gris-marrón, la cara y la parte lateral de las patas rojizas, y el cuello y el abdomen gris blancuzco. Las puntas de las orejas, la parte posterior de las patas y la región entre las mandíbulas son negras (Berta 1982), (Figura 1).



Figura 1: Ejemplar de Zorro de monte donde se puede apreciar características morfológicas de la especie y coloración.

Tiene la distribución más amplia entre los zorros de Sudamérica (Bueno & Motta-Junior 2004), que abarca el norte y este de Sudamérica (Juarez *et al.* 2002), se encuentra presente en el territorio uruguayo (Figura 2). Se lo asocia con ambientes muy variados, se lo considera una especie de hábitos generalistas (Goulart *et al.* 2009). Entre los ambientes que habita se encuentra la pradera, la sabana, el bosque lluvioso, el chaco, y el cerrado (Emmons & Feer 1999).



Figura 2: Mapa del continente Sudamericano donde se marca el rango de distribución de *Cerdocyon thous*. Tomado de Wikipedia.

El zorro de monte puede vivir en pequeños grupos de 2 a 6 individuos, con densidades estimadas de 1 individuo por km<sup>2</sup> en regiones secas (MacDonald & Courtenay 1996), hasta 6 individuos por km<sup>2</sup> en ecosistemas húmedos (Eisenberg *et al.* 1979). Su ámbito hogar puede variar entre 200 a 600ha. Son territoriales (Medel 1988; Juárez *et al.* 2002), se considera que puede ocurrir solapamiento entre individuos en un 10% de su área de acción (Maffei & Taber 2003).

Son animales monógamos, es decir que se mantienen con la misma pareja, hasta la muerte de alguno de los dos. Se estructuran en unidades sociales de un par monógamo asociado a sus crías (Cabrera 2007; Moehlman 1986). Se los puede observar en parejas o solos, pero en el segundo caso siempre la pareja se encuentra a una distancia cercana (MacDonald & Courtenay 1996).



Figura 3: Pareja de zorros de monte.

Se reproducen una vez al año, y la lactancia dura tres meses aproximadamente, luego los cachorros se mantienen cercanos a sus padres por lo menos durante 3 meses más, para luego ir a buscar pareja y ocupar un territorio cercano al de los parentales (MacDonald & Courtenay 1996).

Su período de actividad es principalmente nocturno, sale a cazar al caer la noche hasta la mañana (Maffei & Taber 2003).

En lo que respecta a su dieta, es omnívoro y generalista. Se adapta fácilmente a las características del ambiente. Puede alimentarse de pequeños mamíferos, aves, reptiles, insectos, y frutos. En épocas secas consume mucho más insectos, y en épocas húmedas, frutas (Bueno & Motta-Junior 2004). Es por esto que es considerado un gran dispersor de semillas, puesto que no tiene adaptaciones especiales para digerir las semillas, éstas pasan por el tracto digestivo y son expulsadas intactas (Juarez *et al.* 2002). Otro estudio realizado en la Reserva de Biósfera Bañados del Este, sugiere que los zorros dispersan las semillas de las palmeras butiá (*Butia capitata*) y pindó (*Syagrus romanzoffiana*) en promedio 1km (Alonzo-Paz *et al.* 1995; Rodríguez-Mazzini & Molina 2000).

El zorro de monte es probablemente el depredador más abundante en muchos de los ecosistemas terrestres del Uruguay, su presencia indica la presencia de sus presas

como son ratones, aves, reptiles, anfibios e insectos (Alonzo-Paz *et al.* 1995). Estas características determinan que el zorro de monte juegue un rol ecológico importantísimo, tanto como regulador de las comunidades vegetales, así como de poblaciones de micro mamíferos.

La determinación de una metodología para el análisis de microsatélites de la o las poblaciones de *Cerdocyon thous* en Uruguay, es clave para poder trabajar con esta especie en nuestro país. En este trabajo se pretende encontrar un set de microsatélites adecuado para estudiar esta especie y también realizar un primer acercamiento al estado genético de *C.thous* en Uruguay.

Los estudios de ecología molecular de las diferentes especies de animales y de plantas proveen de una importante información para analizar el estado de conectividad funcional de los paisajes, lo que permite proponer unidades de conservación y pautas para el ordenamiento territorial, que resultan en un aporte para la preservación del medio ambiente y los servicios ambientales que la naturaleza brinda y que son imprescindibles para los seres humanos

## HIPÓTESIS

- 1) Los cebadores de microsatélites desarrollados para perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) amplifican productos heterólogos en *Cerdocyon thous*.
- 2) El set de microsatélites seleccionado es suficientemente polimórfico para realizar análisis de ecología molecular en zorros del Uruguay.
- 3) Existe estructuración genética en la población de *C.thous* uruguaya.

## OBJETIVOS

- 1) Amplificar microsatélites en muestras de *Cerdocyon thous* a partir de cebadores diseñados para perro doméstico.
- 2) Establecer las condiciones de PCR en multiplex.
- 3) Encontrar un set de microsatélites suficientemente polimórfico para realizar estudios poblacionales en zorros del Uruguay.
- 4) Análisis de un conjunto de muestras de zorro de monte tomadas en el territorio Uruguayo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de ADN tanto de tejidos como de fecas del banco de ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE).

Se realizaron extracciones de ADN de tejidos y pelos, siguiendo el protocolo de Medrano (1990) con modificaciones (González *et al.* 1998; Mannise *et al.* 2012) (Anexo 1). Luego se realizaron diluciones para lograr obtener una concentración cercana a 50 ng/ $\mu$ L de ADN de cada muestra.

### Selección de loci

Se utilizaron cebadores desarrollados para especies de perro doméstico, que hubieran sido utilizados con éxito en zorro de monte (Da Fontoura-Rodrigues *et al.* 2008) y Aguará guazú (Mannise *et al.* 2012) (Tabla 1). Los cebadores *forward* estaban marcados con fluorescencia. Fueron testeados en 5 muestras de zorro de monte, pertenecientes a diferentes poblaciones, en reacciones simples de un locus por PCR.

Tabla 1: Listado de los cebadores testeados en este trabajo, se detalla el nombre del locus, la secuencia, el motivo repetido, el tamaño esperado en pares de bases (pb), el tipo de fluorocromo y la temperatura de anidamiento del cebador (Ta).

