

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GATO MONTÉS (*Leopardus geoffroyi*
d'Orbigny & Gervais, 1844) EN LA REGIÓN NORTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS
AIRES, A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIALES**

Trabajo Final de Grado
del alumno



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

Pergamino, 17/03/2022

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GATO MONTÉS (*Leopardus geoffroyi*
d'Orbigny & Gervais, 1844) EN LA REGIÓN NORTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS
AIRES, A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIALES**

Trabajo Final de Grado

del alumno

EMILIANO PINARDI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. Juliana Sánchez
Evaluadora

Dr. Rodrigo Hernández del Pino
Evaluador

Ing.Agr: Susana Pistorale
Evaluadora

Matias Exequiel Mac Allister
Co-Director

Dra. Gabriela Paula Fernández
Directora

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

Pergamino, 17/03/2022

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Fernández por ser la docente que es, dentro y fuera del aula. Por esa bondad y humanidad que la caracterizan. Por abrirme las puertas del CeBio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por tener siempre la mente abierta a mis propuestas, por darme la confianza para realizar este trabajo.

A Matias Mac Allister, el gran Mati Mac, por haberme enseñado a desempeñarme dentro de un laboratorio y permitirme desenvolverme solo. Por la paciencia hacia mis errores e infinitudes de consultas sobre cómo funciona este nuevo mundo. Por abrirme las puertas de su casa, por la confianza depositada, por la excelente persona que ha demostrado ser, por su amistad y por tantas cosas más, reitero, gracias Mati Mac.

Al Dr. Mariano Merino a quien en un momento difícil de la carrera y sobre todo en lo personal le planteé mi interés y gusto por los animales al cual respondió sublimemente “quédate tranquilo, metele, que en el CeBio vas a tener un lugar”. Hoy en día me he convertido en uno de sus compañeros de campañas, con cantidades de mates de por medio, risas, anécdotas y planes a futuro sobre esto que nos apasiona.

Al Dr. Juan Zanón Martínez por habernos ofrecido amablemente las muestras pertenecientes a la Pampa las cuales fueron fundamentales para este trabajo.

A Ana Laura López por las muestras de Entre Ríos.

Al Dr. Andrés Lavore por su predisposición cuando más lo necesitaba.

Tenerlos como profesores fue una experiencia maravillosa, supieron ganarse la admiración de muchos (dentro de los cuales me incluyo) y hoy convertirme en un compañero de trabajo es un poco vergonzoso, pero por dentro estoy muy tranquilo porque se la calidad de profesionales y de persona que son, y que siempre estarán para lo que necesite, después de todo no dejo de aprender de ustedes y por tales razones quiero agradecerles a ambos: Dr, Carlos Figueroa-Diana Acosta.

Agradezco también a todos los miembros que conforman esta gran familia que lleva por apellido CeBio. Gracias por integrarme, por hacerme sentir como uno más. Pocas cosas son tan apreciadas como sentirte parte de algo, ese sentido de pertenencia que gratifica y que debido a ustedes hoy conseguí, gracias.

“Chico bestia es mi héroe favorito” contesté hace mucho tiempo a una simple pregunta. Hoy sé que chico bestia tiene nombre y apellido: Marcelo Gustavo Pinardi. Y un apodo “viejo”. Con unos de los bultos más impresionables alojado en su médula espinal, él caminaba. Con una deficiencia renal crónica terminal, que lo condujo a dializarse 3 días a la semana por casi 6 horas, él supo vivir los restantes 4. Hoy en día, luego de un trasplante, sabe caminar la vida como pocos. Por ser mi chico bestia, quiero agradecerte “viejo”.

Sería muy irónico decir que el dolor físico duele, pero más duele ver a la persona que amas, con la que compartís la vida hace más de quince años sufrir. Susana Inés Primo, la Susan, mi vieja, la que siempre nos bancó a todos. Tantos apodos, un único e irrepetible sentimiento. No voy a enlistar las cosas

por las cual agradecerte porque pueden resumirse en una sola palabra: TODO. Gracias por todo ma.

Los llevo en mi piel, pero sobretodo en mi corazón. Leonardo Joaquín, Juan Cruz, Nicolás, Josefina y Francisco, mis hermanos. Gracias por saber respetar los tiempos de silencio, por el aguante y apoyo cuando las cosas no salían bien, por tantas otras cosas más gracias.

A toda la familia que no estoy mencionando gracias.

Agradezco también a la familia que uno tiene la libertad de elegir, a los que normalmente se denominan amigos. Valdé, Gonza, son más de 15 años compartiendo momentos, gracias por entender los tiempos de estudio, las salidas que no fueron, las vueltas temprano de una cena. A los "amigos de la escuela", el negro, la mole, chack, chicha, lente y otros que no son de la escuela (chango, mansi, cris), con quienes hemos compartido mucho. A todos ellos gracias, gracias por no insistir, por estar en esas charlas terapéuticas, repito, gracias.

A los amigos que la facu me dio, gracias por esas charlas previa a los parciales, por el aguante en los finales. También por esas cenas, esos momentos divertidos. A los rubios, Fede, Marcos, gracias por esos partidos de clasificatoria, los del mundial, la copa américa.

Uno es uno mismo en la vida, pero la vida no es lo mismo sin vos, Bren. Gracias amor, por tu amor incondicional. Por alentarme en los momentos malos, porque vos solo sabes sacarme una sonrisa en los ratos ingratos.

Gracias por convertirte en mi soporte, mi compañera. Te amo apota. Gracias por dejarme formar parte de tu familia, por no enojarte las veces que voy a tu casa y nos quedamos charlando con tu viejo o con Agus sin darte bola. Gracias a ellos también por siempre tener una sonrisa para mí.

