

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL PUMA (*Puma concolor* Linnaeus,  
1771) EN LA PATAGONIA, A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES  
MITOCONDRIALES (ND5 Y REGION CONTROL)**

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**MATIAS EXEQUIEL MAC ALLISTER**

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del título de

**Licenciado en Genética**

Carrera

**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 11/03/2019

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL PUMA (*Puma concolor* Linnaeus,  
1771) EN LA PATAGONIA, A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES  
MITOCONDRIALES (ND5 Y REGION CONTROL)**

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**MATIAS EXEQUIEL MAC ALLISTER**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Susana Pistorale  
**Evaluador**

Andrés Lavore  
**Evaluador**

Juan Ignacio Túnez  
**Evaluador**

Carlos Ezequiel Figueroa  
**Co-Director**

Gabriela Paula Fernández  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 11/03/2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Gabriela Fernández por abrirme las puertas del CeBio, dirigirme y confiar en mí para que “pumas” no solo sea una tesis de grado sino una posible línea de investigación. Por sus palabras, consejos y guía siempre útil, no solo en lo laboral sino también en muchas decisiones que me ayudaron a crecer como persona.

A Carlos Figueroa por enseñarme casi todo lo que sé sobre cómo trabajar dentro de un laboratorio, por dirigirme y alentarme todo el tiempo, pero principalmente por ser mi amigo.

Al Dr. Mariano Merino por amablemente aportar su punto de vista fuera de la genética. Por las extensas salidas de campaña llenas de anécdotas, risas, pero principalmente por ser una fuente inagotable de nuevos conocimientos.

Al Dr. Alejandro Travaini, por su colaboración en las distintas etapas del desarrollo de este trabajo, desde la estructuración del proyecto de investigación a la gestión permanente de muestras de pumas de la Patagonia.

Al Dr. Martín Monteverde y Orlando Gallo, por sus respectivas contribuciones de muestras, fundamentales para la realización de este trabajo.

A mi amigo Ramiro Tintorelli por aconsejarme, acompañarme en extensas noches de estudio. Gracias a él yo estoy terminando la carrera ya que en un momento de incertidumbre sobre mi continuidad con mis estudios aportó su granito de arena para que yo pueda entrar al laboratorio y encontrara la motivación que necesitaba para seguir.

A mis compañeros del CeBio por brindarme su ayuda y conocimiento y por generar un ambiente dentro y fuera del laboratorio ideal para trabajar.

Al Dr. Andrés Lavore por estar siempre presente cuando lo necesite dentro y fuera del laboratorio. Por su enseñanza en el tiempo que compartí como ayudante alumno de su materia.

Al CEBIO F.C., por la compañía en todo este proceso. Es lindo trabajar en algo que a uno le gusta, pero si a la vez lo haces con amigos es una sensación inexplicable.

A Diana Acosta y Cecilia Carnovale por su predisposición para ayudarme en mi trabajo siempre de la mejor manera y por esas largas jornadas de trabajo a campo que terminaban con risas.

A Susana Pistorale, coordinadora de la carrera, por estar siempre presente a lo largo de nuestro paso por la universidad, por estar siempre al pie del cañón para brindarnos su apoyo y recomendaciones. Por darme un lugar en su materia para empezar a desarrollarme como un profesional.

A mis amigos de toda la vida que además de crecer junto a ellos, compartimos extensas jornadas de estudio, aunque cursáramos distintas carreras. En especial a Guido, Andi, Cristian y Gabi, los "mata campo".

A mis compañeros de cursada porque compartimos muchos momentos divertidos y algunos no tanto y por esas largas tardes de estudio. En especial a mis amigas Pato, Lu, Vir y Regi.

A mi mamá Liliana y mi papá Martín por darme la vida y desde ahí absolutamente todo. Por alentarme en mis proyectos especialmente en los momentos donde ellos estaban más convencidos que yo, de poder lograrlo.

Al Rolo, mi hermano, por pasar conmigo tanto buenos como malos momentos. Aunque no soy de decirlo, es una de las personas que más admiro y quiero en mi vida.

A mis abuelas Rosa y Nora, cada una con su personalidad, pero siempre dando hasta lo que no tenían para que crezca como persona y lograra terminar mis estudios.

A Ro, el amor de mi vida, por aparecer en el momento indicado, por apoyarme y bancar mi mal humor en etapas decisivas de la carrera. Pero principalmente por ser mi compañera de la vida y lograr sacarme una sonrisa en momento donde realmente lo necesitaba.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Puma concolor</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Biología y Ecología del puma.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Distribución del <i>Puma concolor</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 Su distribución en el mundo .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Distribución en Argentina .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Estado de conservación .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Estudios filogeográficos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1 Genoma mitocondrial.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2 Marcadores de ADN mitocondrial para estudios filogeográficos .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.3 Estructura de la Región Control del ADN mitocondrial .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Problemática de estudio.....</b>	<b>17</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Objetivo General .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Obtención de las muestras .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Actividades de laboratorio .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1 Extracción de ADN .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2 Obtención y amplificación de los fragmentos génicos mitocondriales .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2.1 NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2.2 Región Control.....</b>	<b>23</b>

4.2.2.2.1	Diseño de <i>primers</i> para un fragmento de Región Control mitocondria .....	23
4.2.2.2.2	Condiciones de Amplificación .....	24
4.2.3	Verificación de la eficiencia de la amplificación.....	25
4.2.4	Secuenciación de los fragmentos amplificados .....	25
4.3	Análisis de las secuencias .....	26
4.3.1	NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) .....	26
4.3.2	Región Control .....	29
4.3.2.1	Estructura del fragmento de Región Control .....	29
4.3.2.2	Variabilidad Haplotípica y Relaciones haplotípicas.....	29
5.	RESULTADOS .....	30
5.1	Procesamiento de las Muestras .....	30
5.2	Análisis de los Datos .....	30
5.2.1	NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) .....	30
5.2.1.1	Análisis filogenético .....	32
5.2.1.2	Distribución geográfica de los haplotipos .....	33
5.2.1.3	Relaciones haplotípicas.....	35
5.2.2	Región Control (RC) .....	37
5.2.2.1	Estructura de Región Control mitocondrial .....	37
5.2.2.2	Variabilidad Genética .....	39
5.2.2.3	Distribución geográfica de los haplotipos .....	40
6.	DISCUSIÓN .....	42
7.	CONCLUSIÓN .....	47
8.	BIBLIOGRAFIA .....	48
9.	RESUMEN .....	67
10.	ANEXO .....	69



# 1. INTRODUCCION

## 1.1 *Puma concolor*

El puma, es el predador tope de América, originalmente descrito como *Puma concolor* por Linnaeus en 1771 (Nowell y Jackson, 1996; Sunquist y Sunquist, 2002; Perovic y Pereira, 2006; Matte *et al.*, 2013) (Figura1).



**Figura 1.** *Puma concolor*. Fotografía: Alejandro Insegna.

A pesar de su gran tamaño, el puma comparte algunas características morfológicas con los felinos más pequeños por lo que durante mucho tiempo se lo ubicó en el género *Felis* (Currier, 1983). Estudios genéticos más recientes lo ubican en el mismo grupo filogenético que otros felinos de mayor porte como el jaguarundi (*Puma yagouaroundi*, Lacépède 1809) y el guepardo (*Acinonyx jubatus*, Schreber 1776)) (Johnson *et al.*, 2006).

Los registros fósiles encontrados para el puma tienen menos de medio millón de años, pero distintos estudios (tanto moleculares como morfológicos) datan el origen de la especie en el Mioceno tardío, entre 5 y 8 millones de años atrás. Por otra parte, existe numerosa evidencia de que los pumas aparecen en



América del Sur de 2 a 4 millones de años atrás, durante el “Gran Intercambio Biótico Americano” (GABI), con el ingreso de numerosos carnívoros desde América del Norte (Marshall *et al.* 1982; Stehli y Webb 1985; Webb 1978; Webb y Marshall 1981; Webb y Rancy 1996). De todas maneras, dado que el registro fósil de puma en Sudamérica es tan pobre, no se puede descartar un origen neotropical seguido de una dispersión posterior hacia el norte (Kurten 1976; Werdelin 1989).

Registros paleontológicos más recientes indican que durante el Pleistoceno e inicio del Holoceno, el puma habría coexistido con otros grandes felinos en América del Norte: *Panthera atrox* (león americano), *Smilodon fatalis* (tigre diente de sable) y *Miracinonyx trumani* (guepardo americano), siendo este último el más próximamente relacionado de los tres al puma (Janczewski *et al.*, 1992; Barnett *et al.*, 2005). Este hallazgo apoyaría la hipótesis de un origen norteamericano para el puma, con la subsecuente colonización de Sudamérica.

En el Pleistoceno tardío (entre 10.000 y 12.000 años atrás), en concordancia a la extinción de otros grandes mamíferos, el puma podría haberse extinguido en América del Norte sobreviviendo apenas las poblaciones de América del Sur, las que luego de la glaciación recolonizarían América Central y América del Norte (Culver *et al.*, 2000).

Las definiciones taxonómicas intraespecíficas para *Puma concolor* han sido bastante complejas y cambiantes a través del tiempo de acuerdo a los criterios utilizados para su determinación. Originalmente se describieron 32 subespecies en base a criterios geográficos y morfológicos (Neff 1983; Young y

Goldman 1946), pero a partir del uso de distintos marcadores mitocondriales (ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) y ATP sintasa 8 (ATPase-8) y nucleares (microsatélites e intrón Zfy del cromosoma Y), Culver y colaboradores (2000) reconocen sólo seis subespecies para el puma: *P. concolor cougar* (América del Norte), *P. concolor costaricensis* (América Central), *P. concolor concolor*, *P. concolor cabreræ*, *P. concolor puma* y *P. concolor capricorniensis* (América del Sur) (Figura 2) (Culver *et al.*, 2000). En Argentina podemos encontrar las tres últimas subespecies mencionadas (Perovic y Pereira, 2006).



**Figura 2.** Distribución de las distintas subespecies de *Puma concolor*, definidas en base al uso de distintos marcadores mitocondriales (16S rRNA, NADH-5 (ND5) y ATPase-8) y nucleares (microsatélites e intrón Zfy del cromosoma Y). NA: Norteamérica, CA: Centroamérica, NSA: Norte de Sudamérica, ESA: Este de

Sudamérica, CSA: Centro de Sudamérica, SSA: Sur de Sudamérica. Modificada de Culver y colaboradores (2000).

## 1.2 Biología y Ecología del puma

El puma es un felino de gran tamaño, casi tanto como el jaguar (*Panthera onca*), incluso superándolo en algunas medidas externas, aunque no alcanza su corpulencia. Por su tamaño el puma se encuentra entre las seis especies de felino más grandes del mundo, entre ellos, el león (*Panthera leo*), tigre (*Panthera tigris*), leopardo (*Panthera pardus*), el jaguar (*Panthera onca*) y el guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Sunquist y Sunquist, 2002).

La longitud de cabeza a tronco es de 105 a 180 cm aproximadamente y la cola de 60 a 90 cm (Iriarte, 2007). La longitud del pie varía desde 19 a 27 cm (dato que es útil al momento de identificar su rastro). Su peso oscila entre los 34 a 105 kg, siendo el macho más robusto que la hembra. Los pumas tienden a ser más grandes a mayores latitudes (donde sus presas son de mayor porte), pudiendo los machos alcanzar el peso excepcional de 120 kg (Castilho *et al.*, 2010; Sunquist y Sunquist, 2002). Posee una forma esbelta, la cabeza relativamente pequeña comparada con el tamaño corporal (Sunquist y Sunquist, 2002; Iriarte, 2007), el cráneo corto y redondeado, con anchos arcos cigomáticos y la cola larga del mismo ancho en toda su longitud. Las patas son grandes y fuertes. Proporcionalmente sus patas traseras son las más grandes en la familia de los felinos; proporcionalmente las mayores patas traseras en la familia de los felinos, esta característica le permite un gran salto y una gran capacidad de carrera corta. Tienen cinco dedos en las patas delanteras y

cuatro en las traseras. Cada dedo está provisto de una uña curvada y retráctil (CEAL, 1985).

En el adulto, el pelaje es suave, corto y prácticamente uniforme, sin franjas ni manchas, mientras que las crías presentan un moteado muy oscuro durante los 3 o 4 primeros meses de vida que va perdiéndose con la madurez (Iriarte, 2008). Es más pálido (a veces casi blanco) en el interior de las orejas, el mentón, los belfos y la porción ventral, y más oscuro (en ocasiones casi negro) en las comisuras de la boca, el extremo de la cola y el exterior de las orejas, generalmente con una zona transversal pálida (CEAL, 1985). La parte inferior de cuerpo, la barbilla y la zona entre los labios superiores y el rinario son blancos (Parera, 2002). La cola se va oscureciendo hacia el extremo, hasta terminar en una punta negra (Iriarte, 2008). El largo del pelaje, color y textura varían geográficamente. Los individuos de lugares más fríos y mayores altitudes suelen tener el pelaje más grueso y corto que los de lugares más cálidos (Iriarte *et al.*, 2013). La coloración general varía entre bayo claro a marrón algo oscuro, con matices grisáceos y rojizos. La subespecie *P. concolor puma* (distribuida en la región patagónica) además de caracterizarse por poseer individuos de mayor tamaño, posee pelaje más denso y de color rojizo; la subespecie *P. concolor capricornensis*, que habita Misiones, presenta menor tamaño y una coloración rojiza definida, y *P. concolor cabrae*, de la región chaqueña austral, tiene un color rubio oscuro (Chebez y Nigro, 2010).

Por lo general el puma es solitario y territorial (Iriarte *et al.*, 2013), de hábitos preferentemente crepusculares y nocturnos, con picos de actividad al anochecer y al amanecer; pasa la mayor parte del día descansando en oquedades rocosas, encaramado en las ramas de los árboles, o escondido

entre pastos altos. Este patrón puede variar según la región, la época del año y la presencia humana (Paviolo *et al.*, 2009). De movimientos rápidos y silenciosos, es un corredor veloz, muy poderoso en el salto y un hábil nadador; trepa a los árboles con agilidad, pudiendo subir o bajar de ellos con un solo salto de más de 10 metros. No puede rugir y al igual que los gatos domésticos vocalizan silbidos agudos, gruñidos y ronroneos (Currier, 1983).

Su territorio varía entre 56 y 375 km<sup>2</sup>, de acuerdo a la disponibilidad de presas. El territorio del macho es mayor y generalmente se superpone con el área de acción de varias hembras, siendo que la mayoría de las mismas no ocupan más de 100 km<sup>2</sup> (Nowell y Jackson, 1996). Dicho territorio es marcado por pequeñas pilas de hojas y cortezas de árboles que arranca y apila cuando se afila las garras, y los suele rociar con orina o excremento (Sunquist y Sunquist, 2002). Los territorios son, generalmente, respetados por sus congéneres y los machos evitan encontrarse, dejando ver en esta actitud una marcada territorialidad (Rodríguez de la Fuente, 1983; Iriarte *et al.*, 2013).