Locus	Secuencia del cebador	Motivo de Repetidos	Tamaño esperado en pb	Fluorocromo	Ta (°C)
AHTK253	F 5'- CTCAAAGGCGTTCTTTCCAG- 3'	Dinucleotido	146	FAM	60
	R 5'- GCACATGGAGGACAAGCAC- 3'				
FH2001	F 5'-TCCTCCTCTTCTTTCCATTG-3'	Tetranucleotide	131	NED	58
	R 5'-TGAACAGAGTTAAGGATAGACAC-3'				
FH2004	F 5'-CTAAGTGGGGAGCCTCCTCT-3'	Tetranucleotide	237	NED	58
	R 5'-ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA-3'				
FH2010	F 5'-AAATGGAACAGTTGAGCATGC-3'	Tetranucleotide	228	FAM	59
	R 5'-CCCCTTACAGCTTCATTTTCC-3'				
FH2018	F 5'-TTGCTTJ-ACCGCTTCATTTATT-3'	Tetranucleotide	149	VIC	58
	R 5'-GAGCCTGCTTCTCCCTCTG-3'				
FH2054	F 5'-GCCTTATTCATTGCAGTTAG-3'	Tetranucleotide	151	HEX	60
	R 5'- ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC-3'				
FH2088	F 5'-CCCTCTGCCTACATCTCTGC-3'	Tetranucleotide	117	FAM	58
	R 5'-TAGGGCATGCATATAACCAGC-3'				
FH2132	F 5'-CACTGGGAGTGGAGACTG-3'	Tetranucleotide	272	VIC	60
	R 5'-TGCACAGCCAAGTAGAGGTG-3'				
FH2137	F 5'-GCAGTCCCTTATTCCAACATG-3'	Tetranucleotide	185	TET	58
	R 5'-CCCCAAGTTTTGCATCTGTT-3'				
FH2140	F 5'-GGGGAAGCCATTTTAAAG-3'	Tetranucleotide	146	FAM	58
	R 5'-TGACCCTCTGGCATCTAGG-3'				
FH2226	F 5'-GGACTACCCATTGCATTTG-3'	Tetranucleotide	205	HEX	58
	R 5'-GAATCGAGTCCCATATCGGG-3'				
FH2328	F 5'-ACCAGGTAGTTTTCAGAAATGC- 3'	Tetranucleotide	200	FAM	58
	R 5'-AGTTATGGGACTTGAGGCTG-3'				
FH2535	F 5'-GTCATTGACAGACTACAAATCTCC-3'	Tetranucleotide	145	HEX	58
	R 5'-ACAGACTTGCAGTATTTGTCTG-3'				
FH2561	F 5'-TGCTCAAGGTTGAATAAATATGC-3'	Tetranucleotide	283	TET	58
	R 5'-TTTATGGCCTGTGGGCTC-3'				
FH2848	F 5'-CAAAACCAACCCATTCACTC- 3'	Dinucleotido	237	HEX	58
	R 5'-GTCACAAGGACTTTTCTCCTG				
Pez19	F 5'-GACTCATGATGTTGTGTATC-3'	Tetranucleotido	200	FAM	58
	R 5'-TTTGCTCAGTGCTAAGTCTC-3'				
REN105L03	F 5'-GGAATCAAAGCTGGCTCTCT- 3'	Dinucleotido	251	FAM	58
	R 5'-GAGATTGCTGCCCTTTTACC- 3'				
REN169D01	F5'- AGTGGGTTTGCAGTGGAAAC- 3'	Dinucleotido	208	FAM	60
	R5'- AATAGCACATCTTCCCCACG-3'				

La reacción de PCR contenía 50 ng de ADN, 0,5 pM de cada cebador, y 5  $\mu$ L de PCR Platinum Multimix, se adicionó agua hasta completar el volumen final de 10uL. Las condiciones de termociclado fueron 95°C durante 2 minutos, luego 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos y 72°C por 50 segundos, y finalmente 60°C durante 30 minutos.

Para comprobar la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Invitrogen), utilizando TBE como buffer, teñido con Goodview, donde se corrieron 4  $\mu$ L de cada uno de los productos del PCR y 3  $\mu$ L de una escalera de 50pb de ADN como escala. El tiempo de corrida fue de 120 min. a 120 V y 60 mA. Se comparó la distancia migrada por cada banda, con la escalera de 50pb, esto a su vez se comparó con el tamaño esperado para cada locus recogido de Da Foutoura-Rodriguez *et al.* (2008) y Manisse (2013) (Figura 4).

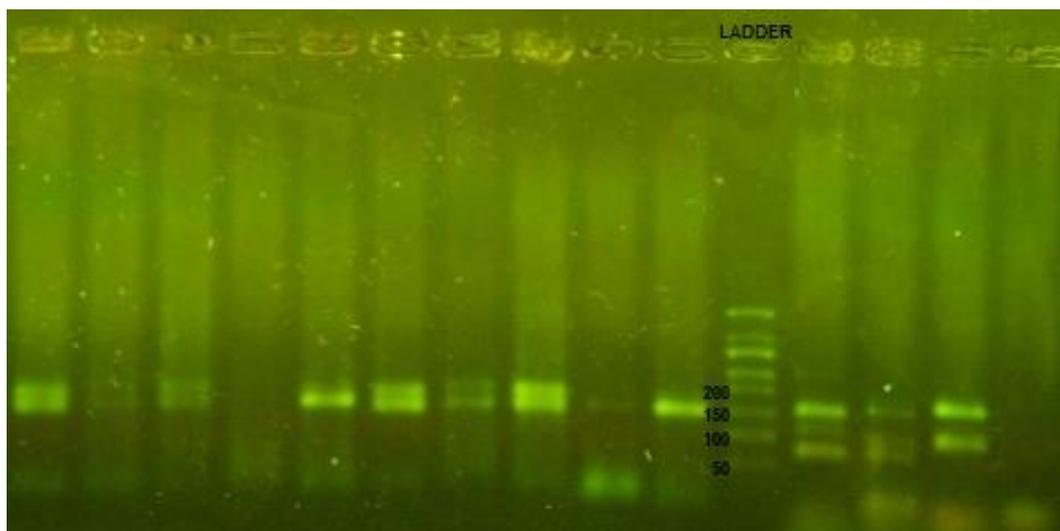


Figura 4: Ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa, donde se especifica la escalera de ADN (en pares de bases) y donde se observan las bandas de los loci amplificados. Se puede ver que los rangos de los tamaños van desde 75 pb a 250 pb.

Los productos obtenidos se enviaron al servicio de análisis de fragmentos y secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

Para analizar el tamaño de los fragmentos se utilizó el programa GeneMarkerV2.4.0®, (Figura 5).

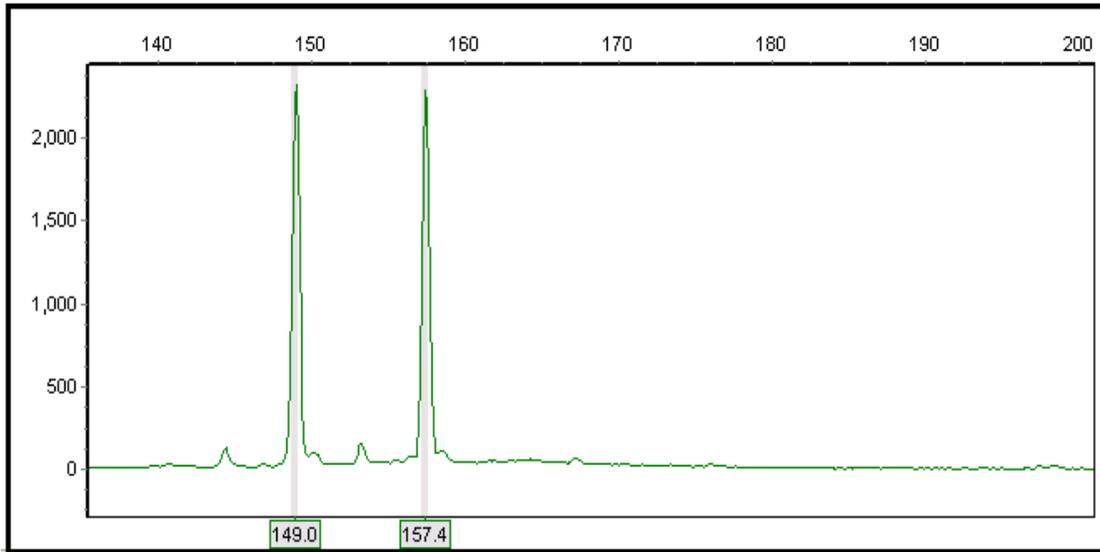


Figura 5: Imagen del programa GeneMarker. Donde se puede ver el patrón de picos de un microsatélite. En este caso el locus es heterocigota (dos alelos de 149 y 157 pares de bases).

Se observó la eficiencia de amplificación, el patrón de amplificación y el tamaño de los alelos de cada locus para cada muestra, así como también el grado de polimorfismo de cada locus. De acuerdo con estas características, se hizo un ranking de los microsatélites estudiados y se seleccionó un set de microsatélites, con los cuales se desarrollaron reacciones multiplex, que permiten amplificar varios loci en una misma reacción de PCR.

La selección de los pares de cebadores en cada multiplex se realizó teniendo en cuenta sus temperaturas de anidamiento, el tamaño promedio de los alelos de cada locus, y sus fluorocromos. De esta manera se logra una amplificación eficiente de distintos cebadores en una misma reacción y a su vez se logra una fácil discriminación de los loci en el genotipado en función de los tamaños y fluorocromos.

Para testear la eficacia de los multiplex se realizaron reacciones de PCR con 5 muestras de zorro de monte.

En la reacción de PCR de cada multiplex las condiciones fueron similares a las reacciones previas, excepto que en este caso se agregó 0,5 pM de cada uno de los cebadores del multiplex y por lo tanto menos agua para completar el volumen.

## Análisis de genética de poblaciones

Los multiplex se utilizaron para amplificar 48 muestras de ADN de *Cerdocyon thous*, las cuales se genotiparon nuevamente con el programa Genemarker®. Se seleccionaron las muestras que permitía una cobertura de las localidades de Uruguay, con la finalidad de realizar una matriz para analizar.

### Errores de genotipado

Para corregir errores de genotipado y ajustar frecuencias alélicas se utilizó el programa Microchecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Dentro de los posibles errores en la determinación de los genotipos se encuentran: la presencia de alelos nulos, el tartamudeo, y la pérdida de alelos, conocido en inglés como “allele drop-out”.

Los alelos nulos, son alelos que fallan en la amplificación por PCR a causa de una mutación en el sitio de unión con el cebador (Chapuis & Estoup 2007).

El tartamudeo, es cuando la taq polimerasa no termina de amplificar algunos fragmentos generando picos de menor tamaño, lo cual resulta en dificultades para determinar si un individuo es homo o heterocigoto para ese locus (Shinde *et al.* 2003).

Finalmente, la pérdida de alelos, significa que el alelo de mayor tamaño dentro de un locus heterocigoto no amplifica tan bien como el alelo más chico, y aparece indetectable al momento de genotipar (Wattier *et al.* 1998).

### Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los loci de este conjunto de muestras, con el objetivo de determinar su neutralidad respecto a la selección natural. Esto es una condición importante para poder analizar si la población entera está en equilibrio, lo cual también se analizó. Un apartamiento del equilibrio podría significar la existencia de algún proceso de endogamia, migración, estructuración poblacional o efectos de deriva génica. Para ello se utilizó el software Genepop (Raymond & Rousset 1995) que utiliza el método de cadenas de Markov descrito por Guo & Thompson (1992). Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989) para aquellas muestras que mostraban un leve desvío del equilibrio.

## Desequilibrio de Ligamiento

Se estimó la probabilidad de desequilibrio de ligamiento entre los loci, es decir, si habían loci que estuvieran ligados y segregaran juntos en la meiosis, lo cual se separaría del supuesto de independencia entre loci. Esto tiene como consecuencia información redundante en el análisis. Para esto se utilizó nuevamente el programa Genepop (Rousset 2009), que estima este parámetro por medio del test de chi-cuadrado.

Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples para los loci que en primera instancia del análisis aparecían como genéticamente ligados (Rice 1989).

## Contenido de información polimórfica

Se analizó el Contenido de Información Polimórfica (PIC), definido como la probabilidad de que se pueda deducir, a partir del genotipo de la descendencia, de qué parental fueron heredados cada uno de sus alelos (Botstein *et al.* 1980; Guo & Elston 1999). El polimorfismo de un marcador genético estará dado por el número y la frecuencia de alelos que presente (Cosse 2010).

También se calculó la probabilidad de no exclusión parental (NE-1P, NE-2P, NE-PP), y la probabilidad de no exclusión para la identidad ( $P_{(ID)}$ ). La probabilidad de no exclusión parental, es la probabilidad de no excluir un individuo como posible parental cuando no lo es, mientras que la probabilidad de no exclusión para la identidad, es la probabilidad de considerar como un mismo individuo a dos individuos distintos. La precisión de estos análisis se basa en el número de loci, su grado de heterocigocidad y la frecuencia de sus alelos (Cosse 2010; Kalinowski *et al.* 2007). El PIC de cada locus utilizado, así como del conjunto de loci, y la probabilidad de no exclusión parental y para la identidad, fueron estimados utilizando el programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007; Marshall *et al.* 1998).

## Estructuración poblacional

Para evaluar la existencia de estructuración poblacional en el conjunto de muestras tomadas de Uruguay, se utilizó el programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). El cual mediante el método Bayesiano estima el valor de máxima verosimilitud para  $k$  números de clústeres. Permite así estimar el grado de estructuración bajo el supuesto de que las poblaciones estudiadas están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Earl 2012).

El programa se corrió para  $k = 1$  a 8, con 8 réplicas cada corrida, burning: 10000, y ciclos de Montecarlo de las cadenas de Markov: 25000.

Se utilizó el programa Structure Harvester (Evanno *et al.* 2005), para determinar el número de clústeres presentes en el conjunto de muestras analizadas. Este programa utiliza diversos métodos para determinar el número de clústeres.

Por un lado grafica el logaritmo de la máxima verosimilitud de los datos en función del valor de  $k$ . En el cual se elige el nivel de sub-estructuración (número de clústeres  $K$ ) en función del que presenta la media del logaritmo de máxima verosimilitud mayor, junto con el menor desvío estándar (Cosse 2010).

También utiliza un método basado en la tasa de cambio de segundo orden de la función probabilística para  $k$ . Esta aproximación llamada  $\Delta k$ , puede ser calculada exclusivamente para  $k$  mayores a 1 (Manisse 2012; Evanno *et al.* 2005).

## Grado de endogamia

Se estimó el estadístico  $F_{is}$  (Beebee & Rowe 2008) para ver el grado de endogamia de la población, el cual fue obtenido con el programa Fstat V2.9.3 (Goudet 2001).

El grado de endogamia de una población mide el exceso de homocigotas en relación a lo esperado para el equilibrio de Hardy-Weinberg. Toma valores que van de 0 (apareamiento al azar, sin endogamia ni exogamia) 1 (endogamia total, exceso de homocigotas), cuando toma valores negativos, corresponde a un déficit de homocigotas (exogamia). Está dado por:  $F_{is} = (H_e - H_o)/H_e$ , donde  $H_o$  es la heterocigosidad promedio observada y  $H_e$  es la heterocigosidad promedio esperada.

## Tamaño efectivo de la población

El tamaño efectivo de la población es el número de individuos que dejan descendencia, es afectado por el número de individuos de cada sexo, la proporción de individuos reproductivamente activos y el sistema de apareamiento.

Se utilizó el programa NeEstimator v2.0 (Do & Waples 2014) para determinar el tamaño efectivo de la población basado en el método de desequilibrio de ligamiento de las frecuencias alélicas en la población (Hill 1981), lo cual tiene la ventaja de requerir de un solo muestreo de la población, a diferencia del método temporal (Nei & Tajima 1981; Waples 1989) que requiere de dos muestreos separados en el tiempo de una misma población.

NeEstimator v2.0 permite evaluar el sesgo de los alelos que se encuentran en baja frecuencia, donde se estima el tamaño poblacional efectivo excluyendo alelos que se encuentran en baja frecuencia (por ejemplo:  $<0,01$ ).

England *et al.* (2006) demostró que el resultado tiene un sesgo importante cuando el número de muestras es menor al tamaño efectivo real de la población de estudio, para el cual Waples (2006), desarrolló una corrección para eliminar el sesgo. Esta corrección también fue realizada con el programa NeEstimator v2.0.

Se estimó el tamaño efectivo de la población con este programa teniendo en cuenta que la especie es monógama y excluyendo del análisis los alelos con frecuencia menor a 0,01.

# RESULTADOS

## Preparación de las muestras y amplificación de microsatélites

Se extrajo con éxito ADN de 12 muestras de pelo de zorro de monte bajo el protocolo de Medrano (1990). Se realizaron con éxito 48 diluciones de ADN.

Se logró establecer las condiciones necesarias para la amplificación de 16 de los 18 microsatélites escogidos. Pez19 y FH2561 fueron los microsatélites que no se pudieron amplificar correctamente.

## Ranking de los microsatélites y desarrollo de multiplex

Se descartaron AHTK253, FH2004, FH2054, FH2088 y REN169D01, a causa de un patrón confuso de amplificación, inherente al microsatélite, o a “ruido” debido a una baja especificidad de amplificación lograda bajo las condiciones ensayadas.

Con los restantes 11 microsatélites, se determinaron tres conjuntos de tres loci y uno de dos, para hacer los multiplex (Tabla 2).