La dispersión desde el territorio de nacimiento ocurre entre los primeros 10 a 33 meses de vida, siendo más común a los 18 meses, antes de alcanzar la madurez sexual (Sweaner *et al.*, 2000). Los machos tienden a dispersar distancias mayores que las hembras, las que normalmente exhiben filopatría y establecen su territorio próximo al de la madre (Lindzey *et al.*, 1994; Sweaner *et al.*, 2000; Maehr *et al.*, 2002; Pierce y Bleich, 2003).

El puma puede reproducirse en cualquier época del año, aunque lo hace preferentemente en el otoño o en el invierno. Las hembras son poliéstricas, el celo dura unos 9 días y es el único momento en que ambos sexos permanecen

juntos. Luego de un período de gestación de unos 82 a 96 días, la hembra da a luz en el interior de un tronco hueco o alguna grieta rocosa una camada de 1 a 6 crías (3 en promedio) (Nowell y Jackson, 1996). Las crías suelen quedarse con la madre hasta alcanzar la madurez sexual, que ocurre más tempranamente en las hembras (dos años y medio) que en los machos (al término de los tres años). El puma puede alcanzar una edad de 10 a 13 años (Iriarte *et al.*, 2013).

Es un predador caracterizado por una dieta generalista, aunque basada en técnicas especializadas de búsqueda, captura y manipulación de sus presas. La dieta puede variar con la latitud: los pumas de clima templado generalmente consumen presas de mayor tamaño que aquellos de climas tropicales (Logan y Sweanor, 2001; Pacheco *et al.*, 2004 Sunquist y Sunquist, 2002; Taber *et al.*, 1997).

En Argentina su alimentación incluye presas de diversos tamaños, desde cérvidos y camélidos hasta roedores pequeños, con predominancia de mamíferos terrestres (Yáñez *et al.*, 1986; Iriarte *et al.*, 1990; Logan y Sweanor, 2001; Rau y Jiménez, 2002; Pacheco *et al.*, 2004; Fernández y Baldi, 2014). En las selvas subtropicales se ha registrado el consumo de armadillos (*Dasypodidae*), pecaríes (*Tayassuidae*), agutíes (*Dasyprocta spp.*), pacas (*Cuniculus paca*), corzuelas (*Mazama spp.*) y gran diversidad de roedores, marsupiales y reptiles (Parera, 2002). En zonas de pastizales las presas predilectas son el ñandú (*Rhea americana*), la vizcacha (*Lagostomus maximus*) y el venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*). En la estepa patagónica la mara (*Dolichotis patagonum*), las especies introducidas como liebre europea (*Lepus europaeus*), y el ganado doméstico (ovejas, cabras y cerdos, entre

otros), también han sido incorporadas como presas (Ackerman *et al.*, 1984; Iriarte *et al.*, 1991; Fernández y Baldi, 2014; Rau y Jiménez, 2002; Yáñez *et al.*, 1986). En esta región también consume el choique (*Pterocnemia pennata*) y diversas especies de peludos y armadillos, registrados como las principales fuentes de su alimentación. Hacia la cordillera de la región patagónica incorpora a su dieta al pudú (*Pudu pudu*) y al huemul (*Hippocamelus bisulcus*). Las principales presas en el sur de la Patagonia son el guanaco (*Lama guanicoe*), la mara, el ñandú patagónico (*Rhea pennata pennata*), el pichi (*Zaedyus pichiy*), el pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) y la liebre europea (Zanón Martínez *et al.*, 2012). En el centro y norte de los Andes aparece una nueva presa que es la vicuña (*Vicugna vicugna*). El puma puede alimentarse de un mismo cadáver durante varios días (Parera, 2002). En el norte de Santa Fe existe una estrecha relación predador-presa, entre el puma y el guazuncho, a tal punto que la presencia de este cérvido, constituye un indicativo de la presencia de pumas (Moggia, 1996).

### **1.3 Distribución del *Puma concolor***

#### **1.3.1 Su distribución en el mundo**

El puma es el carnívoro con mayor distribución en América, desde Canadá hasta el extremo sur continental de Argentina y Chile (Currier, 1983; Iriarte *et al.*, 1990; Sunquist y Sunquist, 2002), demostrando un alto grado de plasticidad en el uso de diferentes hábitats (Anderson, 1983; Iriarte *et al.*, 1990; Nowell y Jackson, 1996; Novarro *et al.*, 2000; Donadio *et al.*, 2009; Iriarte y Jaksic, 2012). Se encuentra prácticamente en todo tipo de ambientes,

incluyendo bosques, selvas, montes, sabanas, áreas montañosas y serranas, praderas y desiertos; desde el nivel del mar hasta los 5000 metros de altura en los Andes (Iriarte y Jaksic, 2012). Su amplia distribución es probablemente la razón por la cual el puma recibe más de 40 nombres comunes incluyendo: “puma” (quichua), “león americano”, “leoncito bayo”, “susuarana”, “onça parda” u “onça vermelha” (portugués), “onza colorada”, “yaguá-pihtá” o “dyaguá–pihtá” (guaraní), “guasúara”, “trapial” (mapuche), “mountain Lion” (inglés), entre otros (Guinness World Records, 2004; Fitak, 2016).

Su distribución geográfica se extendía hace apenas un siglo, desde Canadá (entre la Columbia Británica al oeste, y Québec al este), hasta el Estrecho de Magallanes al sur de Chile y Argentina (Cabrera, 1961). En la actualidad sus poblaciones han mermado considerablemente en zonas con mayor desarrollo humano, incluyendo el centro y este de los Estados Unidos y Canadá, algunas regiones más desarrolladas de Centroamérica, parte de la costa oeste de Sudamérica, y el sudeste brasileño (Nowell y Jackson, 1996; Culver *et al.*, 2000; Sunquist y Sunquist, 2002), desapareciendo además de gran parte de Uruguay y en parte de la Región Pampeana argentina (Chebez, 2009; De Lucca, 2010; Martínez *et al.*, 2010) (Figura 3).





**Figura 3.** Distribución de *Puma concolor* en América. Se pueden observar, las áreas con poblaciones contemporáneas (rojo), aquellas con poblaciones ya extintas, o con una drástica reducción demográfica (amarillo), y aquellas con posible presencia de pumas (rosa). Modificada de <http://cinabrio.over-blog.es/2015/07/leon-americano-evolutivamente-mas-gato-que-tigre.html>

### 1.3.2 Distribución en Argentina

En Argentina se ha registrado la presencia de pumas en todas las provincias excepto en Tierra del Fuego (Perovic y Pereira, 2006; Chebez, 2009). En algunas provincias su presencia se ve muy restringida. En Entre Ríos, el puma fue considerado extinto por algunos autores (Chebez, 1994; Parera, 2002; Canevari y Vaccaro, 2007; Martínez *et al.*, 2010), mientras que otros han reportado su ausencia para el Parque Nacional El Palmar (Heinonen, Fortabat y Chebez, 1997). Sin embargo, Chebez (2009) y Muzzachiodi (2007) mencionan a *Puma concolor* para dicha provincia en base a tres ejemplares cazados en 2004 en los departamentos del oeste, Paraná y La Paz. En la provincia de Buenos Aires, se ha registrado la presencia de puma para el área correspondiente al extremo sudoeste de la misma (partidos de Villarino y Patagones) (Canevari y Vaccaro, 2007; Hornocker y Negri, 2010; Laundré y Hernández, 2010). Por otra parte, De Lucca (2010) y De Lucca y Bollero (2011), proporcionan evidencias sobre la presencia de poblaciones de *Puma concolor* para el sudoeste (Sistema de Ventania) y para el noroeste y norte del pastizal pampeano. Más recientemente, Chimento y De Lucca (2014) han registrado presencia de puma en casi toda la provincia.

En la Patagonia argentina, extremo sur de su distribución, la persecución y caza del puma ha sido constante desde la introducción del ganado ovino en 1877. Como resultado de los altos niveles de cacería, fue erradicado casi totalmente del territorio durante el siglo XX (Bellati y Von Thungen, 1990; Novaro *et al.*, 2005; Walker y Novaro, 2010). Sin embargo, la disminución de la actividad ganadera favoreció el restablecimiento de este felino en la región (Novaro y Walker, 2005; Walker y Novaro, 2010; Llanos *et al.*, 2014). En los

últimos 20 años el conflicto histórico que los ganaderos mantienen con el puma se ha intensificado y su categorización como especie ‘plaga’ o ‘dañina’ ha tomado mayor difusión que en el pasado. Este felino es considerado uno de los principales predadores de ganado, junto al zorro colorado (*Lycalopex culpaeus*) (Bellati y Von Thungen, 1990; De Lucca, 2010; Travaini *et al.*, 2000; García *et al.*, 2010; Llanos *et al.*, 2016). Actualmente, en la Patagonia argentina, el puma se encuentra en un período de expansión (Aprile *et al.*, 2012). Esto se atribuye, en gran parte, al aumento de la disponibilidad de sus presas, tanto nativas como exóticas, y a la disminución de la caza, producto del abandono de la ganadería ovina y el éxodo rural (Novaro y Walker, 2005; Walker y Novaro, 2010).

#### **1.4 Estado de conservación**

Por su carácter de depredador tope de gran tamaño, es particularmente sensible a la expansión de la actividad humana (Forero-Medina *et al.*, 2009). Si bien es capaz de subsistir en ambientes modificados por el hombre, en lugares de alta presión agrícola-ganadera o industrial, ha sufrido retracciones en su rango e incluso extinciones locales (Chimento y De Lucca, 2014). Las principales amenazas que enfrenta el puma son la pérdida y fragmentación de hábitat, disminución de sus presas naturales y la caza furtiva (Crooks, 2002; Parera, 2002; Canevari y Vaccaro, 2007). En cuanto a su estado de conservación, la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) lo categoriza como de “Preocupación Menor”, principalmente debido a su amplia distribución geográfica (Nielsen *et al.*, 2015).

A nivel nacional, la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM) considera a la especie como de "Preocupación Menor", pero recomienda el monitoreo de algunas poblaciones que podrían estar en riesgo por la persecución directa y/o modificación del hábitat (Ojeda *et al.*, 2012). En la mayoría de las provincias del país, el puma carece de protección legal explícita, aunque en algunas podría considerarse amparado por las distintas Leyes Generales de Protección de Fauna (propias o que adhieren a la Ley Nacional 22.421). Por otra parte, en muchas de estas provincias (La Pampa, Jujuy, Catamarca, Formosa, Neuquén, Rio Negro, Chubut y Santa Cruz) se permite la caza de control sobre la especie, así como también la caza deportiva (La Pampa, Salta, Catamarca, Santiago de Estero, Formosa, Chaco, Neuquén, Rio Negro); en general sin los controles necesarios para asegurar su sustentabilidad (Chebez y Nigro, 2010). A pesar de ello se observan situaciones particulares a nivel regional, siendo su grado de amenaza no debidamente evaluado hasta el presente.

Para fines de conservación, los pumas a menudo han sido considerados como una "especie paraguas" para la protección de paisajes completos (Weber y Rabinowitz, 1996) ya que, para muchos carnívoros grandes, su presencia puede tener impactos sustanciales en la dinámica y la composición de especies que son predadas (Logan e Irwin, 1985; Turner *et al.*, 1992) e incluso sobre comunidades de plantas (Schmitz *et al.*, 2000). En este sentido, el manejo del puma también estaría directamente relacionado al de otras especies que comparten su nicho ecológico (Logan y Sweanor, 2001), por ser predador de las mismas (Turner *et al.*, 1992; Wehausen, 1996; Hayes *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 2000) y en particular con el hombre, debido al conflicto generado

principalmente por la depredación del puma sobre el ganado (Beier, 1991; Torres *et al.*, 1996).

A medida que aumenta la superposición humana sobre el hábitat del puma, se hace cada vez más necesaria la identificación y el mantenimiento de corredores de dispersión para estos animales, con el fin de asegurar la conectividad y la dinámica entre las poblaciones de puma (Elbroch *et al.*, 2009).

Por lo tanto, para preservar las comunidades ecológicas en las que habita el puma y para minimizar los conflictos con el hombre, es necesario profundizar los conocimientos sobre la especie para de esta manera, tomar medidas apropiadas de conservación y manejo.

## **1.5 Estudios filogeográficos**

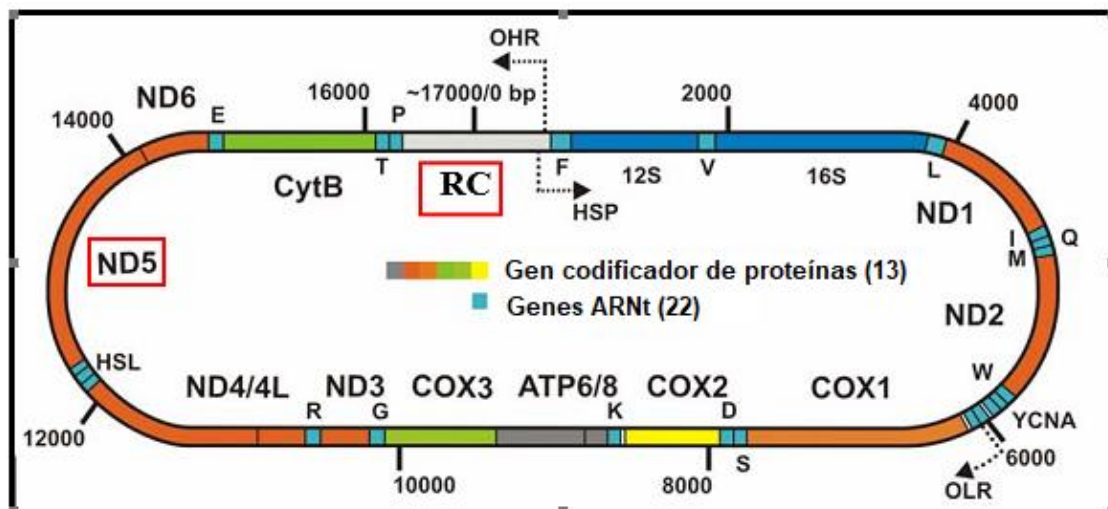
El concepto de filogeografía fue introducido por primera vez por John Avise y colaboradores en 1987, cuando pudieron asociar las ramas de algunos árboles de genes intraespecíficos con un patrón geográfico (Avise *et al.*, 1987). Los marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) han demostrado ser eficaces para el cálculo de índices de variabilidad genética y develar la estructura genética de las poblaciones, así como su historia evolutiva (Avise, 1998).

### **1.5.1 Genoma mitocondrial**

El genoma mitocondrial consiste en material genético citoplasmático circular de ADN bicatenario, localizado en el interior de las mitocondrias. Es haploide, tiene entre 15.000 y 17.000 pb de largo, y posee centenares de

copias por célula (Meyer, 1993; Li y Gaur, 2000). Este genoma contiene un pequeño número de genes, distribuidos en la cadena H (pesada) y la cadena L (liviana), nombradas de esa manera debido a su diferente densidad cuando son centrifugadas en gradiente de cloruro de cesio (CsCl).