Tabla 2: Multiplex diseñados, se detallan los nombres, tamaños esperados y fluorocromos de cada locus.

<b>multiplex</b>	<b>Locus</b>	<b>Tamaño esperado</b>	<b>Fluorocromo</b>
<b>A</b>	FH2140	146	FAM
	FH2137	185	TET
	FH2848	237	HEX
<b>B</b>	FH2535	145	HEX
	FH2226	205	HEX
	REN105L03	251	FAM
<b>C</b>	FH2018	149	VIC
	FH2328	200	FAM
<b>D</b>	FH2001	131	NED
	FH2010	228	FAM
	FH2132	272	VIC

Estos multiplex se testearon en reacciones de PCR con 5 muestras de zorros. Si en la electroforesis aparecían las bandas de los loci, se consideró que estaban correctos para amplificar el resto de las muestras.

Las bandas de los distintos loci de cada multiplex fueron observadas en la electroforesis, por lo tanto se procedió a la amplificación de 48 muestras de zorro de monte para los 11 loci seleccionados. Una vez descartados 12 ejemplares por baja eficiencia en la amplificación, se realizó una matriz de genotipos (Anexo 2) con un total de 36 muestras que representan individuos tanto del norte como del sur del Río Negro (Figura 6).

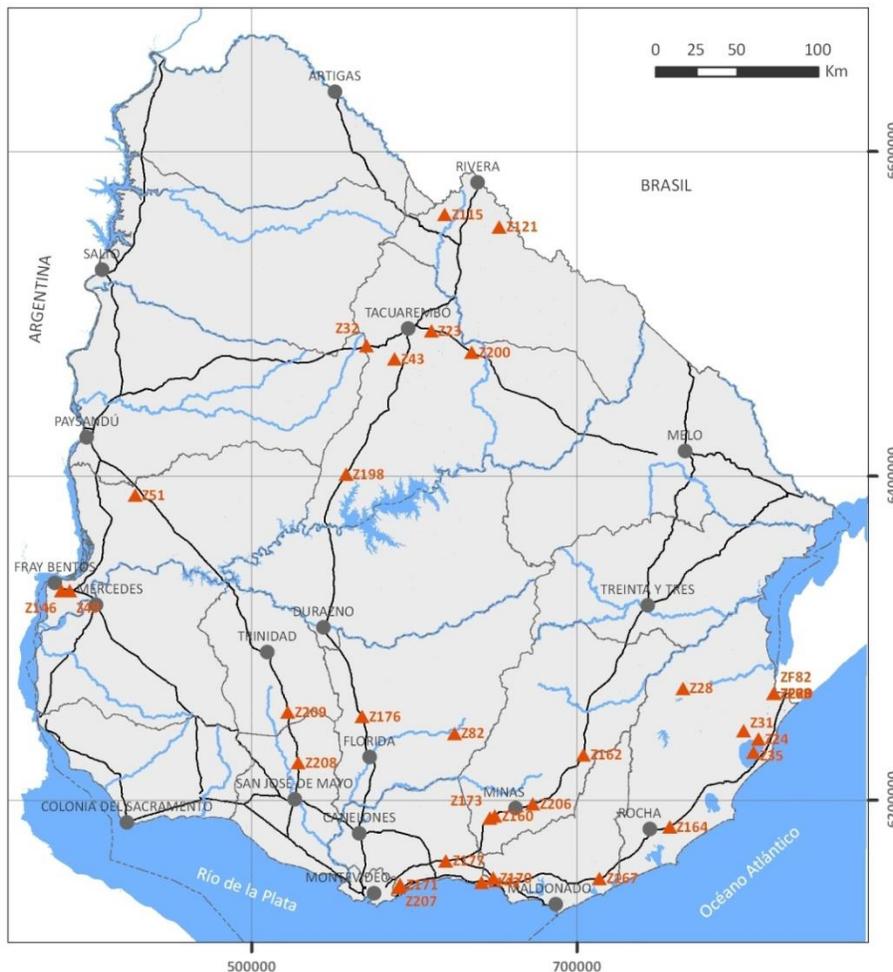


Figura 6: Mapa del Uruguay donde se indica con ▲ el lugar de colecta de las 36 muestras utilizadas para este trabajo. Mapa realizado por Lucía Bartesaghi.

## Errores de genotipado

Se encontró una alta probabilidad de alelos nulos para 3 de los 11 loci, estos loci fueron: FH2132, FH2137 y REN105L03 (Tabla 3). Se ajustaron sus frecuencias genotípicas, según la corrección de Brookfield 1, generando una matriz ajustada.

Tabla 3: Análisis de loci con presencia de alelos nulos en el programa Microchecker.

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
FH2140	no	0,1125	0,1265	0,098	0,4831
FH2137	yes	0,2304	0,3035	0,2171	0,7514
FH2848	no	0,0424	0,0428	0,0358	0,4907
FH2535	no	0,1205	0,1423	0,1122	0,6936
FH2226	no	0,0681	0,0714	0,0614	0,3294
REN105L03	yes	0,2061	0,2675	0,1927	0,2405
FH2018	no	0,0555	0,0603	0,0493	0,1959
FH2328	no	0,0409	0,0419	0,0374	0,6746
FH2001	no	0,0792	0,0956	0,0455	0,3834
FH2010	no	-0,0049	-0,0133	-0,011	0,3346
FH2132	yes	0,1894	0,2467	0,1622	0,3763

Several loci show evidence for a null allele.  
This population is possibly in Hardy Weinberg equilibrium with loci FH2140, FH2137, REN105L03, FH2132, showing signs of a null allele.

## Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los mismos tres microsatélites (FH2137, REN105L03, FH2132) se encontraban fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg de manera estadísticamente significativa, incluso luego de realizar la corrección de Bonferroni (Tabla 4).

Tabla 4: Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus con el programa Genepop. En amarillo los tres loci con probabilidad significativa de estar fuera del equilibrio.

locus	P-val	S.E.	Steps	
FH2140	0.2002	0.0321	1754	switches
FH2137	0.0000	0.0000	3292	switches
FH2848	0.2309	0.0097	20362	switches
FH2535	0.0963	0.0111	8658	switches
FH2226	0.0613	0.0172	2159	switches
REN105L03	0.0000	0.0000	12747	switches
FH2018	0.2777	0.0242	5523	switches
FH2328	0.0841	0.0228	2139	switches
FH2001	0.1165	0.0056	18402	switches
FH2010	0.2983	0.0211	6280	switches
FH2132	0.0007	0.0006	9199	switches

Los loci fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg fueron eliminados del análisis.

Se volvió a analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg para el resto de las muestras y se aplicó la corrección de Bonferroni para el locus FH2226 y para el conjunto de muestras. Todos los loci así como el conjunto de muestras, se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 5 y 6).

Tabla 5: Análisis de Hardy-Weinberg para cada locus y para el conjunto de loci, luego de descartar los loci que estaban fuera del equilibrio FH2132, FH2137, REN105L03.

locus	P-val	S.E.	Fis estimates		
			W&C	R&H	Steps
FH2140	0.2002	0.0321	0.1576	0.0539	1754 switches
FH2848	0.2163	0.0084	0.1032	0.0530	20144 switches
FH2535	0.1129	0.0135	0.1154	0.1655	8700 switches
FH2226	0.0476	0.0153	0.2325	0.2150	2007 switches
FH2018	0.3286	0.0227	0.1098	0.0806	5608 switches
FH2328	0.0581	0.0178	0.1272	0.0419	2116 switches
FH2001	0.1141	0.0049	0.0939	0.0241	18049 switches
FH2010	0.2936	0.0180	0.0070	-0.0220	6288 switches

All (Fisher's method):  
 Chi2 : 31.4407  
 Df : 16.0000  
 Prob : 0.0118

Normal ending

Tabla 6: Análisis de Hardy-Weinberg con las correcciones de Bonferroni, para el locus 2226 y para la población. En ambos casos, luego de la corrección, se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

	p-valor	p-valor (bonferroni)
FH2226	0,0476	0,564
Población	0,0118	0,094

## Desequilibrio de ligamiento

Luego de realizar la corrección de Bonferroni, ningún par de loci dio altamente significativo y se los pudo considerar a todos independientes entre sí.

## Contenido de información polimórfica

El set de microsatélites tuvo un valor medio de PIC de 0,7508, el cual se puede considerar alto.

La heterocigocidad esperada promedio fue de 0,7883.

La diversidad alélica fue de 10,75 alelos/locus, presentando un rango entre 4 y 17 alelos por locus.

La probabilidad de no exclusión parental para el primer padre (NE-1P) fue de 0,007, para el segundo padre (NE-2P) fue de 0,00034, y para el par parental (NE-PP) fue de  $1 \times 10^{-6}$ .

La probabilidad combinada de no exclusión para la identidad ( $P_{(ID)}$ ) fue  $2,4 \times 10^{-10}$ , (Tabla 7).

Tabla 7: Resultados del programa Cervus, en donde se muestra para cada locus: el número de alelos (k), el número de individuos genotipados (N), la heterocigocidad observada (HObs) y esperada (HExp), el contenido de información polimórfica (PIC), las probabilidades de no exclusión para el primer parental (NE-1P), segundo parental (NE-2P), ambos parentales (NE-PP) e identidad (NE-I).

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I
FH2140	15	29	0.724	0.857	0.826	0.468	0.304	0.130	0.042
FH2848	6	24	0.708	0.788	0.737	0.618	0.439	0.254	0.087
FH2535	10	24	0.792	0.893	0.861	0.407	0.254	0.098	0.029
FH2226	17	33	0.697	0.905	0.882	0.357	0.217	0.073	0.021
FH2018	11	35	0.743	0.833	0.801	0.515	0.342	0.161	0.052
FH2328	15	36	0.694	0.794	0.771	0.549	0.368	0.161	0.060
FH2001	4	31	0.452	0.498	0.442	0.876	0.734	0.581	0.308
FH2010	8	30	0.733	0.738	0.687	0.674	0.496	0.305	0.114

## Estructuración poblacional

Mediante el gráfico del logaritmo de la máxima verosimilitud de los datos en función del valor de  $k$ , se observa que el número de clústeres con mayor valor de máxima verosimilitud y menor desvío estándar es  $K=1$  (Figura 7).

Mediante el método basado en la tasa de cambio de segundo orden de la función probabilística para  $k$ , se observa que el número de clústeres que mejor se adecua a los datos es  $K=3$  (Figura 8).

Al observar en el programa Structure las probabilidades de cada individuo de pertenecer a cada clúster (para  $k=3$ ) se observa que estas probabilidades son iguales para más de un clúster (Figura 9).

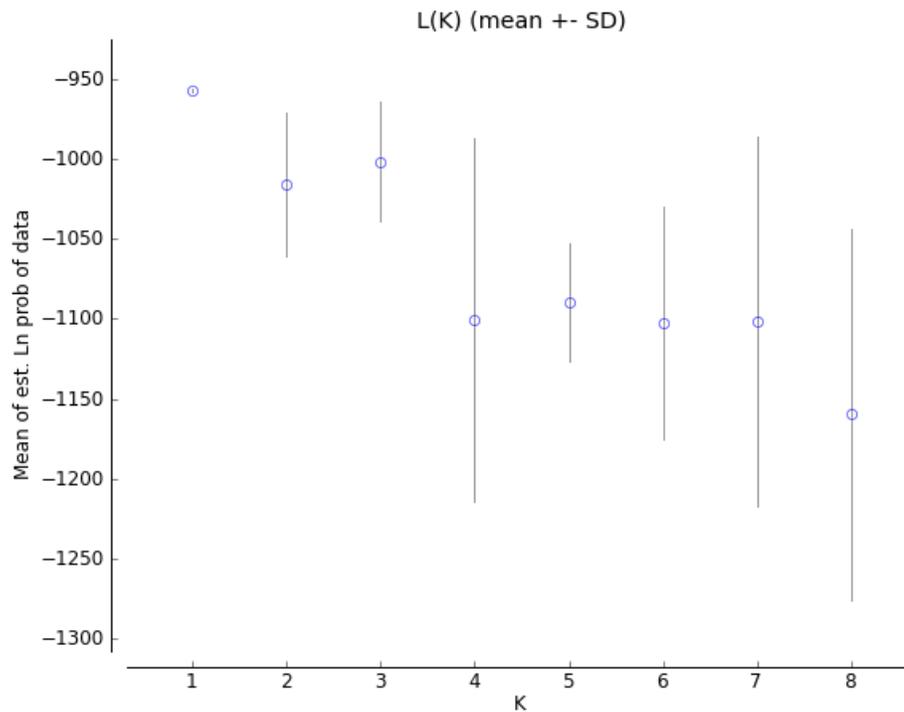


Figura 7: Gráfica de los valores medios de  $\text{LnP}(D)$  (máxima verosimilitud) y el desvío estándar obtenido, en función de los distintos modelos de clústeres ( $K$ ).

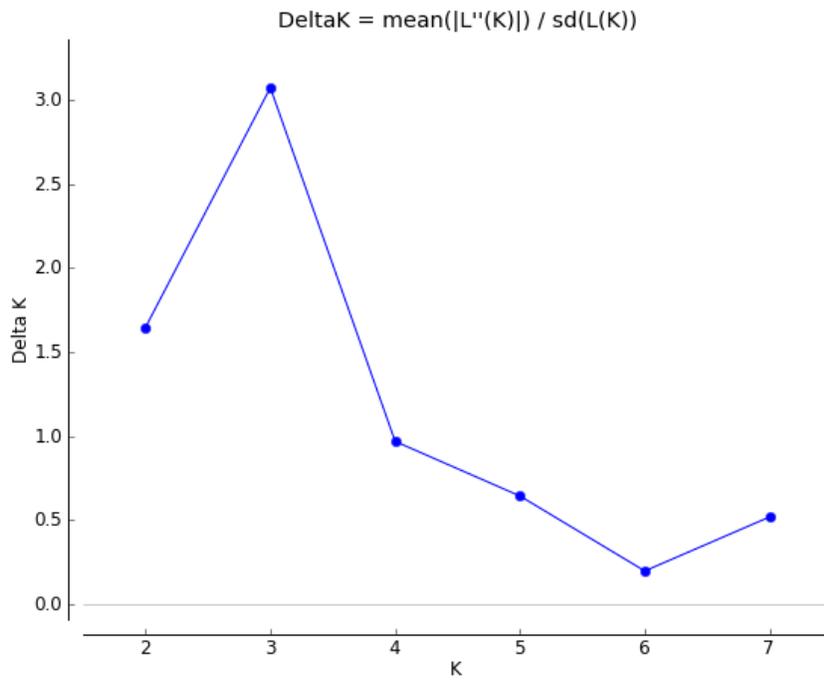


Figura 8: Gráfica de la tasa de cambio del  $\text{LnP}(D)$  ( $\Delta K$ ), en función de los distintos modelos de clústeres ( $K$ ).

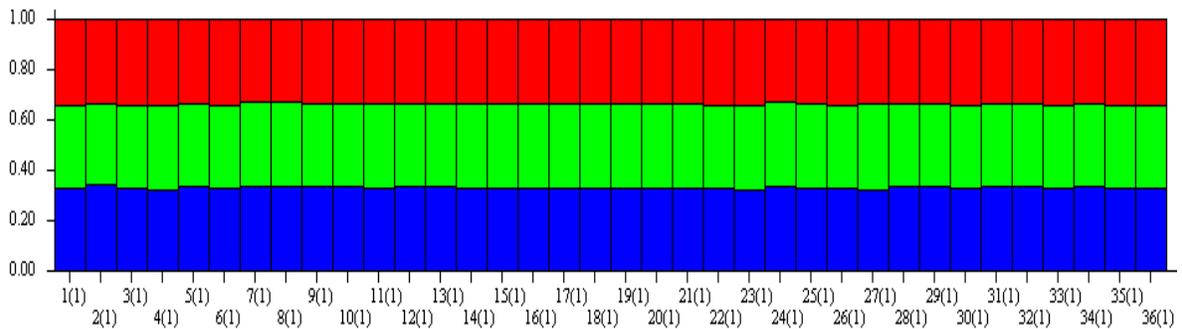


Figura 9: Gráfico de barras de la probabilidad (0 a 1) de cada individuo (1 a 36) de pertenecer a cada uno de tres clústeres (azul, verde y rojo).