Se encuentra compuesto por 37 genes funcionales, de los cuales 13 codifican para polipéptidos involucrados en la cadena de fosforilación oxidativa (Avisé, 2000), mientras que el resto codifican para 22 moléculas de ARN de transferencia (ARNt) y dos tipos de ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) (Núñez Domingo, 2011). Posee un único fragmento no codificante de aproximadamente 1000 pb llamado Región Control (RC), cuya función es principalmente reguladora (Brown, 1985) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema del genoma mitocondrial, en el cual se visualizan los genes codificantes y aquellos relacionados a los ARNt. En rojo se recuadran las regiones génicas estudiadas en el presente trabajo (NADH deshidrogenasa subunidad 5, ND5 y Región control, RC). Imagen modificada de Fonseca y colaboradores (2008).

### **1.5.2 Marcadores de ADN mitocondrial para estudios filogeográficos.**

El ADNmit, en particular la región control mitocondrial, ha sido ampliamente utilizado en estudios filogeográficos, por acumular mutaciones a una tasa mucho mayor que el ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979), a excepción de genes hipervariables como los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, o las variantes neutrales de los *loci* de microsatélites. Otra ventaja es que el genoma mitocondrial es de herencia materna, por lo que se evitan las “ambigüedades” producidas por la recombinación que ocurre en los genes nucleares durante la meiosis (Brown, 1985). Esta característica lo hace especialmente útil como herramienta molecular para estudios filogenéticos (Castro, 2012) y para la determinación de las relaciones de ancestralidad-descendencia entre taxones (Stoneking *et al.*, 1991; Avise, 1994; Jae-Heup *et al.*, 2001; Culver *et al.*, 2008).

Segmentos de ADN mitocondrial como NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5), ATP sintasa subunidad 8 (ATP8) y Región Control (RC), han sido ampliamente utilizados en carnívoros y principalmente en felinos para inferir las relaciones filogenéticas e historia evolutiva de diferentes especies, así como también patrones de variación molecular intraespecíficos (Culver *et al.*, 2000; Trigo *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2012; Matte *et al.*, 2013).

### **1.5.3 Estructura de la Región Control del ADN mitocondrial**

Uno de los marcadores más utilizados para abordar las relaciones evolutivas entre taxones estrechamente relacionados es la Región Control mitocondrial, de evolución más rápida que otras regiones del genoma mitocondrial (Aquadro y Greenberg, 1983; Brown *et al.*, 1993; López *et al.*,

1997). Aunque esta región ha sido secuenciada y descrita en numerosas especies, los mecanismos de replicación y transcripción, su vínculo con la arquitectura estructural y la dinámica evolutiva de la RC, siguen siendo poco conocidos (Jae-Heup *et al.*, 2001). La RC de la mayoría de las especies tiene una región conservada central (CCR) que está rodeada por regiones más variadas ricas en A / T. En diferentes felinos, tales como los del género *Panthera* (Jae-Heup *et al.*, 2001) y *Felis catus* (López *et al.*, 1997) la disposición de RC del ADNmt fue similar reconociéndose dos segmentos hipervariables (HVS-1 y HVS-2), una CCR y dos segmentos de secuencias repetitivas (RS-2 y RS-3).

## **1.6 Problemática de estudio**

La investigación que se propone a través de este proyecto abarca un área vacante en relación al conocimiento de la biodiversidad no sólo a nivel de especie, sino también de los procesos evolutivos que llevaron a la distribución de la variabilidad genética para el puma. El conocimiento de su distribución geográfica actual, así como de la variabilidad y la estructura genética de sus poblaciones, constituyen un importante marco de partida para la toma de decisiones en términos de manejo y/o control de la especie, tendientes a evitar los conflictos con el hombre, la caza indiscriminada, y/o la translocación sin fundamento de animales. Con este objetivo, se usará un marcador molecular previamente utilizado para este tipo de estudios en puma (ND5), y se propone el desarrollo de un nuevo par de *primers* para Región Control, ya que en la actualidad sólo se dispone de aquellos publicados por Culver y colaboradores



(2008), los cuales permiten la amplificación de un fragmento muy corto de dicha región. De esta manera esperamos obtener información poblacional y filogenética valiosa para las poblaciones de pumas de la Patagonia argentina.

## **2. HIPÓTESIS**

- **Hipótesis 1:** Dada la amplia distribución geográfica de *Puma concolor*, así como la fragmentación de su ambiente natural, las poblaciones de pumas de la Patagonia argentina presentan una divergencia genética significativa de otras poblaciones geográficamente distantes a lo largo de su distribución geográfica completa.
- **Hipótesis 2:** Dadas las características comportamentales observadas para *Puma concolor* (gran capacidad de dispersión y amplios tamaños de área de acción), las poblaciones patagónicas de puma muestran baja variación genética a nivel regional.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

A través del presente trabajo se propone caracterizar e identificar patrones de variabilidad genética en poblaciones de pumas de la Patagonia argentina mediante el uso de marcadores moleculares mitocondriales.

### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Generar una base de datos de distribución, así como de datos (tejido y ADN) para los pumas (*Puma concolor*) de la Patagonia.

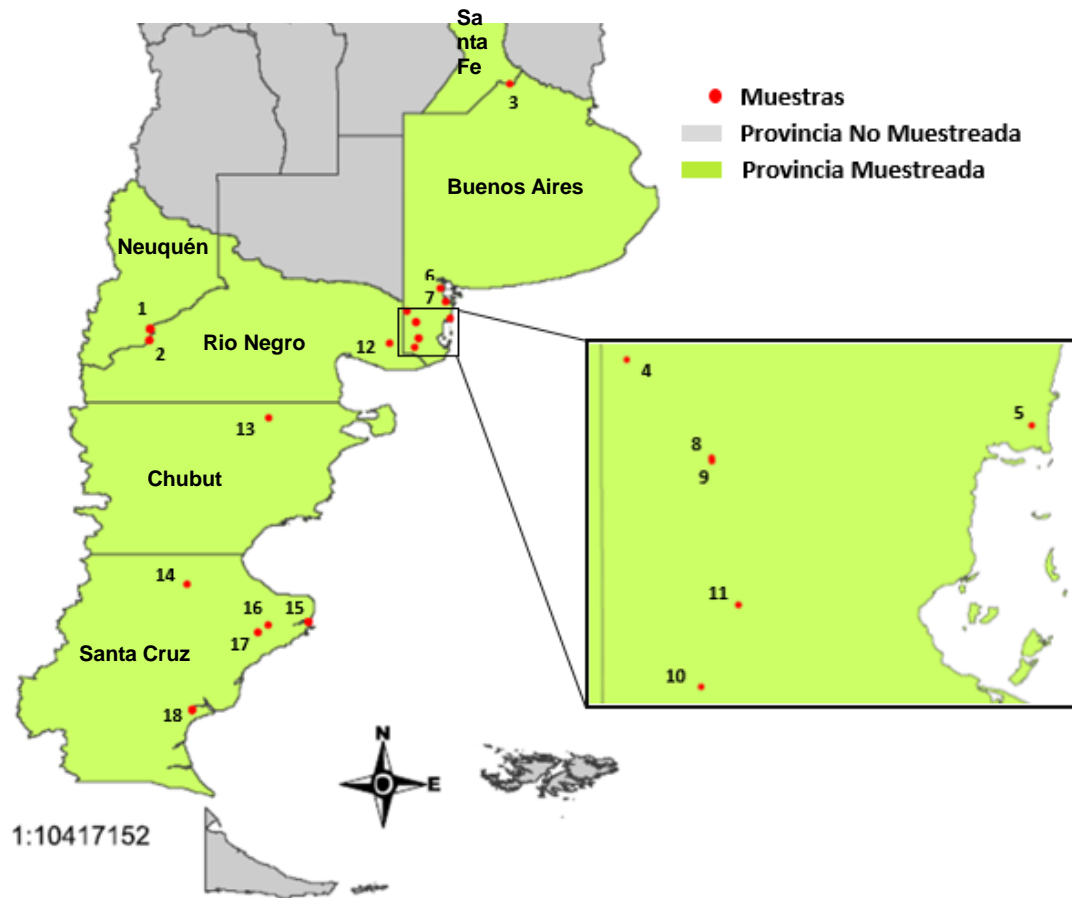
2. Caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones patagónicas de puma a través de los marcadores mitocondriales ND5 y región control.
3. Establecer las relaciones filogenéticas entre sus poblaciones, y otras de la misma especie a lo largo de su distribución geográfica.
4. Desarrollar un nuevo par de *primers* para la región control mitocondrial.
5. Caracterizar la estructura molecular para el fragmento de la región control mitocondrial analizada.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Obtención de muestras**

El trabajo se desarrolló a partir de muestras de tejido (piel y pelos) y de fecas pertenecientes a distintas poblaciones de puma del centro y Sur de Argentina, colectadas en las provincias de Neuquén (Collón Curá, n=18), Santa Cruz (Puerto Deseado, n=10 y Corpen Aiken, n=5), Chubut (Telsen, n=1), Rio Negro (Adolfo Alsina, n=1), Santa Fe (Constitución, n=1) y Buenos Aires (Villarino, n=3; Patagones, n=8) (Figura 5). Dichas muestras han sido recuperadas de la caza legal e ilegal de pumas, a partir de los propios cazadores, o cedidas por distintas entidades, tales como el Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), el Centro de Investigaciones Puerto Deseado (UNPA) y el Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) en Bahía Blanca. Para cada muestra se cuenta con información georreferenciada de la provincia, departamento y localidad de colecta (Tabla 1). Las muestras fueron depositadas en el banco de muestras del Centro de

Bioinvestigaciones (CeBio, CIC/UNNOBA) y conservadas en alcohol 96° en freezer (-20°C) para su posterior utilización.



**Figura 5.** Localidades de muestreo (1-18) de *Puma concolor* incluidas en este estudio: 1. Ancatruz; 2. Estancia Campanario; 3. General Gelly; 4. Pedro Luro; 5. Juan A. Pradere; 6. Teniente Origone; 7. Mayor Buratovich; 8-9. Villalonga; 10. Cardenal Cagliero; 11. Stroeder; 12. Estancia Melipal; 13. Telsen; 14. Estancia El Porvenir; 15. Puerto Deseado; 16. Estancia El Recuerdo; 17. Estancia El Águila; 18. Estancia La Suerte. Las provincias muestreadas se identifican en color verde.

**Tabla 1.** En la tabla se indica para cada provincia muestreada, el departamento, localidad y coordenadas geográficas de los sitios de colecta, así como el número de muestras colectadas en cada sitio (N) y la identificación de los mismos (ID) en el mapa.

Provincia	Departamento	Localidad	N	Latitud	Longitud	ID Mapa
Santa Fé	Constitución	General Gelly	1	-33.599722	-60.59777000	1
Buenos Aires	Villarino	Teniente Origone	1	-38.979052	-62.42995407	2
		Mayor Buratovich	1	-39.329297	-62.28769655	3
		Juan Pradere	1	-39.765117	-62.17107597	4
	Patagones	Pedro Luro	1	-39.573699	-63.31194033	5
		Villalonga 1	1	-39.859533	-63.07295315	6
		Villalonga 2	2	-39.868801	-63.07206262	7
		Cardenal Cagliero	1	-40.527496	-63.10209062	8
		Stroeder	3	-40.288579	-62.99736470	9
	Neuquén	Collón Curá	Estancia Campanario	13	-40.050277	-70.07777780
Ancatrú			5	-40.341944	-70.10333333	11
Río Negro	Adolfo Alsina	Estancia Melipal	1	-40.421902	-63.76350000	12
Chubut	Telsen	Telsen	1	-42.383333	-66.95000000	13
Santa Cruz	Puerto Deseado	Estancia El Porvenir	1	-46.763475	-69.10313333	14
		Puerto Deseado	6	-47.751388	-65.90141670	15
		Estancia El Recuerdo	1	-47.840000	-66.97000000	16
		Estancia El Águila	2	-48.030000	-67.24000000	17
	Corpen Aiken	Estancia La Suerte	5	-50.070000	-68.97000000	18

## **4.2 Actividades de Laboratorio**

### **4.2.1 Extracción de ADN**

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de extracción con CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Las muestras de ADN fueron rotuladas y almacenadas en un *freezer* a -20°C.

La eficiencia en la extracción se verificó utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa/ 100 ml de TBE) teñido con bromuro de etidio, sometido a 100 volts durante 40 minutos, y finalmente visualizado bajo luz ultravioleta. En cada calle del gel se sembraron 3 µl de muestra junto a 3 µl de buffer de siembra *DNA del-loading dye* con el fin de identificar el frente de corrida.

### **4.2.2 Obtención y amplificación de los fragmentos génicos mitocondriales**

#### **4.2.2.1 NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5)**

Se realizó la amplificación de un fragmento génico correspondiente al gen de ND5 (aproximadamente 750 pb) utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante los *primers*: *Forward*: ND5-DF1 (5'-TTGGTGCAACTCCAAATAAAAAGT-3') y *Reverse*: ND5-DR1 (5'-AGGAGTTGGGCCTTCTATGG-3') (Trigo *et al.*, 2008).

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl, conteniendo 10 µl de ADN (entre 25 y 100 ng); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada uno de los *primers*; 0,2 mM de dNTPs; *buffer* de reacción 1X; 0,5U de Taq T-Plus DNA

polimerasa (INBIO) y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final.

Las condiciones de amplificación cargadas al termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD) fueron las descritas por Tchaicka y colaboradores (2007), comprendiendo las siguientes etapas de reacción:

- Desnaturalización inicial: 94°C por 5 minutos,
- 10 ciclos (*touchdown*) de:
  - Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos;
  - *Annealing*: 60-51°C por 45 segundos;
  - Extensión a 74°C por 1,5 minutos.
- 30 ciclos de:
  - Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos;
  - *Annealing*: 50°C por 30 segundos;
  - Extensión: 74°C por 1,5 minutos.
- Extensión final: 74°C durante 5 minutos.

#### **4.2.2.2 Región Control**

##### **4.2.2.2.1 Diseño de *primers* para un fragmento de la Región Control mitocondrial**

Para el diseño de los *primers* se llevó a cabo un alineamiento múltiple mediante el programa BioEdit (Hall, 2004) utilizando una secuencia completa del genoma mitocondrial de *Puma concolor* y secuencias de guepardo (*Acinonyx jubatus*) y jaguar (*Panthera onca*); todas obtenidas del GenBank (JN999997.1, AH009755.2 y AF348641.1; respectivamente). Los resultados se

visualizaron en el mismo programa en búsqueda de regiones conservadas. Por último, se utilizaron estas regiones para diseñar los *primers* correspondientes que se pusieron a prueba con el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Finalmente se diseñó *de novo* el *primer forward* (PCRC.F) y se utilizó como *reverse* el primer DLUP4, descrito por Culver y colaboradores (2008).