## Grado de endogamia

El valor de endogamia hallado para el conjunto de muestras fue de 0,123 (Tabla 8).

Tabla 8: Resultados del análisis del grado de endogamia para cada locus y para el conjunto de loci, con el programa Cervus.

Fis Per population :	
FH2140	0.158
FH2848	0.103
FH2535	0.115
FH2226	0.233
FH2018	0.110
FH2328	0.127
FH2001	0.094
FH2010	0.007
A11	0.123

## Tamaño efectivo de la población

El tamaño efectivo de la población fue de 715 individuos, con un intervalo de confianza de 95%. (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados del número efectivo de la población, calculado bajo el modelo del desequilibrio de ligamiento, con el programa NeEstimator.

```
LD mating model: Monogamy
Population      1 [Z23] (Number of Individuals = 36)
*****
-----
Lowest Allele Frequency Used      0.050      0.020      0.010      0+
-----
LINKAGE DISEQUILIBRIUM METHOD
Harmonic Mean Sample size =      24.9      24.9      25.7      25.7
Independent Comparisons =      1779      3605      4449      4449
OverAll r^2 =      0.04504      0.04462      0.04201      0.04201
Expected r^2 Sample =      0.04256      0.04277      0.04115      0.04115
Estimated Ne^ =      247.1      331.2      715.7      715.7
95% CIs for Ne^
```

## DISCUSIÓN

Se lograron amplificar exitosamente las muestras de zorro de monte. Se utilizó ADN proveniente de tejidos y de fecas, las amplificaciones del ADN en el segundo caso fueron menos eficaces, pero se logró una eficiencia aceptable. Esto es porque las fecas contienen ADN con una mayor degradación que cuando se trabaja con tejidos o sangre, además contienen ADN de microorganismos, plantas y otros animales que pudieron ser ingeridos por el animal.

La colecta de fecas es una herramienta muy importante al momento de estudiar genéticamente una población, puesto que nos permite realizar muestreos sin necesidad de observar al individuo ni de tener que manipularlo (Kohn *et al.* 1999). Con el buen establecimiento de las condiciones para la amplificación de ADN, se pueden sortear las problemáticas del ADN obtenido por muestreo no invasivo mencionadas anteriormente. Puesto que muchas veces el ADN se obtiene de esta forma, el resultado es un aumento en el número de muestras de ADN para realizar el estudio. En este estudio en particular, la utilización de las fecas hizo posible la utilización de ADN de varios individuos del Departamento de Rocha.

Para economizar esfuerzos y costos, se amplificaron varios fragmentos por reacción de PCR (multiplex) con resultado positivo, puesto que se pudo identificar los diferentes fragmentos, y no hubo problemas de interferencia o inhibición como podría haber ocurrido.

Luego de ajustar las frecuencias alélicas de FH2137, REN105L03 y FH2132, los mismos tres microsatélites estaban fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, así como también el conjunto de muestras. Esto puede ser debido a que esos loci están ligados a algún gen sometido a selección o a un sesgo producto de resultar bajo el número de muestras utilizadas, tal vez aumentando este número este resultado cambie (Mannise 2009). En el caso particular de FH2137, ya había sido detectado fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg por los autores Da Foutoura-Rodríguez *et al.* (2008).

Luego de descartar esos tres loci, se volvió a realizar el mismo análisis, obteniendo que todos los microsatélites así como también el conjunto de muestras analizadas tienen una probabilidad significativa de estar en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Una población se considera que está en equilibrio Hardy-Weinberg para un locus si la proporción de genotipos observados en la población puede ser completamente definida

por las frecuencias alélicas esperadas del locus para el equilibrio. Para mantener el equilibrio Hardy-Weinberg se debe cumplir varios supuestos: los apareamientos deben ser aleatorios, no deben estar actuando la selección, mutación y migración, la población debe ser infinitamente grande (se descarta el efecto de la deriva) y no pueden existir diferencias en las frecuencias alélicas entre sexos (Montenegro, 2012). Por lo tanto podemos decir que nuestro conjunto de muestras pueden estar en mayor o menor medida dentro de estos supuestos.

Ningún loci resultó ligado a otro, lo cual significa que la información que aporta cada locus al análisis es independiente y aporta información para cualquier estudio poblacional que se quiera realizar con este set de microsatélites.

El conjunto de 8 microsatélites analizados tiene un alto contenido de información polimórfica, siendo este de 0,75. Esto significa que es adecuado e informativo para ser utilizado en estudios poblacionales, puesto que provee de buena calidad informativa. Las probabilidades de no exclusión de parentales así como también la de no exclusión para la identidad resultaron ser bajas, esto significa que este set también sirve para realizar análisis de parentesco y de identificación individual con una elevada confiabilidad de los resultados.

Respecto a la estructuración poblacional, se obtuvieron dos resultados por dos métodos distintos, el método del logaritmo de la máxima verosimilitud y el método basado en la tasa de cambio de segundo orden de la función probabilística K. Según Evanno *et al.* (2005), el método del logaritmo de la máxima verosimilitud, por el cual se calcula el número de clústeres más probable dentro de la muestra, puede dar resultados erróneos. Ellos sugieren un método basado en la tasa de cambio de segundo orden de la función probabilística K. Esta cuantificación es llamada  $\Delta K$ .

Los resultados bajo el primer método sugirieron que no había diferenciación genética entre las muestras como para establecer más de un clúster. Por otra parte, los resultados bajo el segundo método sugirieron que el número más probable de clústeres para ese conjunto de muestras era 3.

El programa Structure también asigna las probabilidades de cada individuo de pertenecer a cada clúster. Al analizar las probabilidades para el modelo de 3 clústeres, se observan iguales probabilidades para cada individuo de pertenecer a cualquiera de los tres grupos.

En muchas situaciones,  $\Delta K$  resulta un buen estimador para identificar el correcto número de clústeres, pero no debe ser utilizado exclusivamente. Ya que es importante

resaltar que en este modelo no se incluye el escenario con un único clúster, y por tanto falla al identificar el mejor K cuando es 1 (Evanno *et al.* 2005).

Por estas razones, se opta por el resultado de 1 clúster para la matriz analizada.

El valor de endogamia hallado para el conjunto de muestras fue de 0,123. Este resultado, aunque cercano a 0, indica que hay un cierto exceso de homocigotas. Igualmente podemos decir que la población está cercana a un régimen de apareamientos al azar más que a un régimen de endogamia.

Algunos de los factores que pueden contribuir a una menor heterocigosidad que la esperada son la consanguinidad, subdivisión de la población, presencia de alelos nulos, o falta de neutralidad relativa a la selección (Revidatti 2009). De los factores mencionados anteriormente, se descarta la presencia de alelos nulos o falta de neutralidad relativa a la selección, puesto que el primer caso se descartó luego de analizar la matriz de los genotipos con el programa Microchecker, y el segundo caso fue descartado luego de eliminar los loci que estaban fuera del equilibrio, dejando solamente para el análisis los que se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, considerándolos neutrales frente a la selección. Respecto a subdivisión poblacional, no hubo evidencias de que la haya, pero no se descarta, puesto que el análisis podría arrojar diferentes resultados si se aumenta el número de muestras. Podría existir algún nivel más bajo de sub estructuración como son los demes y eso explicaría que el valor de  $F_{is}$  sea levemente distinto de cero (Manisse 2009).

Se calculó el tamaño efectivo de la población, basado en que la especie es monógama. El resultado fue de 715 individuos. El área en el cual pueden vivir los zorros en el territorio uruguayo, se estimó en 173.230 km<sup>2</sup>, descartando cuerpos de agua lenticos, áreas urbanas, aeródromos y aeropuertos, áreas industriales, áreas portuarias y canteras de minería. Esto es lo mismo que un zorro reproductivamente activo cada 242 km<sup>2</sup>, Bartesaghi comm pers.

Es importante aclarar que el tamaño efectivo de la población siempre es menor al tamaño poblacional, y que depende de éste, de la proporción de sexos y del régimen reproductivo. Sería posible sabiendo la proporción de sexos y el número efectivo de la población, calcular un estimativo del tamaño poblacional.

Sabiendo que su densidad abarca entre 1 y 6 individuos por km<sup>2</sup> (MacDonald & Courtenay 1996; Eisenberg *et al.* 1979), y aunque seguramente los zorros no se distribuyan por igual en todas las zonas del país, el resultado de 715 individuos reproductivamente activos, sugiere que el número está subestimado. England *et al.* (2006)

demostró que el resultado tiene un sesgo importante cuando el número de muestras es menor al tamaño efectivo real de la población de estudio. A pesar de que el programa realiza algunas correcciones para subsanar este error, probablemente se pueda obtener un número más ajustado aumentando el tamaño muestral.

## CONCLUSIONES FINALES

Es posible amplificar microsatélites de zorro de monte con cebadores diseñados para amplificar microsatélites de perro doméstico.

El set de 8 microsatélites (FH2140, FH2848, FH2535, FH2226, FH2018, FH2328, FH2001, FH2010), es suficientemente polimórfico para realizar análisis de ecología molecular en poblaciones de *Cerdocyon thous*.

Respecto al estudio poblacional realizado, es recomendable realizar el mismo estudio ampliando el número de muestras para tener resultados más ajustados. Se puede considerar este estudio como un primer acercamiento al estado genético de *C. thous* en nuestro país, el cual puede servir como guía para posteriores estudios.

Es inminente estudiar el estado de conectividad del paisaje uruguayo, y realizar planes de manejo y pautas para el ordenamiento territorial, con el objetivo de conservar la biodiversidad de nuestro territorio. Para ello será importante el estudio de las diferentes especies de nuestro país, entre ellas *Cerdocyon thous*. El set de microsatélites caracterizado en esta tesis demostró ser una herramienta poderosa para el análisis de poblaciones uruguayas de esta especie, para lograr un mayor entendimiento de su dinámica poblacional, al momento de tomar decisiones adecuadas para la conservación de la naturaleza.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Paz, E., Rodríguez-Mazzini, R., & Clara, M. (1995). Dispersión de la "Palma Butiá" (*Butia capitata*) por el "zorro de monte" (*Cerdocyon thous*) en montes nativos de la Reserva de Biósfera Bañados del Este, Uruguay. *Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo, Montevideo*, 104, 1-4.
- Beebee, T. J. C., & Rowe, G. (2004). *An introduction to molecular ecology* (pp. 400). Oxford: Oxford University Press.
- Benayas, J. M. R., Newton, A. C., Diaz, A., & Bullock, J. M. (2009). Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *science*, 325(5944), 1121-1124.
- Berta, A. (1982). *Cerdocyon thous*. *Mammalian species*, 1-4.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Brazeiro, A., Achkar, A., Toranza, C., & Barthesagui, L. (2008). Potenciales impactos del cambio de uso del suelo sobre la biodiversidad terrestre de Uruguay. *Efectos de los cambios globales sobre la biodiversidad. CYTED*.
- Bueno, A. D. A., & Motta-Junior, J. C. (2004). Food habits of two syntopic canids, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), in southeastern Brazil. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77, 5-14.
- Cabrera López, M. J. (2007). Identificación taxonómica y determinación del sexo en zorros mediante métodos no invasivos.
- Caro, T., Engilis, A., Fitzherbert, E., & Gardner, T. (2004). Preliminary assessment of the flagship species concept at a small scale. *Animal Conservation*, 7(1), 63-70.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621-631.
- Cosse, M. (2010). Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*: Pautas para su conservación.

- Cosse, M., González, S., & Maldonado, J. E. (2007). Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genetics and Molecular Research*, 6(4), 1118-1122.
- Da Fontoura-Rodrigues, M. L., Lima-Rosa, C. A., Tchaicka, L., Valdez, F. P., Rodrigues, F. H., DE Paula, R. C., ... & Eizirik, E. (2008). Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular ecology resources*, 8(4), 898-900.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular ecology resources*, 14(1), 209-214.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Eisenberg, J. F., O'connell, M. A., & August, P. V. (1979). Density, productivity, and distribution of mammals in two Venezuelan habitats. *Vertebrate ecology in the northern Neotropics*, 187-207.
- Emmons, L. H., & Feer, F. (1999). *Mamíferos de los bosques húmedos de América tropical: Una guía de campo*. Santa Cruz de la Sierra: Editorial FAN.
- England, P. R., Cornuet, J. M., Berthier, P., Tallmon, D. A., & Luikart, G. (2006). Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics*, 7(2), 303-308.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Galan, M., Cosson, J. F., Aulagnier, S., Maillard, J. C., Thévenon, S., & Hewison, A. J. M. (2003). Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 142-146.
- González, S., Maldonado, J. E., Leonard, J. A., Vilà, C., Barbanti Duarte, J. M., Merino, M., ... & Wayne, R. K. (1998). Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular ecology*, 7(1), 47-56.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

- Goulart, F. V. B., Cáceres, N. C., Graipel, M. E., Tortato, M. A., Ghizoni Jr, I. R., & Oliveira-Santos, L. G. R. (2009). Habitat selection by large mammals in a southern Brazilian Atlantic Forest. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 74(3), 182-190.
- Guo, X., & Elston, R. (1999). Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Human Heredity*, 49(2), 112-118.
- Guol, S. W., & Thompson, E. A. (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.
- Hill, W. G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, 38(03), 209-216.
- Juarez, K. M., & Marinho-Filho, J. (2002). Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy*, 83(4), 925-933.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.
- Kohn, M. H., York, E. C., Kamradt, D. A., Haught, G., Sauvajot, R. M., & Wayne, R. K. (1999). Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1420), 657-663.
- Lee, T. M., & Jetz, W. (2008). Future battlegrounds for conservation under global change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1640), 1261-1270.
- Macdonald, D. W., & Courtenay, O. (1996). Enduring social relationships in a population of crab-eating zorros, *Cerdocyon thous*, in Amazonian Brazil (Carnivora, Canidae). *Journal of Zoology*, 239(2), 329-355.
- Maffei, L., & Taber, A. B. (2003). Área de acción, actividad y uso de hábitat del zorro patas negras, *Cerdocyon thous*, en un Bosque seco. *Mastozoología Neotropical*, 10(1), 154-160.
- Mannise N., Cosse M., Repetto L., Franco R., Maldonado J. & González S. (2011). Caso de estudio: caracterización y presencia de aguara guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en Uruguay empleando herramientas de ecología molecular. *Segundas Jornadas de Genética del Uruguay Sociedad Uruguaya de Genética*, pp. 19.
- Mannise, N. (2009). Análisis de polimorfismos en microsatélites para *Ctenomys pearsoni*, Lessa & Langguth 1983.
- Mannise, N. (2013). Análisis de la estructura genética de poblaciones de aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*).

- Mannise, N., Cosse, M., Repetto, L., Berriel, M. D. R. F., Maldonado, J. E., & González, S. (2012). Análisis genético sobre la presencia de Aguará Guazú (Carnivora, Mammalia) en Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 21, 30-38.
- Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-655.
- Maudet, C., Miller, C., Bassano, B., Breitenmoser-Würsten, C., Gauthier, D., Obexer-Ruff, G., Michallet, J., Taberlet, P., & Luikart, G. (2002). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. *Molecular Ecology*, 11(3), 421-436.
- Medel Rodrigo, G. (1988). Ecología de los cánidos sudamericanos: una revisión. *Revista chilena de historia natural*.
- Medrano, J. F., Aasen, E., & Sharrow, L. (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1), 43-43.
- Moehlman, P. D. (1989). Intraspecific variation in canid social systems. In *Carnivore behavior, ecology, and evolution* (pp. 143-163). Springer US.
- Montenegro, M. D. C. (2012). Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha.
- Nei, M., & Tajima, F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics*, 98(3), 625-640.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 86(3), 248-249.
- Revidatti, M. A. (2009). Caracterización de cerdos criollos del Nordeste Argentino.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43(1), 223-225.
- Rodríguez-Mazzini, R., & Molina, B. (2000). El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma: estudios realizados en la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa. *Documentos de trabajo*.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., & Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 974-980.