#### 4.2.2.2.2 Condiciones de Amplificación

A partir del *primer forward* diseñado, PCRC.F (5'-CCAATACCAGAAACCAACC-3'), y el *reverse* tomado de Culver y colaboradores (2008), DLUP4 (5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3'), se amplificó un fragmento de aproximadamente 738 pb correspondiente a la Región Control mitocondrial.

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl, conteniendo 10 µl de ADN (entre 25 y 100 ng); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada uno de los *primers*; 0,2 mM de dNTPs; *buffer* de reacción 1X; 0,5U de Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final.

Las condiciones de amplificación cargadas al termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD) para la amplificación del fragmento de interés, comprendió las siguientes etapas de reacción:

- Desnaturalización inicial: 94°C por 2 minutos,
- 30 ciclos de:
  - Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos;
  - *Annealing*: 62°C por 45 segundos;

- Extensión a 74°C por 1,5 minutos.
- Extensión final: 74°C durante 10 minutos.

#### **4.2.3 Verificación de la eficiencia de la amplificación**

El resultado de la amplificación se visualizó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb de precisión (Productos Bio-Lógicos) para inferir el tamaño de los fragmentos amplificados. La concentración de ADN en cada caso se determinó a través del programa ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004).

Los productos de PCR con concentraciones menores a 25 ng fueron amplificados nuevamente con el fin de obtener la concentración mínima requerida para su posterior secuenciación.

#### **4.2.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados**

Los productos amplificados fueron purificados a través de métodos enzimáticos, utilizando 10U de Exonucleasa I (Thermo Scientific) y 1U de FastAP Fosfatasa alcalina termosensible (Thermo Scientific). Las muestras se incubaron con las enzimas a 37°C durante 15 minutos y luego a 85°C por otros 15 minutos para detener la reacción enzimática. Para este procedimiento se utilizó el termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD).



Una vez purificados, los amplificones fueron secuenciados por la Empresa MACROGEN (Corea) a través del secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

### **4.3 Análisis de las secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y corregidas usando el programa *BioEdit* (Hall, 2004). Para cada set de secuencias (ND5 y RC) se realizó un alineamiento múltiple junto a otras secuencias homólogas de *Puma concolor* obtenidas del *GenBank* (Tabla 2 y 3), a través del algoritmo ClustalX del programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

#### **4.3.1 NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5)**

Para los análisis a partir de este marcador se utilizó el set completo de secuencias obtenidas en este estudio (n=47), junto con secuencias tomadas de la base de datos *GenBank* (n=28), pertenecientes al mismo fragmento del gen mitocondrial ND5 de *Puma concolor*. Las mismas pertenecen al grupo de 28 haplotipos obtenidos por Matte y colaboradores (2013) para todo el continente americano incluyendo la región central y Sur de Argentina. Como *outgroup* se utilizaron secuencias pertenecientes al jaguar (*Panthera onca*), al gato doméstico (*Felis catus*) y al yaguarundí (*Puma yagouaroundi*) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Lista de las secuencias para el fragmento de ND5 tomadas de *GenBank* para *Puma concolor*, *Felis catus*, *Panthera onca* y *Puma yagouaroundi*. Se pueden observar los números de acceso a la base de datos *Genbank* (ID *Genbank*) y la referencia correspondiente a cada entrada.

<b>Especie</b>	<b>ID <i>Genbank</i></b>	<b>Haplotipo</b>	<b>Fuente</b>
<i>Puma concolor</i>	KF460496.1	Hap01	Matte <i>et al.</i> , 2013
	KF460497.1	Hap02	
	KF460498.1	Hap03	
	KF460499.1	Hap04	
	KF460500.1	Hap05	
	KF460501.1	Hap06	
	KF460502.1	Hap07	
	KF460503.1	Hap08	
	KF460504.1	Hap09	
	KF460505.1	Hap10	
	KF460506.1	Hap11	
	KF460507.1	Hap12	
	KF460508.1	Hap13	
	KF460509.1	Hap14	
	KF460510.1	Hap15	
	KF460511.1	Hap16	
	KF460512.1	Hap17	
	KF460513.1	Hap18	
	KF460514.1	Hap19	
	KF460515.1	Hap20	
	KF460516.1	Hap21	
	KF460517.1	Hap22	
	KF460518.1	Hap23	
	KF460519.1	Hap24	
	KF460520.1	Hap25	
	KF460521.1	Hap26	
	KF460522.1	Hap27	
	KF460523.1	Hap28	
<i>Puma yagouaroundi</i>	AY463959.1		Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Felis catus</i>	KP279619.1		Koch <i>et al.</i> , 2015
<i>Panthera onca</i>	NC_022842.1		Caragiulo <i>et al.</i> , 2014

A partir de estas secuencias se generaron árboles filogenéticos a través del método del vecino más cercano (NJ) y máxima verosimilitud (ML), empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA6, y el modelo evolutivo de Tamura Nei (Tamura *et al.*, 2013). La determinación de los límites de confianza para la monofilia de cada nodo, se realizó a través de un análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Se generó un tercer árbol filogenético utilizando el método de inferencia bayesiana con el programa BEAST 1.8.1 (Drummond y Rambaut, 2007), a partir de un árbol de especiación Yule y un reloj molecular relajado (*uncorrelated lognormal*) con una tasa de mutación para el segmento (ND5) analizado de 2,054% por millón de años (Matte *et al.*, 2013). La búsqueda se realizó con el modelo HKY+G, inferido para todo el set de datos mediante el programa jModelTest (Posada, 2008), utilizando 30 millones de generaciones, tomando árboles cada mil generaciones. Las corridas independientes fueron resumidas en TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond y Rambaut, 2007); los primeros 3.000 árboles (el 10%) fueron descartados y los restantes se utilizaron para visualizar el árbol en FigTree 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

La variabilidad genética fue estimada a través de dos índices: el número de sitios polimórficos, y el número de haplotipos utilizando el programa DNASP5 (Librado y Rozas, 2009).

Las relaciones haplotípicas fueron obtenidas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa Network 4.6.1.2. ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)).

### 4.3.2 Región Control

#### 4.3.2.1 Estructura del fragmento de Región Control

Se analizaron 10 muestras provenientes de Neuquén, n=2; Santa Cruz, n=4; Chubut, n=1 y Buenos Aires, n=3; para hacer la caracterización de un fragmento de aproximadamente 620 pb de la región control mitocondrial teniendo en cuenta los sitios variables y las zonas repetitivas para dicho fragmento génico.

#### 4.3.2.2 Variabilidad Genética y Distribución Haplotípica

Para el mismo set de muestras de RC (n=10) se analizó un fragmento homólogo de aproximadamente 130pb. En el análisis se incluyeron además 3 secuencias de *Genbank* correspondientes a los 3 haplotipos registrados para el mismo fragmento del genoma mitocondrial (Haplotipos A, B y C), y secuencias de *Acinonyx jubatus* y *Panthera onca* como grupo externo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Lista de las secuencias para el fragmento de Región Control (130 pb) tomadas de *GenBank* para *Puma concolor*, *Acinonyx jubatus* y *Panthera onca*. Se pueden observar los números de acceso a la base de datos *Genbank* (*ID Genbank*) y la referencia correspondiente a cada entrada.

<b>Especie</b>	<b>ID Genbank</b>	<b>Variantes Haplotípicas</b>	<b>Fuente</b>
<i>Puma concolor</i>	EU258953.1	Haplotipo A	<i>Culver et al., 2008</i>
	EU258954.1	Haplotipo B	
	EU258955.1	Haplotipo C	
<i>Acinonyx jubatus</i>	AH009755.2		<i>Eizirik et al., 2001</i>
<i>Panthera onca</i>	AF348641.1		<i>Freeman et al., 2001</i>

La variabilidad genética fue estimada a través de dos índices: el número de sitios polimórficos, y el número de haplotipos utilizando el programa DNASP5 (Librado y Rozas, 2009).

La distribución geográfica y frecuencia de los haplotipos fueron obtenidas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa Network 4.6.1.2. ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Procesamiento de las Muestras

A pesar del mal estado de conservación en el que se encontraba gran parte de las muestras de tejido, la extracción de ADN fue muy efectiva, pudiéndose usar la totalidad de las muestras.

### 5.2 Análisis de los Datos

#### 5.2.1 NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5)

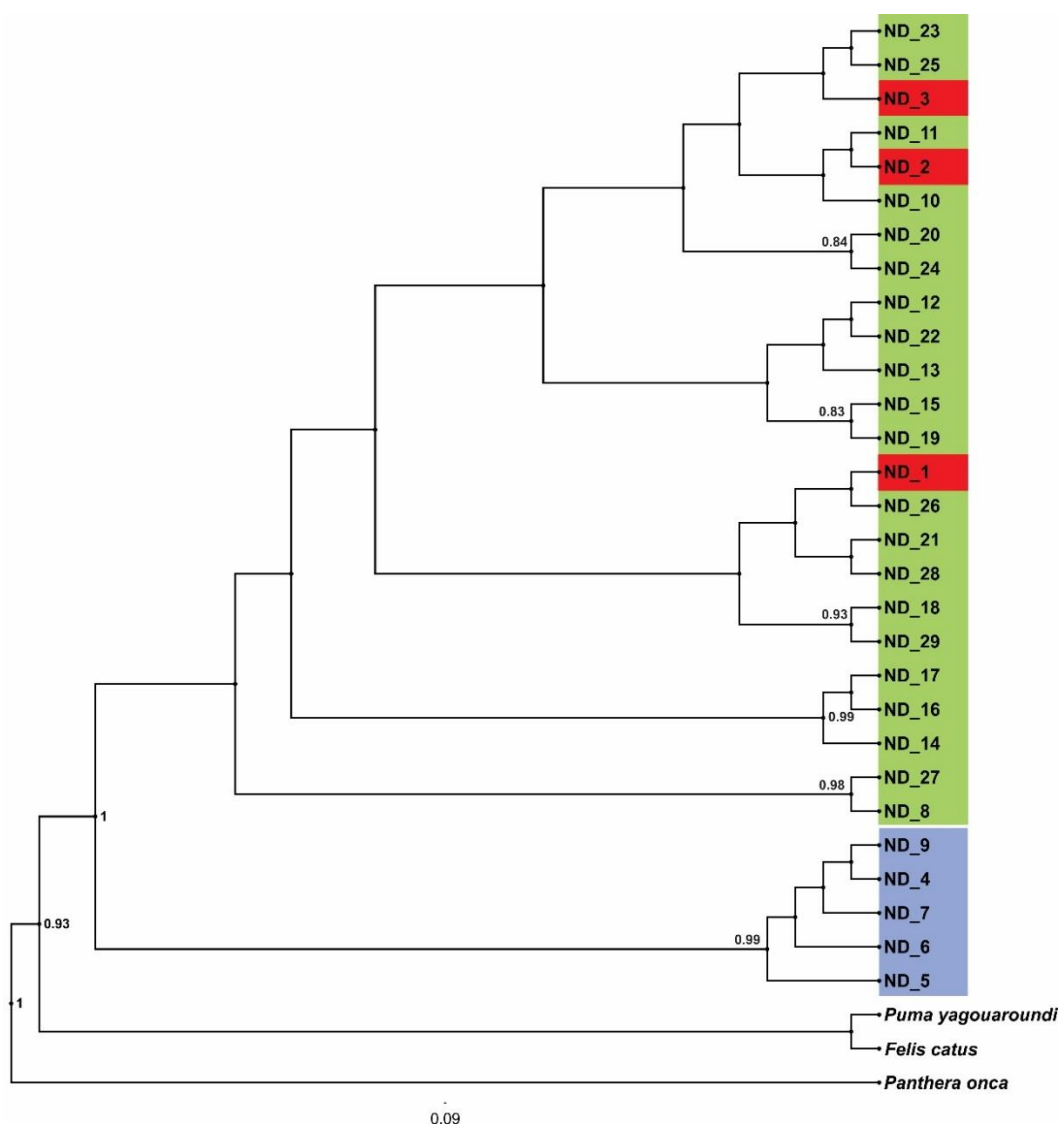
Para las 47 muestras pertenecientes a las poblaciones de puma del centro y Sur de Argentina analizadas se obtuvieron 5 sitios polimórficos y 3 haplotipos distintitos, de los cuales 2 fueron registrados previamente en el trabajo de Matte y colaboradores (2013), obteniéndose un haplotipo no registrado hasta el momento. Cuando se incluyeron los 28 haplotipos depositados en el *GenBank* a los análisis de variabilidad, se observó un total de 34 sitios variables y 29 haplotipos diferentes (Tabla 4).

**Tabla 4.** Sitios variables observados para los 29 haplotipos obtenidos para el fragmento (623 pb) del gen ND5 en muestras de *P. concolor* (n=47) Los códigos de los grupos geográficos son: NA + NCA: Norteamérica + Norte de Centroamérica; SCA: Sur de Centroamérica; NSA: Norte de Sudamérica; CNESA: Centro-Norte-Este de Sudamérica; ESA: Este de Sudamérica; CSSA: Centro-Sur de Sudamérica; SWSA: Sudoeste de Sudamérica; PROPIAS: las obtenidas para este estudio. Se indica en recuadro rojo los 3 haplotipos (ND\_1, ND\_2 y ND\_3) que contienen muestras provenientes de este trabajo. El asterisco hace referencia al haplotipo no publicado hasta el momento.



### 5.2.1.1 Análisis filogenético

Los árboles obtenidos a partir de las metodologías de máxima verosimilitud (ML), método del vecino más cercano (NJ) e inferencia bayesiana, para el fragmento de 623pb del gen ND5, fueron congruentes entre sí, por lo tanto, se presenta únicamente la filogenia obtenida a partir de inferencia bayesiana (Figura 6).



**Figura 6.** Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de inferencia bayesiana a partir de los haplotipos obtenidos para el gen ND5 correspondientes a los individuos muestreados en Neuquén, Santa Fe, Santa Cruz, Chubut, Rio Negro y Buenos Aires, los 28 haplotipos de *P. concolor* del trabajo de Matte y colaboradores (2013) y los outgroups (*Puma yagouaroundi*, *Panthera onca* y *Felis catus*). Los números en los

nodos indican la probabilidad posterior (se muestran solo valores mayores a 0,5). En azul se indica el clado que agrupa a los haplotipos de América del Norte y la mayoría de América Central y en verde el clado que reúne a los de América del Sur. En rojo los haplotipos ND\_1, ND\_2 y ND\_3 obtenidos para nuestro set de secuencias. La identificación de los haplotipos y sus números de acceso al *GenBank* se encuentran en la Tabla 2.

Las secuencias analizadas para el set completo de muestras convergen en tres haplotipos (ND\_1, ND\_2 y ND\_3), los cuales se agrupan en el clado correspondiente a América del Sur.