- Taberlet, P., Waits, L. P., & Luikart, G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*(8), 323-327.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, *4*(3), 535-538.
- Waples, R. S. (1989). A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, *121*(2), 379-391.
- Waples, R. S. (2006). A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci\*. *Conservation Genetics*, *7*(2), 167-184.
- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P., & Valero, M. (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, *7*(11), 1569-1573.
- Weir, B. S. (1990). *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, *11*(1), 1-16.

<http://www.iucnredlist.org/details/4248/0>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Cerdocyon\\_thous](http://es.wikipedia.org/wiki/Cerdocyon_thous)

# ANEXOS

## Anexo 1: Protocolo de Medrano para extracción de ADN de tejidos

### DIA1

#### EXTRACCIONDEADN(tejidosMedranoetal.,1990)

1. Cortartejidocon materialestéril
2. Colocarenependorf
3. Centrifugo1min.sila muestrafue conservadaen alcoholparaeliminarlo.
4. Se lavaconbufferSTE1ml.
5. Centrifugo1 min.
6. DescartoelSTE
7. Agregarbufferdelisis(550ul)+proteinasak(10mg/ml)(20ul)
8. Dejarenbañoa 55 °C conagitacióndoshoras,oa 37°Cportodalanoche

#### Bufferde lisis

50mMTrisHCl,pH8,0;50mMEDTA,pH8,0;1%SDS;100mMNaCl;1%betamercaptoetanol

#### BufferSTE

VerManiatis

### DIA2

1. Adicionar5,5 ul.RNAsAydejarincubando1 horamasa 55°C
2. Centrifugar14.000rpm por10min.
3. Transferirsobrenadanteaotroependorffymedir(ul.) conla pipeta
4. AgregarNaCl,lotenemosa5M,yotengoque llevara 2M

$$V_i = \frac{V_f(\text{Sobrenadante}) \times 2(\text{Concentraciónfinal})}{5(\text{Concentracióninicial})} = x$$

Hacertabla

N° individuo	V.ini	V.iniX0.66	V.ini+V.NaCl	(V.ini+V.NaCl)/2	V.c/tubo*2
		V.NaCl		c/tubo	V.Etanol
	p.3	p.4		p.7	p.8

5. Vortexear5seg.cadamuestra
6. Centrifugar14000rpm durante30min.
7. Distribuírelsobrenadanteen dostubosependorff(aprox.400ul.cada uno)
  8. Adicionarel doble en volumende Etanol absoluto frío (aprox. 800ul.) en este momentose deberíaobservarelADN
9. Se dejaprecipitandoenlaheladeratoda la noche

### DÍA3

1. Centrifugar30 min.amáximarpm
2. Desecharsobrenadante
3. Adicional1mlde Alcohol70%
4. Centrifugar5min.a6000 rpm-descartarsobrenadante
5. Adicional1mlde Alcohol70%
6. Centrifugar5min.a6000 rpm-descartarsobrenadante
7. Incubar30min.a 37°Cohasta secar

8. Agregar50ul1xTE(TrisEDTAo aguadestilada)

Anexo 2: Matriz generada del genotipado de 36 individuos de *Cerdocyon thous*, en la que se puede observar el tamaño de los dos alelos de cada locus para cada individuo.

	FH2140		FH2137		FH2848		FH2535		FH2226		REN105L03		FH2018		FH2328		FH2001		FH2010		FH2132	
Z23	114	122	000	000	233	233	113	113	173	193	227	227	161	165	198	202	127	127	226	226	154	154
Z24	104	118	172	180	237	239	121	133	191	191	241	241	161	169	166	176	121	127	226	230	154	154
Z28	114	129	196	196	233	235	109	121	189	193	231	231	157	171	168	198	127	127	226	226	154	158
Z31	114	122	188	188	233	243	117	119	189	201	231	241	149	149	168	202	121	127	226	226	154	158
Z32	102	122	172	172	231	239	119	129	201	201	233	241	149	157	182	186	121	127	208	218	170	170
Z35	122	132	168	180	233	233	119	125	177	193	229	237	149	171	168	182	127	127	222	226	150	150
Z43	130	130	158	158	237	243	115	133	187	187	233	235	149	149	182	206	121	127	218	222	154	158
Z49	126	126	176	176	237	237	121	121	185	209	235	241	169	169	168	176	121	127	214	218	154	154
Z51	114	122	176	176	237	237	117	121	201	213	239	241	169	169	176	206	123	127	222	226	154	154
Z82	000	000	000	000	000	000	000	000	201	205	233	233	153	161	198	202	123	127	222	222	150	158
Z115	000	000	000	000	000	000	000	000	177	193	233	233	149	157	194	208	123	127	218	222	146	150
Z121	000	000	000	000	000	000	000	000	159	193	233	233	161	175	176	178	127	127	222	226	150	150
Z142	114	114	168	168	231	237	117	119	173	181	237	241	149	153	168	178	117	123	216	226	166	166
Z146	126	130	000	000	237	239	125	129	193	197	237	237	149	157	178	194	127	127	000	000	154	154
Z160	114	122	180	180	231	235	117	121	181	201	233	237	149	153	122	142	000	000	226	226	154	154
Z162	114	114	176	184	239	239	129	129	197	201	237	237	149	163	182	190	117	123	222	222	158	158
Z164	000	000	000	000	000	000	000	000	181	189	241	241	149	165	166	166	127	127	222	226	162	170
Z167	126	132	182	196	237	239	115	121	193	197	237	241	149	161	168	202	123	127	226	230	154	158
Z170	120	130	132	172	000	000	000	000	201	201	227	227	153	157	168	168	000	000	000	000	000	000
Z171	000	000	000	000	000	000	000	000	197	197	241	241	153	153	168	168	123	127	226	226	158	158
Z173	122	126	184	202	231	237	109	121	189	189	233	241	149	161	168	186	127	127	226	230	158	158
Z176	122	122	178	178	239	239	109	109	177	201	233	233	149	153	168	178	127	127	226	230	154	158
Z177	000	000	000	000	000	000	119	121	193	201	239	241	149	171	168	198	127	127	218	226	158	162
Z198	114	118	178	180	233	239	119	121	169	179	233	241	149	163	182	202	000	000	000	000	000	000
Z200	104	132	180	180	233	235	117	133	185	193	237	239	157	161	168	178	127	127	226	226	154	166
Z206	122	122	172	192	231	237	115	119	193	193	237	237	153	171	166	166	127	127	218	222	158	158
Z207	114	126	178	184	233	239	125	129	197	197	239	241	153	161	168	168	127	127	222	226	154	154
Z208	122	132	172	186	237	239	125	127	185	189	229	239	169	183	168	168	123	127	222	226	150	154
Z209	124	130	144	152	235	237	000	000	155	177	229	229	153	170	168	204	123	123	218	226	154	158
Z220	122	130	144	152	000	000	000	000	189	193	229	229	149	149	168	202	123	127	222	230	154	154
ZF65	100	114	000	000	237	237	000	000	155	155	229	235	153	153	168	168	123	123	000	000	000	000
ZF66	134	138	000	000	000	000	000	000	000	000	229	229	000	000	168	168	127	127	216	220	154	166
ZF68	114	114	000	000	237	239	109	109	189	189	229	229	171	171	168	168	000	000	000	000	000	000
ZF69	118	166	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	149	153	168	190	127	127	222	230	154	154
ZF73	000	000	130	130	000	000	000	000	000	000	229	229	149	149	168	168	127	127	222	230	154	154
ZF82	122	122	000	000	000	000	115	125	197	205	231	243	153	157	168	168	000	000	000	000	000	000