Las reconstrucciones filogenéticas muestran que los haplotipos de América del Norte se agrupan en un clado separado de los haplotipos de América del Sur con el máximo valor de probabilidad posterior (1). América Central presenta haplotipos filogenéticamente emparentados tanto con América del Norte (ND\_9) como con América del Sur (ND\_8). Por otra parte, no se verifica una estructuración por regiones dentro del clado sur.

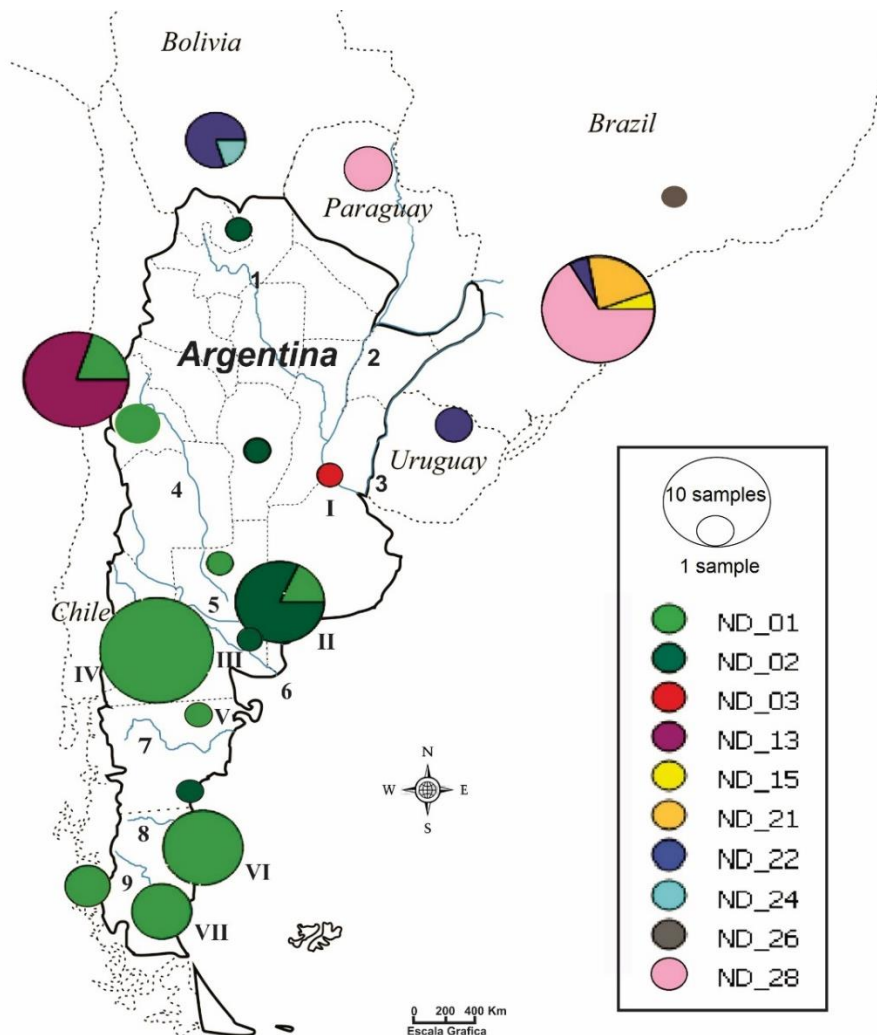
En nuestra reconstrucción filogenética se observa a *Puma yagouaroundi* y *Felis catus* como especies más cercanas a *Puma concolor* (con un valor de probabilidad posterior de 0,93).

### **5.2.1.2 Distribución geográfica de los haplotipos**

La totalidad de las muestras analizadas en este trabajo corresponden a tres haplotipos, de los cuales dos (ND\_1 y ND\_2) ya han sido reportados previamente para el centro y sur de la Argentina (Matte *et al.*, 2013) y uno no había sido registrado hasta el momento (ND\_3) (Figura 7).



Para la provincia de Santa Cruz se encontró un único haplotipo (ND\_1) registrado como el de mayor frecuencia para el sur de la Patagonia. En la provincia de Chubut encontramos este mismo haplotipo (ND\_1) distinto al descrito por Matte y colaboradores (2013) para esa provincia (ND\_2). En Neuquén se encontró un único haplotipo (ND\_1) ya descrito por Tintorelli (2017). En Rio Negro se encontró el haplotipo ND\_2. En Buenos Aires se encontraron dos haplotipos ND\_1 y ND\_2. En Santa Fe se encontró un haplotipo (ND\_3) que, como ya se mencionó, se describe por primera vez en el presente trabajo.



**Figura 7.** Distribución geográfica de los haplotipos para las secuencias del fragmento del gen ND5 (623 pb) de los individuos de Neuquén, Santa Cruz, Santa Fe, Buenos Aires, Chubut y Río Negro y las pertenecientes al sur de América del trabajo de Matte y colaboradores (2013). El diámetro de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Las localidades estudiadas en este trabajo se identifican con números romanos: **I:** Santa Fe; **II:** Buenos Aires; **III:** Río Negro; **IV:** Neuquén; **V:** Chubut; **VI y VII:** Santa Cruz. Los ríos más importantes se identifican con números arábigos: **1:** Río Salado; **2:** Río Paraná; **3:** Río Uruguay; **4:** Río Desaguadero; **5:** Río Colorado; **6:** Río Negro; **7:** Río Chubut; **8:** Río Deseado; **9:** Río Chico.

### **5.2.1.3 Relaciones haplotípicas**

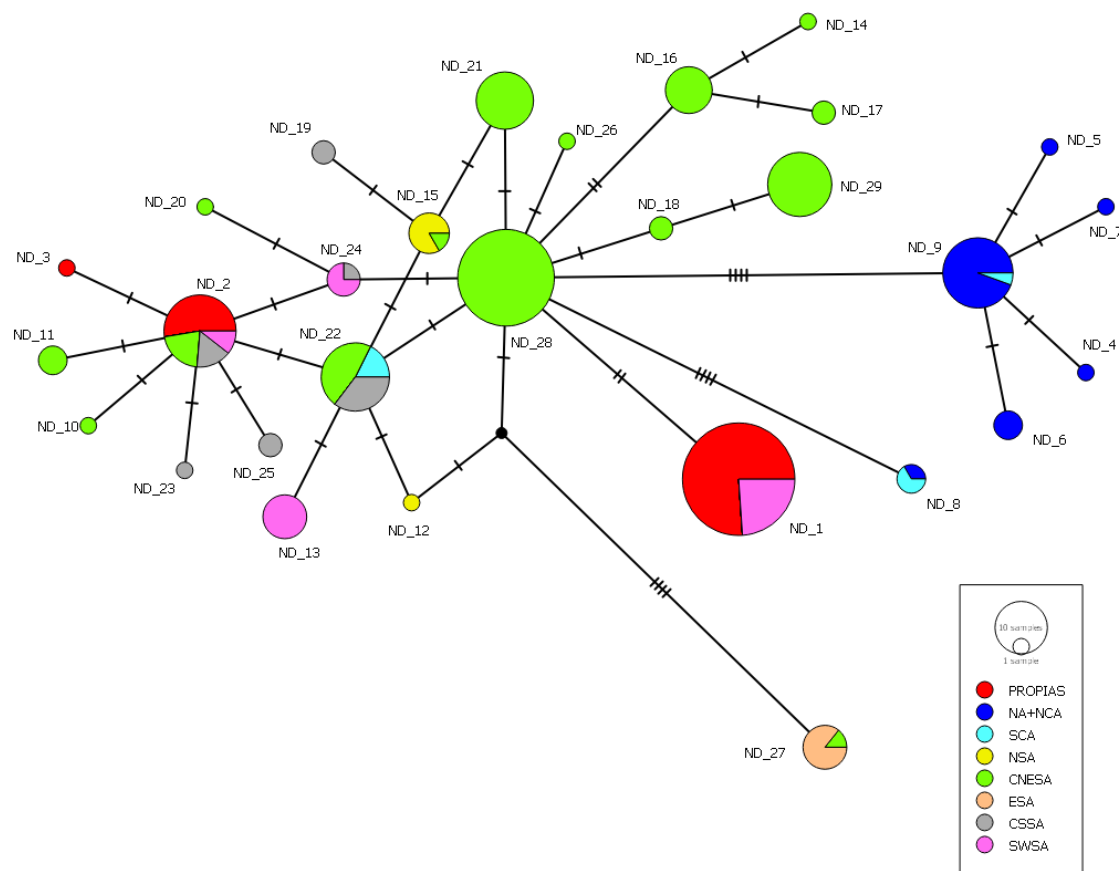
Las relaciones haplotípicas para el set completo de haplotipos de ND5, se muestran en la Figura 8.

De los 29 haplotipos obtenidos para el fragmento de 623pb del gen ND5 estudiado, 23 se encuentran en América del Sur (ND\_1 al ND\_3 y ND\_10 al ND\_29), siendo el ND\_22 compartido con América Central.

El haplotipo ND\_28 es el central de la red y el más representativo del centro-Norte-Este de América del Sur. Este se conecta con el ND\_9 por medio de 4 mutaciones, que es el más representativo de América Central y América del Norte. ND\_9 se conecta con ND\_4, ND\_5, ND\_6 y ND\_7 a través de una única mutación puntual. El haplotipo ND\_8 a pesar de encontrarse en América Central y del Norte (Panamá, Costa Rica y península de Florida) difiere en 8 pasos mutacionales del ND\_9 y en sólo 4 pasos del haplotipo sudamericano más frecuente ND\_28.

En la región central de América del Sur (CNESA, ESA y CSSA), que abarca a Bolivia, Paraguay, Uruguay, el noreste de Argentina y el centro-oeste

y sur de Brasil, es donde se encontró el mayor número de haplotipos (n=18). Un caso especial lo constituye el haplotipo ND\_27, muestreado en el centro-sur de Brasil, y que se encuentra a 5 pasos mutacionales de su haplotipo más cercano, lo que es equivalente a la distancia genética observada entre los linajes sudamericanos y la mayoría de las muestras de América Central y del Norte.

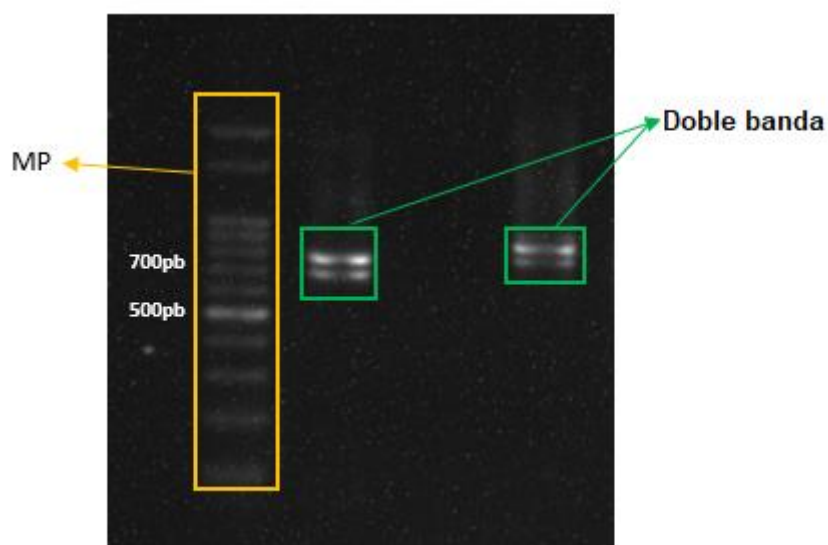


**Figura 8.** Relaciones haplotípicas obtenidas para las secuencias del fragmento del gen ND5 (623 pb) de los individuos de Neuquén, Santa Cruz, Santa Fe, Bueno Aires, Chubut y Rio Negro y las pertenecientes al trabajo de Matte y colaboradores (2013). El diámetro de los círculos refleja la frecuencia de cada haplotipo La longitud de las líneas de unión es proporcional al número de mutaciones existentes entre cada haplotipo.

## 5.2.2 Región Control (RC)

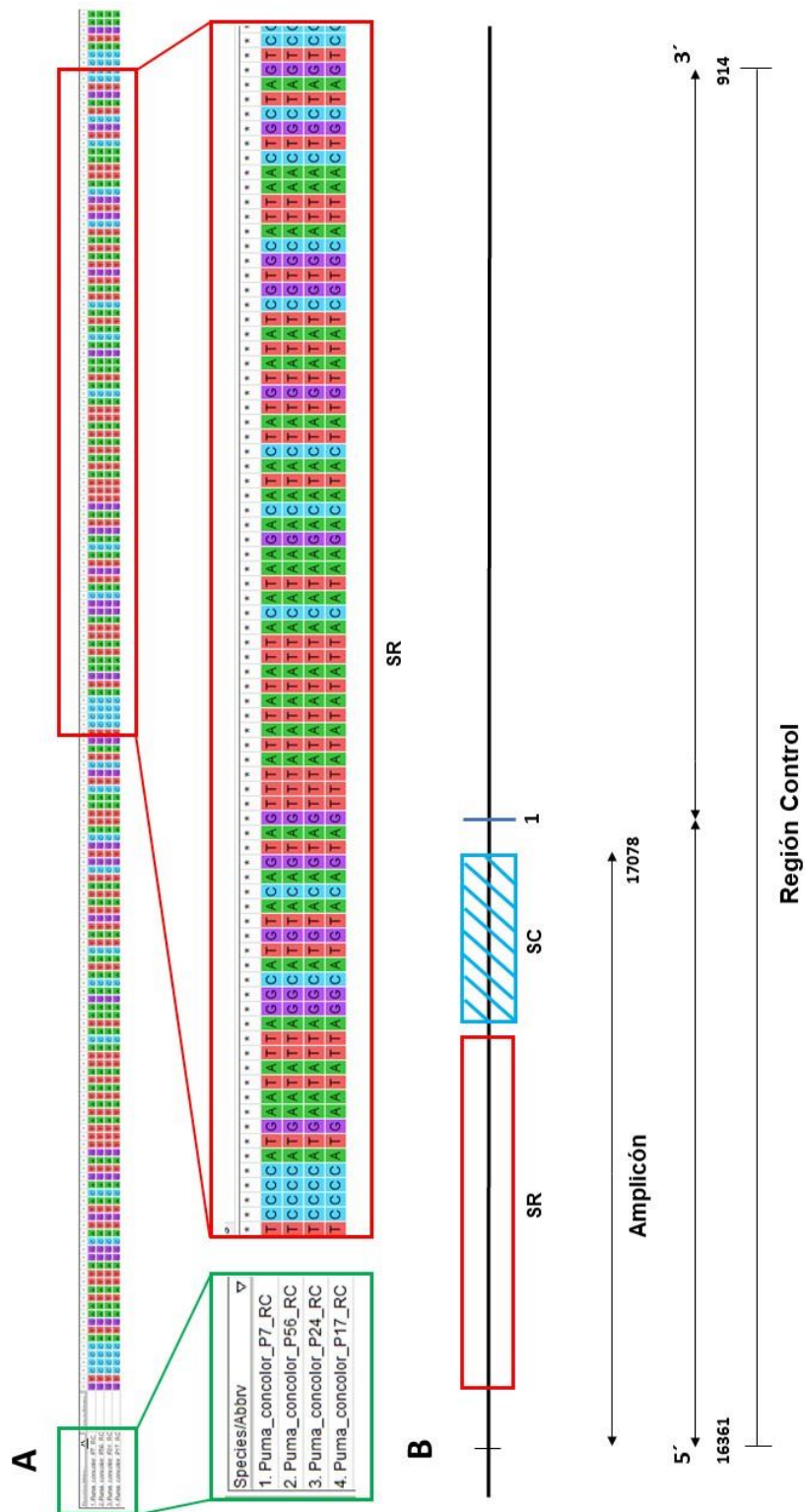
### 5.2.2.1 Estructura de Región Control mitocondrial

Los resultados de la amplificación con los *primers* (PCRC.F y DLUP4) fueron visualizados en un gel de agarosa, evidenciándose la presencia de dos bandas, dos productos obtenidos (Figura 9).



**Figura 9.** Imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. En el recuadro naranja se muestra el marcador de peso molecular (MP) y en verde se identifica la presencia de una banda extra como producto de la amplificación del fragmento de interés.

A partir del alineamiento de las 10 secuencias de Región Control (aproximadamente 620 pb) obtenidas se pudo observar la existencia de dos regiones bien diferenciadas. La primera corresponde a una región de secuencias repetitivas (SR) de 80 pb (Figura 10A) y la segunda a un segmento conservado (SC) (Figura 10B). El número de repeticiones del segmento de 80pb varió entre los individuos analizados.



**Figura 10.** A. Región del alineamiento de secuencias para RC donde se puede observar el segmento repetitivo (SR) de 80 pb (recuadro rojo). B. Esquema de la estructura de la porción 5' de Región control mitocondrial para *Puma concolor*. El

rectángulo celeste representa la región con el segmento conservado (SC) y el rectángulo rojo representa la porción con el segmento repetitivo (SR).

### 5.2.2.2 Variabilidad Genética

El alineamiento múltiple para el fragmento de Región Control (620pb) de las muestras de Neuquén (n=2); Santa Cruz (n=4); Chubut (n=1) y Buenos Aires (n=3) no pudo ser analizado ya que no se pudieron establecer regiones de homología entre los fragmentos comparados debido a la presencia de diferente número de repeticiones entre ellos. Por este motivo el análisis de la variabilidad genética fue realizado para un fragmento de 130pb, correspondiente a una región de homología entre las secuencias y utilizado en estudios anteriores (Culver *et al.*, 2008).

Para las 10 muestras analizadas se observaron tres sitios polimórficos que dieron como resultado 2 haplotipos no registrados previamente. Cuando se alinearon junto a los 3 haplotipos obtenidos del *GenBank*, (Tabla 3) se observaron ocho sitios variables (Tabla 5).

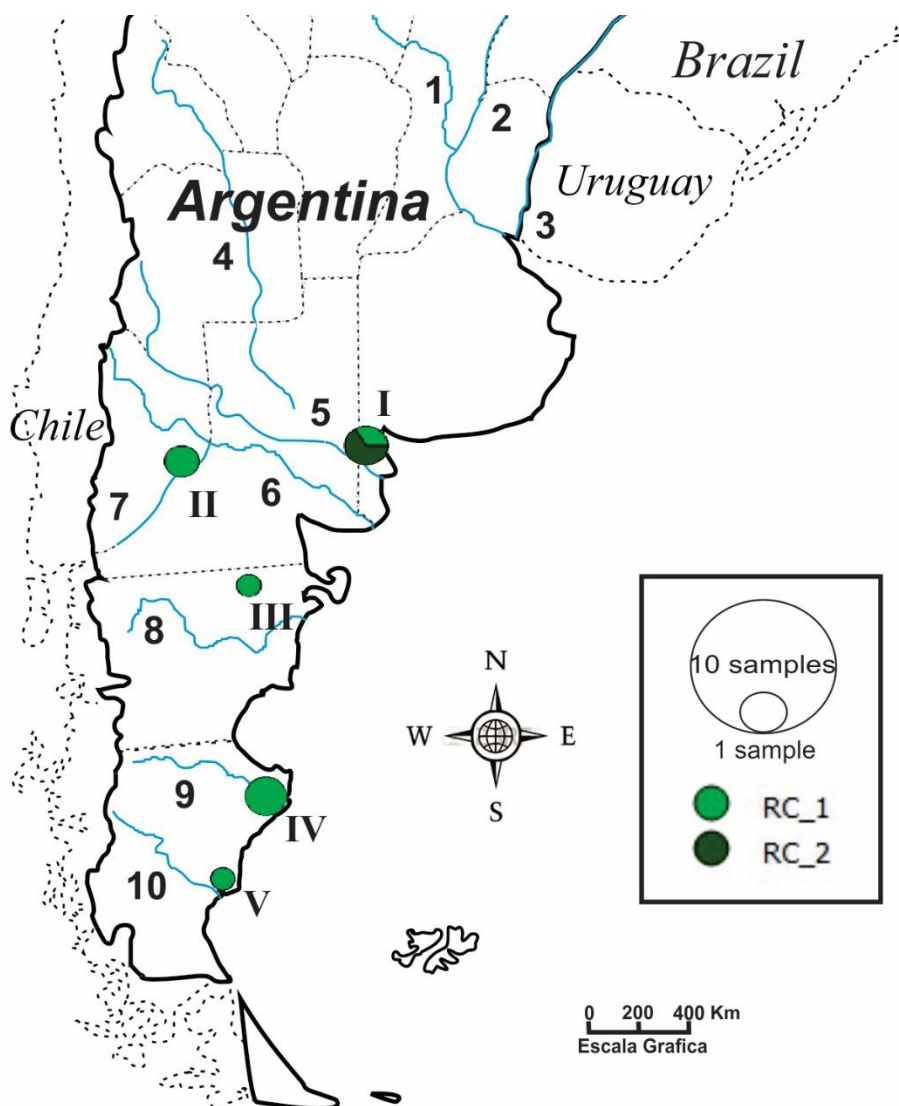
**Tabla 5.** Sitios variables observados para el fragmento (130 pb) de Región Control obtenido para nuestro conjunto de muestras de *P. concolor* (n=10; 2 haplotipos) y los 3 haplotipos reportados por Culver y colaboradores (2008). Los códigos de los grupos geográficos son: ARI(EEUU): Arizona, Estados Unidos; NY(EEUU): Nueva York, Estados Unidos; FLO(EEUU): Florida, Estados Unidos; PAT(ARG): Patagonia, Argentina; BA(ARG): Buenos Aires, Argentina. Se indica en azul los haplotipos (RC\_1 y RC\_2) observados para nuestras muestras, los cuales no habían sido reportados hasta el momento.

Haplotipos	Sitios Variables								Haplotipo x Region				ID Culver		
	004*	008*	016*	026*	050*	051*	090*	094*	N	ARI(EEUU)	NY(EEUU)	FLO(EEUU)		PAT(ARG)	BA(ARG)
RC_1	T	T	G	C	G	T	T	C	8	0	0	0	7	1	---
RC_2	C	C	A	.	.	.	.	.	2	0	0	0	0	2	---
RC_3	C	C	.	T	A	.	C	.	1	0	0	1	0	0	Hap_A
RC_4	C	C	.	T	A	C	C	.	1	4	0	0	0	0	Hap_C
RC_5	C	C	.	T	A	.	C	T	1	0	1	0	0	0	Hap_B

### 5.2.2.3 Distribución geográfica de los haplotipos

Las muestras analizadas en este trabajo (n=10) corresponden a dos haplotipos (RC\_1 y RC\_2) los cuales no habían sido registrados hasta el momento (Figura 11).

Para las provincias de Santa Cruz, Neuquén y Chubut se observó un único haplotipo (RC\_1), mientras que en Buenos Aires se encontraron dos haplotipos RC\_1 y RC\_2.



**Figura 11.** Distribución geográfica de los haplotipos para las secuencias del fragmento de RC (130 pb) de los individuos de Neuquén, Santa Cruz, Buenos Aires y Chubut con sus respectivas ubicaciones en el mapa. El diámetro de los círculos refleja la frecuencia de cada haplotipo. Los haplotipos por provincia se identifican con números Romanos: **I:** Buenos Aires; **II:** Neuquén; **III:** Chubut; **IV y V:** Santa Cruz. Los Ríos más importantes se identifican con número arábigos a: **1:** Río Salado; **2:** Río Paraná; **3:** Río Uruguay; **4:** Río Desaguadero; **5:** Río Colorado; **6:** Río Negro; **7:** Río Limay **8:** Río Chubut; **9:** Río Deseado; **10:** Río Chico.

## 6. DISCUSIÓN

Estos resultados nos permitieron ampliar el conocimiento en relación a los estudios realizados por Tintorelli (2017) acerca de la variabilidad genética en distintas poblaciones del puma en la Patagonia argentina, además de evaluar la estructura de un segmento de Región Control mitocondrial ya estudiado en otros felinos (López *et al.*, 199; Jae-Heup *et al.*, 2001).

El análisis filogenético realizado a partir de los haplotipos encontrados en nuestro trabajo y los 28 descriptos por Matte y colaboradores (2013) para el gen ND5 de *Puma concolor* agrupó con altos valores de probabilidad posterior a los haplotipos de América del Norte y la mayoría de América Central en un clado separado de los de América del Sur (Figura 6). Sin embargo, la estructuración dentro de Sudamérica no pudo sustentarse con valores aceptables, presentando inconsistencia en las relaciones jerárquicas entre los haplotipos tal como se muestran en la red haplotípica (Figura 8).

Estos resultados apoyan ambas hipótesis propuestas: las poblaciones de pumas de la Patagonia presentan divergencia genética respecto de otras



poblaciones geográficamente distantes como son las de Norteamérica y América Central, pero no a nivel regional.

De los tres haplotipos obtenidos para el gen ND5 (Tabla 4; Figura 7), el más frecuente fue el ND\_1, en concordancia con el haplotipo más frecuente descrito por Matte y colaboradores (2013) para la región pampeana. El mismo coincide con el único haplotipo encontrado para el sur de Chile (Vicuña, Cordilheiras Santiago, Coñaripe, Villarica, Punta Arenas y Angol) por lo que podemos inferir que la cordillera no sería una barrera al flujo génico (Matte *et al.*, 2013). Una evidencia de esto último, es aportada por Elbroch y colaboradores (2009), quienes capturaron y marcaron con radio-collar un individuo en la estancia Chacabuco (Chile), el cual es encontrado muerto cerca de Tuco Tuco (Santa Cruz, Argentina), por un ganadero de ovejas.

Tanto para la provincia de Chubut como en el sur de Buenos Aires se registran dos haplotipos, ND\_1 y ND\_2 y en la provincia de Rio Negro se encontró solo el haplotipo ND\_2 (Figura 7). Este conjunto de datos nos indicaría que el Rio Colorado no sería una barrera al flujo génico. Matte y colaboradores (2013) pusieron a prueba la eficacia de los ríos Amazonas y Paraná como barreras al flujo génico, tal como fue propuesto previamente por Culver y colaboradores (2000). Sus resultados apoyan un papel importante del rio Amazonas en la diferenciación genética de las poblaciones en ambos márgenes del mismo, y uno no tan importante (pero significativo) del rio Paraná. Esta discrepancia puede ser causa de la diferencia de caudal que tiene el Río Amazonas y Paraná en relación al Río Colorado.

A partir de los distintos puntos donde se encontró el haplotipo ND\_2 se podría decir que se ubica en una continuidad de ambientes que se conoce como el cordón árido conformado por las ecorregiones Gran Chaco, Monte y parte de la Estepa patagónica (Figura 7).

En la localidad de General Gelly, límite entre las provincias de Santa Fe y Buenos Aires se encontró un haplotipo no descrito hasta el presente. Por medio del contacto con pobladores pudimos averiguar que en los 90' se introdujeron algunos ejemplares de puma en una estancia en la localidad de Mariano Benítez, que pertenece a la provincia de Buenos Aires y limita con General Gelly. Debido a esto y a que no contamos hasta el momento con individuos del norte del territorio argentino no podemos confirmar que este individuo provenga de la población introducida en la zona o de ejemplares provenientes del norte de Santa Fe, donde hay registros frecuentes de esta especie (Pautasso, 2008). No se debe descartar la posibilidad que esta población esté relacionada con la reciente expansión del puma en la ecorregión pampeana. Esta colonización podría haber ocurrido desde el sur a partir del Sistema de Ventania donde ya se demostró la existencia de una población reproductiva de la especie (De Lucca, 2010), utilizando como medio de dispersión distintos cursos de agua (ríos, arroyos) (Dickson y Beier, 2007; LaRue y Nielsen, 2008; Thomposn y Jenkins, 2010). Otra posibilidad es que provengan de la población que se encuentra en la región conocida como Lagunas del Sur y Bañados del Saladillo, provincia de Córdoba (noroeste de la ecorregión) (Chimento y De Lucca, 2014). Según nuestros resultados es más probable que este nuevo haplotipo derive de poblaciones del norte (Córdoba), luego de un proceso de migración ya que, encontramos que este haplotipo

(ND\_3), se encuentra a 5 pasos mutacionales de las poblaciones de la Patagonia (ND\_1) y solo a una mutación puntual de diferencia con las poblaciones de Córdoba (ND\_2) (Matte *et al.*, 2013).

Por esta razón es de suma importancia intensificar el muestreo en la zona para poder dilucidar de donde proviene este individuo, estimar la frecuencia de este haplotipo en la población y comenzar a dilucidar como se es la dinámica de recolonización del centro y noroeste de la provincia de Buenos Aires.

Con respecto a los haplotipos de Región Control, las provincias de Neuquén, Chubut y Santa Cruz comparten el mismo Haplotipo (RC\_1). En Buenos Aires encontramos dos haplotipos, RC\_1 y RC\_2 (Figura 11). Se encontró una concordancia entre los marcadores, ya que los individuos que tienen el haplotipo RC\_1 son los mismos que tienen el haplotipo ND\_1 y los que tienen el haplotipo RC\_2 coinciden con los que tienen el haplotipo ND\_2.

Esta similitud entre los marcadores que podemos observar en la provincia de Buenos Aires y el hecho de que hay un gran número de mutaciones entre los haplotipos (4 mutaciones puntuales entre ND\_1 y ND\_2; 3 mutaciones entre RC\_1 y RC\_2) nos podría estar indicando que el sur de Buenos Aires está siendo recolonizado, por un lado por individuos desde sur de la Patagonia o desde La Pampa (haplotipo ND\_1) y o por individuos de Córdoba (haplotipo ND\_2). Según encuestas y entrevistas a los pobladores realizadas por De Luccas (2010), se supo que en la década del 1970 el Sistema de Ventania habría sido recolonizado a partir de pumas procedentes del distrito del Caldén en la provincia de La Pampa, los cuales habrían escapado de los grandes

incendios que tuvieron lugar en la provincia en 1973 (Medina, 2007). Esta repoblación fue facilitada por la abrupta caída de la producción ovina de esa época, lo que habría conllevado a un bajo conflicto entre el hombre y el animal (De Luccas, 2010). Por otro lado, Chimento y De Luccas (2014) evidencian migración desde el sur de la provincia de Córdoba.

Algo muy interesante a analizar a futuro es como el puma se está adaptando a los agroecosistemas ya que, por un lado, hay estudios que demuestran que los factores antrópicos parecen afectar fuertemente el uso del hábitat y los patrones de actividad del puma (Guerisoli et al., 2019). Por otro lado, existe evidencia de la presencia de esta especie en paisajes modificados por la actividad agrícola: De Lucca y Bollero (2011) indican la presencia de hembras reproduciéndose en campos de cultivos al sur de Santa Fe y contamos con registros fotográficos que muestran a un ejemplar descansando en un cultivo de maíz en la localidad de Rafael Obligado, provincia de Buenos Aires (Figura S1, Anexo).

La estructura de la Región Control mitocondrial fue similar a las encontradas en leones, leopardos, jaguares, tigres y leopardos de las nieves (Jae-Heup *et al.*, 2001) y a la descritas en el gato doméstico (López *et al.*, 1997). Reconocimos varios segmentos descritos anteriormente, como una región con repeticiones de un segmento de 80 pb y una región conservada.

Tanto lo observado en el gel de agarosa (Figura 9), como las diferencias en el número de repeticiones observadas en las secuencias de los distintos individuos puede significar la presencia de heretoplasma de longitud de la Región Control mitocondrial tanto dentro como entre los individuos, ya

mencionadas en otros felinos (Figura 10) (López *et al.*, 1997; Jae-Heup *et al.*, 2001). Por esta razón no se pudieron establecer regiones de homología entre los fragmentos comparados y como consecuencia, no fue posible utilizar el fragmento completo para realizar el estudio de variabilidad genética. Por esto se utilizó sólo el segmento conservado (SC). Esta heteroplasma puede ocurrir por un derrape de la polimerasa en regiones repetitivas que puede resultar en un aumento o disminución en el número de repeticiones (Hauswirth *et al.*, 1984), por desalineaciones replicativas que resultan en la eliminación de alguna de estas repeticiones (Efstratiadis *et al.*, 1980) o por un modelo que implica un equilibrio competitivo entre la cadena pesada (H) y la cadena liviana (L) (Buroker *et al.*, 1990). La síntesis de la cadena *D-loop*, desplaza la cadena H (cadena pesada) de la cadena L (cadena ligera) (Clayton, 1982). La cadena *D-loop* se extiende desde CSB (*consensus sequence blocks*) hasta un punto corriente abajo de la secuencia TAS. Este modelo sugiere que la desalineación frecuente en la región de repetición antes de la elongación se debe a la presencia de múltiples secuencias TAS (*terminal associated sequences*), facilitada por una estructura secundaria estable en la cadena desplazada, puede ser la causante de la heteroplasma observada.

Aunque el presente estudio nos permite acercarnos un poco más a entender la situación del puma, tanto en lo referente a su distribución, su dinámica poblacional y al conflicto que genera en determinadas comunidades rurales donde es considerado una especie problema, se requiere un análisis más exhaustivo sobre un mayor número de individuos, y marcadores genéticos más variables (por ejemplo *loci* de microsatélites o chip de SNPs) a partir de los cuales poder realizar inferencias de la dinámica poblacional más robustas para

entender si estas poblaciones forman una metapoblación o se comportan como subpoblaciones (Sweaner *et al.*, 2000; Ernest *et al.*, 2002).

Esta información se considera prioritaria para la elaboración de un plan de manejo adecuado que permita garantizar tanto la preservación como el mantenimiento de la diversidad de la especie, así como también poder encontrar una solución viable al conflicto con los productores de animales.

## **7. CONCLUSIONES**

Hasta el presente contamos con una base de datos (Tejidos o heces y ADN) de más de 100 muestras provenientes del centro y sur de la Patagonia, pero solo se utilizaron 46 de ellas para este trabajo.

Para el gen mitocondrial ND5 se destaca la presencia de un haplotipo que no fue registrado hasta el momento. A partir de este resultado resulta de sumo interés conocer la frecuencia real del mismo en la región y su presencia en otras regiones del país. Por lo que se prevé el aumento de muestras en la zona.

Dada la amplia distribución del género *Puma* así como los diferentes procesos evolutivos que habrían actuado a través de la historia evolutiva de la especie, fue observada una clara diferenciación entre los clados norte y sur del continente americano. Si bien los resultados a nivel continental muestran una acentuada divergencia entre las poblaciones de la Patagonia y las del Centro y Norte de América, esto no fue observado en relación a los linajes de Sudamérica, lo que concuerda con nuestras hipótesis de trabajo. De todas maneras, esta baja divergencia entre los linajes sudamericanos puede deberse

al marcador molecular utilizado (ND5), el cual dado su moderado nivel de variación presenta limitantes para estudios de cuño poblacional.

Para el fragmento de Región Control fue posible diseñar un nuevo par de *primers*. Los mismos nos permitieron dilucidar parte de su estructura, observándose un segmento con repeticiones (SR) y un Segmento Conservado (SC). Este último nos permitió analizar las relaciones haplotípicas obteniendo resultados congruentes con los de ND5.

Por último, este trabajo sienta las bases para futuros estudios taxonómicos y filogenéticos incluyendo nuevas poblaciones de puma de la Argentina y marcadores más variables, con el fin de poder complementar los datos obtenidos y dilucidar la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones. Y de esta manera tener las herramientas para la toma de decisiones en términos de manejo y/o control de la especie.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

Abrámoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7):36-42.

Ackerman B. B., Lindzey F. G., Hemker T. P. 1984. Cougar food habits in Southern Utah. *J. Wildl. Manag*, 48: 147-155.

Anderson A. E. 1983. A critical review of literature on puma (*Felis concolor*). Colorado Division of Wildlife, Spec Rep. 54.

Aprile G., Cuyckens E., De Angelo C., Di Bitetti M., Lucherini N., Muzzachiodi N., Palacios R., Paviolo A., Quiroga V., Soler L. 2012. Familia: Felidae pp 92-101 en: Ojeda RA, Chillo V & Diaz Isenrath GB (Eds) Libro rojo de mamíferos amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Argentina pp257.

Aquadro C. F. y Greenberg B. D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103, 287–312.

Avise, J. C. 1987. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18:489-522.

Avise J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York.

Avise J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371- 379.

Avise J. C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.

Bandelt H. J., Foster P., Rohlf A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16:37-48.



Barnett R., Barnes I., Phillips M. J., Martin L. D., Harington C. R., Leonard J. A., Cooper A. 2005. Evolution of the extinct Sabretooths and the American Cheetahlike cat. *Curr Biol* 15(15): R589-R590.

Beier P. 1991. Cougar attacks on humans in the United States and Canada. *Wildlife Society Bulletin*, 19:403– 412.

Bellati J. y Von Thüngen J. 1990. Lamb predation in Patagonian ranches. Davis, L.R. y Marsh, R.E. (eds.). *Proceedings 14th Vertebrate Pest Conference*. University of California, Davis.

Brown W. M., George M. J. R., Wilson A. C. 1979. Rapid Evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 76, No. 4 pp. 1967-1971.

Brown W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. En MacIntyre, R. J., (ed.), *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York: 95-130.

Brown J. R., Beckenbach A. T., Smith M. J. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.* 10, 326–341.

Buroker N. E., Brown J. R., Gilbert T. A., Ohara P. J., Beckenbach A. T., Thomas W. K., Smith M. J. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial-DNA: An illegitimate elongation model. *Genetics* 124:157–163.

Cabrera A. 1961. Los félidos vivientes de la República Argentina. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Ciencias Zoológicas, 6(5): 161-247.

Canevari M. y Vaccaro O. 2007. Guía de mamíferos del sur de América del Sur. L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires, 424 pp.

Caso A., Lopez-Gonzalez C., Payan E., Eizirik E., de Oliveira T., Leite-Pitman R., Kelly M., Valderrama C., Lucherini M. 2008. *Puma concolor*. En: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

Castilho C. S., Marins-Sá L. G., Benedet R. C., Freitas T. O. 2010. Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. Mammal Biol 76:476-483.

Castro J. I. 2012. Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. Universidad de Barcelona. Facultad de biología. Departamento de genética. 1-178.

Centro Editor de América Latina. 1985. EL PUMA. Fauna Argentina. Fascículo 31. Buenos Aires.

Chaves P.B., Graeff V.G., Lion M.B., Oliveira L.R., Eizirik E. 2012. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. Mol Ecol Resour 12: 18–35.

Chebez J. C. 1994. Los que se van. Especies argentinas en peligro. Editorial Albatros, Buenos Aires. pp604.

Chebez J. C. 2009. Otros que se van. Fauna argentina amenazada. Editorial Albatros, Buenos Aires. pp552.

Chebez J. C. y Nigro N. A. 2010. Aportes preliminares para un plan de conservación y manejo del puma (*Puma concolor*) en la República Argentina. Informe para el Primer Taller de Conservación y Situación Actual del Puma, Fundación Cullunche, Red Argentina Contra el Tráfico Ilegal de Especies Silvestres y Secretaría de Medio Ambiente de la provincia de Mendoza. pp21.

Chimento N. R. y De Lucca E. R. 2014. El Puma (*Puma concolor*) recoloniza el Centro y el Este del Ecosistema de las Pampas. Historia Natural (Tercera serie), Vol. 4 (2): 13-51.

Clayton D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28, 693–705.

Crooks K. R. 2002. Relative Sensitivities of Mammalian Carnivores to Habitat Fragmentation. Conservation Biology, 16:488-502.

Culver M., Johnson W. E., Pecon-Slattery J., O'Brien S. J. 2000. Genomic ancestry of the American Puma (*Puma concolor*). J Hered 91:186-197.

Culver M., Hedrick P. W., Murphy K., O'Brien S., Hornocker M. G. 2008. Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *Animal Conservation*, 11: 104-110.

Currier M. J. P. 1983. *Felis concolor*. *Mammalian Species*, pp200.

da Fonseca R. R., Johnson W. E., O'Brien S. J., Ramos M. J., Antunes A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, 9:119.

De Lucca E. R. 2010. Presencia del Puma (*Puma concolor*) y Conflicto con el Hombre en las pampas Argentina. *Nótulas Faunísticas (segunda serie)*, 48:1-17.

De Lucca E. R. 2010. Presencia del Puma (*Puma concolor*) y Conflicto con el Hombre en el partido de Patagones, Buenos Aires, Argentina. *Nótulas Faunísticas (segunda serie)*, 67.

De Lucca E. R. y Bollero V. 2011. Nuevos registros del puma (*Puma concolor*) para el norte de la ecorregión pampeana. *Nótulas Faunísticas, segunda serie*, 83: 1-7.

Dickson B. G. y Beier, P. 2007. Quantifying the influence of topographic position on cougar (*Puma concolor*) movement in southern California, USA. *Journal of Zoology*, 271(3): 270-277.

Donadio E., Novaro A. J., Buskirk S. W., Wurstten A., Vitali M. S., Monteverde M. J. 2009. Evaluating a potentially strong trophic interaction: pumas and wild camelids in protected areas of Argentina. *J Zool*, 280: 33–40.

Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19:11-15.

Drummond A. y Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*, 7:214.

Efstratiadis A., Posakony J. W., Maniatis T., Lawn R. W., O'Connell C., Spritz R. A., Deriel J. K., Forget B. G., Weisman S. M., Slightom J. L., Blechi A. E., Smithies O., Baralle F. E., Shoulders C. C., Proudfoot N. J. 1980. The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. *Cell* 21: 653-668.

Elbroch L. M., Wittmer H. U., Saucedo C., Corti P. 2009. Long-distance dispersal of a male puma (*Puma concolor puma*) in Patagonia. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82:459-461.

Ernest H. B., Vickers T. W., Morrison S. A., Buchalski M. R., Boyce W. M. 2014. Fractured Genetic Connectivity Threatens a Southern California Puma (*Puma concolor*) Population. *PLoS ONE*, 9:1-12.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

Fernández C. S. y Baldi R. 2014. Hábitos alimentarios del Puma (*Puma concolor*) e incidencia de la depredación en la mortandad de guanacos (*Lama guanicoe*) en el Noreste de la Patagonia. Mastozoología Neotropical, 21(2):331-338.

Fitak R. R., Naidu A., Thompson R. W., Culver M. 2016. PumaPlex 1.0: a new panel of SNP markers for the genetic management of North American pumas. Journal of Fish and Wildlife Management, 7(1), 13-27

Forero-Medina G., Vinícius Vieira M., De Viveros Grelle C. E., Almeida P. J. 2009. Body size and extinction risk in Brazilian carnivores. Biota Neotropica 9(2):1-5.

García B. A., Zapata S. C., Procopio D. E., Martínez P. R., Travaini A. 2010. Evaluación del interés de productores ganaderos en el control selectivo y eficiente de predadores en la Patagonia Austral. Acta Zool. Mex., 26:303-321.

Guerisoli M., Caruso N., Luengos Vidal E. M., Lucherini M. 2019. Habitat use and activity patterns of *Puma concolor* in a human dominated landscape of central Argentina. Journal of Mammalogy, XX(X):1–10.

Guinness World Records 2004. 2004. Guinness World Records LTD. p. 49.

Haag T, Santos AS, De Angelo C, et al. (2009). Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. Genetica 136(3): 505-512.

Hall T. 2004. BioEdit 6.0.7. Department of Microbiology, North Carolina State University. From <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Hauswirth W. W. y Laipis P. J. 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4686-4690.

Hayes C. L., Rubin E. S., Jorgensen M. C., Botta R. A, Boyce W. M. 2000. Mountain lion predation of bighorn sheep in the Peninsular Ranges, California. Journal of Wildlife Management 64:954–959.

Heinonen Fortabat S. y Chebez J.C. 1997. Los mamíferos de los Parques Nacionales de la Argentina. Editorial L.O.L.A. Buenos Aires.

Hornocker M. y Negri S. 2010. Cougar: ecology and conservation. University of Chicago Press. Chicago, IL, 306 pp.

Iriarte J. A., Franklin W. L., Johnson W. E., Redford K. H. 1990. Biogeographic variation of food habits and body size of the America puma. Oecologia 85:185-190.

Iriarte J. A., Johnson W. E., Franklin W. L. 1991. Feeding ecology of the Patagonia puma in southernmost Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 64:145-156.

Iriarte A. 2008. Mamíferos de Chile. Lynx Ediciones, 420 pp.

Iriarte J. A. y Jaksic F. 2012. Los Carnívoros de Chile. Ediciones Flora y Fauna Chile y CASEB. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile pp257.

Iriarte J. A., Rau J. R., Villalobos R., Lagos N., Sade S. 2013. Revisión actualizada sobre la biodiversidad y conservación de los felinos silvestres de Chile. Boletín de Biodiversidad de Chile, 8:5-24.

Jae-Heup K., Eizirik E., O'Brien S. J., Johnson W. E. 2001. Structure and patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. Mitochondrion. 14: 279–292.

Janczewski D. N., Yuhki N., Gilbert D. A., Jefferson G. T., O'Brien S. J. 1992. Molecular phylogenetic inference from saber-toothed cat fossils of Rancho La Brea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. pp89, 9769–9773.

Johnson W. E., Culver M., Iriarte J. A., Eizirik E., Seymour K. L., O'Brien S. J. 1998. Tracking the Evolution of the Elusive Andean Mountain Cat (*Oreailurus jacobita*) From Mitochondrial DNA. J Hered, 89:227-232.

Johnson W. E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W. J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S. J. 2006. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. Science, 311:73-77.



García B. A., Zapata S. C., Procopio D. E., Martínez P. R., Travaini A. 2010. Evaluación del interés de productores ganaderos en el control selectivo y eficiente de predadores en la Patagonia Austral. *Acta Zool. Mex.*, 26:303-321.

Kurten B. 1976. Fossil puma (Mammalia: *Felidae*) in North America. *Netherlands J Zool*, 26:502–534.

Laundré J. W. y Hernández L. 2010. What We Know about Pumas in Latin America. En: Hornocker M. y Negri, S. (Eds.), *Cougar: Ecology and Conservation*. University of Chicago Press, pp. 76-90.

Llanos R., Travaini A., Montanelli S., Crespo E. 2014. Estructura de edades de pumas (*Puma concolor*) cazados bajo el sistema de remoción por recompensas en Patagonia. ¿Selectividad u oportunismo en la captura? *Ecología Austral*, 24:311-319.

Llanos R. y Travaini A. 2016. ¿Qué ves cuando me ves? el Puma (*Puma concolor*) y su representación en los medios de prensa escrita de Patagonia argentina. *Interciencia*, Vol. 41 No. 1.

LaRue M. A. y Nielsen C. K. 2008. Modelling potential dispersal corridors for cougars in midwestern North America using least-cost path methods. *Ecological Modelling*, 212: 372-381.

Li W. H. y Graur D. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Segunda edición Sinauer Associates (ed.). Sunderland Massachusetts.

Librado P. y Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451-1452.

Lindzey F. G., Van Sickle W. D., Ackerman B. B., Barnhurst D., Hemker T. P., Laing S. P. 1994. Cougar population dynamics in southern Utah. *The Journal of Wildlife Management*, Vol. 58, No. pp4. 619-624.

Logan K. A. y Irwin L. L. 1985. Mountain lion habitats in the Big Horn Mountains, Wyoming. *Wildlife Society Bulletin* 13:257–262.

Logan K. A. y Swenor L. L. 2001. *Desert Puma: Evolutionary Ecology and Conservation of an Enduring Carnivore*. Island Press. Washington, DC, EEUU. 451 pp.

Lopez J. V., Culver M., Stephens J. C., Johnson W. E., O'Brien S. J. 1997. Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 14, 277–286.

Maehr D. S., Land E. D., Shindle D. B., Bass O. L., Hctor T. S. 2002. Florida panther dispersal and conservation. *Biological Conservation*, 106:187-197.

Matte E. M., Castilho C. S., Miotto R. A., Sana D. A., Johnson W. E., O'Brien S. J., de Freitas T. R., Eizirik E. 2013. Molecular evidence for a recent demographic expansion in the puma (*Puma concolor*) (Mammalia, Felidae). *Genet Mol Biol* 36(4):586-97.

Marshall L. G., Webb S. D., Sepkoski J. J., Raup D. M. 1982. Mammalian evolution and the Great American Interchange. *Science* 215(4538):1351-1357.

Martínez J. A., Rudolf J. C., Queirolo D. 2010. *Puma concolor* (Carnivora, Felidae) en Uruguay: situación local y contexto regional. *Mastozoología Neotropical*, 17(1): 153-159.

Meyer A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Hochachka, Mommsen, eds.). Elsevier Science Publishers, 2.

Moggia L. 1996. El puma, adaptado a todo. *Diario El Litoral*. Suplemento Vida Agreste. Edición del 24-8-96. Santa Fe.

Muzzachiodi N. 2007. Lista comentada de las especies de mamíferos de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. Universidad Maimónides. Primera Edición, Buenos Aires, pp96.

Neff N., 1983. *The big cats: the paintings of Guy Coheleach*. New York: Harry N. Abrams.

Nielsen C., Thompson D., Kelly M., Lopez-Gonzalez C. A. 2015. *Puma concolor* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2015: T18868A97216466. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en>. Downloaded on 05 March 2019.

Novaro A. J., Funes M. C., Walker R. S. 2000. Ecological extinction of native prey of a carnivore assemblage in Argentine Patagonia. *Biological Conservation* 92:25-33.

Novaro A. J. y Walker R. S. 2005. Human-induced changes in the effect of top carnivores on biodiversity in the Patagonian Steppe. En Ray JC, Redford KH, Steneck RS, Berger J (Eds.) *Large Carnivores and the Conservation of Biodiversity*. Island Press. Washington, DC, EEUU. pp. 268-288.

Nowell K. y Jackson P. 1996. Status survey and conservation action plan: Wild Cats. IUCN/World Conservation Union, Gland, Switzerland, pp382.

Núñez Domingo C. 2011. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales de la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza. Departamento de anatomía patológica, medicina legal y forense y toxicológica. 1-210.

Ojeda R. A., Chillo V., G.B. Díaz Isenrath G. B. (eds). 2012. Libro Rojo de los mamíferos Amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, SAREM. 257 pp.

Pacheco L. F., Lucero A., Villca M. 2004. Dieta del puma (*Puma concolor*) en el Parque Nacional Sajama, Bolivia y su conflicto con la ganadería. *Ecol. Bol.* 39: 75-83.

Parera A. 2002. Los mamíferos de la Argentina y la región austral de Sudamérica. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.

Pautasso A. A. 2008. Mamíferos de la provincia de Santa Fe, Argentina. Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino" (Nueva Serie) 13: 1-248.

Paviolo A., Di Blanco Y. E., De Angelo C. D., Di Bitetti M. S. 2009. Protection affects the abundance and activity patterns of pumas in the atlantic forest. *Journal of Mammalogy*, 90(4):926-934.

Pecon Slattery J., O'Brien S. J. 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148:1245–1255.

Perovic P. G., Pereira J. A. 2006. Felidae pp 93-100, en: Barquez RM, Díaz MM & Ojeda RA (Eds) Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Argentina, pp359.

Pierce B. M. y Bleich V. C. 2003. Mountain Lion. Pages 744-757 in G. A. Feldhamer, B. C. Thompson, and J. A. Chapman, editors. *Wild mammals of North America: management and conservation*. Second edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol.*, 25(7):1253-6.

Rau J. R. y Jiménez J. E. 2002. Diet of Puma (*Puma concolor*, Carnivora: *Felidae*) in Coastal and Andean Ranges of Southern Chile. *Stud. on Neotrop. Fauna Environ.* 37: 201-205.

Riley S. J. y Malecki R. A. 2001. A Landscape Analysis of Cougar Distribution and Abundance in Montana, USA. *Environmental Management*, 28:317-323.

Rodríguez de la Fuente F. 1983. La aventura de la vida. Tomo 8. Región Neotropical. *Hyspamérica Ediciones y Ediciones Urbión*. Madrid.

Schaefer R. J., Torres S. G., Bleich V. C. 2000. Survivorship and cause-specific mortality in sympatric populations of mountain sheep and mule deer. *California Fish and Game* 86:127–135.

Schmitz O. J. y Hamback P. A., Beckerman A. P. 2000. Trophic cascades in terrestrial systems: a review of the effects of carnivore removals on plants. *American Naturalist*, 155:141–153.

Stehli F. G. y Webb S. D. 1985. The great American biotic interchange. New York: Plenum Press.

Stoneking M., Hedgecock, D., Higuchi, R. G., Vigilant, L., Erlich, H. A. 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 370–382.

Sunquist M. y Sunquist F. 2002. Wild cats of the world. University of Chicago Press. Chicago, USA, pp452.

Sweaner L. L., Logan K. A., Hornocker M. G. 2000. Cougar Dispersal Patterns, Metapopulation Dynamics and Conservation. *Conservation Biology*, 14:798-808.

Taber A. B., Novaro A. J., Neris N. y Colman F. H. 1997. The food habits of sympatric jaguar and puma in the Paraguayan Chaco. *Biotropica* 29:204-213.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725-2729.

Thompson D. J. y Jenks J. A. 2010. Dispersal movements of subadult cougars from the Black Hills: the notions of range expansion and recolonization. *Ecosphere*, 1(4): 1-11.

Tintorrelli R. G. 2017. Caracterización genética del puma (*Puma concolor* Linnaeus 1771) en la estepa patagónica de la provincia de Neuquén a través de marcadores moleculares mitocondriales. Trabajo final de grado, Licenciatura en Genética, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA).

Torres S. G., Mansfield T. M., Foley J. E., Lupo T., Brinkhaus A. 1996. Mountain lion and human activity in California: testing speculations. *Wildlife Society Bulletin* 24:451–460.

Travaini A., Zapata S. C., Martínez-Peck R., Delibes M. 2000. Percepción y actitud humanas hacia la predación de ganado ovino por el zorro colorado (*Pseudalopex culpaeus*) en Santa Cruz, Patagonia Argentina. *Mastozool. Neotrop. Mammal*; 7(2):117-129.

Trigo T. C., Freitas T. R. O., Kunzler G., Cardoso L., Silva J. C. R., Johnson W. E., O'Brien, S. J., Bolatto S. L., Eizirik E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Mol Ecol* 17(19):4317-33.

Turner J. W., Wolfe M. L., Kirkpatrick J. F. 1992. Seasonal mountain lion predation on a feral horse population. *Canadian Journal of Zoology* 70:929–934.

Walker S. y Novaro A. 2010. The world's southernmost Pumas in Patagonia and the Southern Andes. En Hornocker M, Negri S (Eds.) *Cougar, Ecology and Conservation*. University of Chicago Press. Chicago, IL, EEUU. pp. 91-99.

Weber W., Rabinowitz A. 1996. A global perspective on large carnivore conservation. *Conservation Biology* 10:1046–1054.



Wehausen J. D. 1996. Effects of mountain lion predation on bighorn sheep in the Sierra Nevada and Granite Mountains of California. *Wildlife Society Bulletin* 24:471–479.

Webb S. D. 1978. A history of savanna vertebrates in the new World, part II. South America and the great interchange. *Annu Rev Ecol Syst* 9:393–426.

Webb S. D. y Marshall L.G. 1981. Historical biogeography of recent South American land mammals. In: *Mammalian biology in South America*, special publication series (Mares MA and Genoways HH, eds). Pittsburgh, PA: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh; 39–52.

Webb S. D. y Rancy A. 1996. Late Cenozoiv evolution of the Neotropical mammal fauna. pp. 335-358. In: Jackson J. B. C., Budd A. F, Coates A. G. (eds). *Evolution and environment in Tropical America*. University of Chicago Press.

Werdelin L., Yamaguchi N., Johnson W. E., O'Brien, S. J. 2010. Phylogeny and evolution of cats (*Felidae*). *Biology and conservation of wild felids*. Oxford, 59-82.

Yáñez J. L., Cárdenas J. C., Gezelle P., Jaksić F. M. 1986. Food habits of the southernmost mountain lions (*Felis concolor*) in South America: natural versus livestock ranges. *J. Mammal.* 67: 604-606.

Young S. P. y Goldman E. A. 1946. The puma, mysterious American cat. Washington, DC: American Wildlife Institute.

Zanón-Martínez J. I., Travaini A., Zapata S., Procopio D., Santillán M. A. 2012. The ecological role of native and introduced species in the diet of the puma *Puma concolor* in southern Patagonia. *Oryx*, 46:106-111.

## 9. RESUMEN

El puma (*Puma concolor*, Linnaeus 1771) es un predador generalista, considerado dentro de los grandes felinos y es uno de los mamíferos nativos con la mayor distribución geográfica en toda América, desde el norte de Canadá hasta el sur de Chile y Argentina (Estrecho de Magallanes), abarcando una amplia variedad de hábitats.

En la actualidad el puma enfrenta dos amenazas principales: el conflicto con los criadores de animales domésticos y la fragmentación y pérdida del hábitat natural. Por otra parte, existe un desconocimiento respecto a diferentes aspectos de la genética y taxonomía de la especie. Por estas razones, y aunque la UICN lo cataloga como “Preocupación Menor” debido a su amplia distribución geográfica, existen situaciones particulares a nivel regional, siendo su grado de amenaza no debidamente evaluado hasta el presente, lo que conlleva un desafío para su conservación.

A través del presente trabajo se propone caracterizar e identificar patrones de variabilidad genética en poblaciones de pumas de la Patagonia argentina mediante el uso de marcadores moleculares mitocondriales (ND5 y Región Control).

Para el fragmento ND5 (623 pb) se analizaron 47 muestras pertenecientes a las poblaciones de puma del centro y Sur de Argentina. Se obtuvieron 5 sitios polimórficos y 3 haplotipos distintitos, de los cuales 2 fueron registrados, obteniéndose un Haplotipo no registrado hasta el momento.

A partir del alineamiento de las 10 secuencias de Región Control (aproximadamente 620 pb) obtenidas se pudo observar la existencia de dos regiones bien diferenciadas. La primera corresponde a una región de secuencias repetitivas (SR) de 80 pb y la segunda a un segmento conservado (SC). El número de repeticiones del segmento de 80 pb vario entre los individuos analizados.

Para analizar la variabilidad haplotípica de Región Control se utilizó secuencias de 130 pb del fragmento total que pertenece a una región conservada. Para las 10 muestras analizadas se observaron tres sitios polimórficos que dieron como resultado 2 haplotipos no registrados previamente.

Los árboles obtenidos a partir de las metodologías de máxima verosimilitud (ML), método del vecino más cercano (NJ) e inferencia bayesiana, para el fragmento de 623pb del gen ND5, fueron congruentes entre sí y con el análisis de relaciones haplotípicas. Las secuencias analizadas para el set

completo de muestras convergen en tres haplotipos (ND\_1, ND\_2 y ND\_3), los cuales se agrupan en el clado correspondiente a América del Sur.

Si bien tanto el marcador ND5 como Región Control se mostraron informativos para estudios filogeográficos, para aumentar el grado de resolución en estudios poblacionales es necesaria la incorporación de marcadores moleculares más variables (con una mayor tasa de mutación) y aumentar los muestreos a través del área de distribución del puma.

## **10. Anexo**



**Figura S1.** Fotografía de puma en un maizal en la localidad de Rafael Obligado provincia de Buenos Aires (coordenadas: -34.3471667; -60.8294722). Fuente Dr. Gerardo Giomi.