Resumen

El gato montés (*Leopardus geoffroyi*, d'Orbigny & Gervais 1844) es un pequeño felino de hábitos solitarios, principalmente nocturno, con origen en el centro de Argentina a partir de dónde comenzó su diversificación y expansión por todo el sur de Sudamérica, habitando una amplia variedad de ambientes tanto en áreas prístinas como perturbadas.

Aunque su estado de conservación es considerado de Preocupación Menor (LC) por la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM), su abundancia se ha reducido principalmente por la caza paliativa, la fragmentación y pérdida de su hábitat y el incremento de atropellamientos, lo que conlleva un desafío para su conservación. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética de la población de gato montés del norte de la provincia de Buenos Aires, mediante el uso de un marcador molecular mitocondrial. De las 22 muestras conseguidas se amplificó, secuenció y analizó, junto a secuencias extraídas de la base de datos *GenBank*, un fragmento de 646 pb del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5), con la finalidad de caracterizar la variabilidad genética e identificar posible estructuración en las poblaciones de gato montés.

Los análisis filogenéticos realizados sugieren que las poblaciones de *Leopardus geoffroyi* pertenecientes a la región norte de la provincia de Buenos Aires, así como las presentes a lo largo de su distribución, expresan un elevado nivel de variabilidad genética, carecen de estructuración poblacional y se encuentran en un proceso de expansión reciente.

Se han detectado cuatros individuos que evidencian un posible evento de hibridación, aunque se requiere de un estudio más robusto para confirmarlo.

A partir de los resultados obtenidos se propone la utilización de otros marcadores moleculares para llevar a cabo una investigación que permita enriquecer el conocimiento sobre la variabilidad genética de la población de gato montés del norte de la provincia de Buenos Aires, y generar información relevante para el planteo de estrategias de conservación y manejo para la especie.

Contenido

Resumen.....	7
1. Lista de abreviaturas	10
2. Introducción.....	12
2.1 Género <i>Leopardus</i>	12
2.2 <i>Leopardus geoffroyi</i>	15
2.2.1 Ecología trófica	16
2.2.2 Distribución y Ecología espacial.....	17
2.3 Estado de conservación	19
2.4 Estudios filogeográficos	21
2.4.1 ADN mitocondrial como marcador molecular.....	21
2.5 Problemática de estudio.....	23
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos Específicos	24
5. Materiales y métodos	24
5.1 Obtención de muestras	24
5.2 Actividades de laboratorio.....	26
5.2.1 Extracción de ADN	26
5.2.2 Obtención y amplificación del fragmento génico mitocondrial.....	27
5.2.3 Verificación de la eficiencia de la amplificación	27
5.2.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados	28
5.3 Análisis de las secuencias	28
6. Resultados.....	30
6.1 Estimaciones de variabilidad genética.....	30
6.2 Análisis filogenético	30
6.3 Relaciones haplotípicas	31
6.4 Caracterización de los haplotipos divergentes.....	32
6.5 Estimaciones de variabilidad genética de <i>L. geoffroyi</i>	34
6.6 Relaciones haplotípicas	34
6.7 Estimaciones de variabilidad genética en toda la distribución de <i>L. geoffroyi</i>	35

6.8 Identificación de <i>cluster's</i> genéticos.....	38
6.9 <i>Test</i> de neutralidad.....	39
7. Discusión.....	39
8. Conclusiones y consideraciones finales.....	42
9. Bibliografía.....	43
10. ANEXO.....	50

1. Lista de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNmt: ADN mitocondrial.

AP: antes del presente.

ATP8: ATP sintasa subunidad 8.

BOL: Bolivia.

BsAs: Buenos Aires.

BZ: Brasil.

CeBio: Centro de Bioinvestigaciones.

CENA: Centro de Argentina.

Cm: centímetros.

ER: Entre Ríos.

Hap: haplotipo.

Kg: kilogramos.

LP: La Pampa.

m/v: masa sobre volumen.

Ma: millones de años.

ML: *maximum likelihood*.

Mm: milímetros.

ND5: NADH deshidrogenasa subunidad 5.

NEA: Noreste de Argentina.

ng: nanogramos.

NJ: *Neighbor joining*.

NOA: Noroeste de Argentina.

PAT: Patagonia.

Pb: pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RC: región control mitocondrial.

SF: Santa Fe.

URU: Uruguay.

μl: microlitros.

2. Introducción

2.1 Género *Leopardus*

Los principales linajes de felinos reconocidos actualmente se establecieron a través de un breve período de tiempo evolutivo, hace entre 10,8 y 6,2 millones de años (Ma) antes del presente (AP), durante el Mioceno Tardío. La diferenciación del linaje Ocelote, que comprende al género *Leopardus*, data de hace 8 Ma AP y la aparición de los numerosos linajes de felinos que observamos actualmente se debe a un evento de diferenciación ocurrido entre 3,1 y 0,7 Ma AP (Figura 1; Johnson *et al.* 2006).

Li *et al.* (2016), mediante filogenia molecular, demostraron que tanto la divergencia como la radiación de los pequeños gatos de América del Sur se originó en América del Norte, aproximadamente hace casi 10 Ma, antes de que el puente terrestre de Panamá se formara y permitiera la conexión entre los hemisferios Norte y Sur en el continente americano. La creación del puente terrestre entre América del Norte y América del Sur hace 3-4 Ma permitió una de las migraciones de fauna más impresionantes en la historia de los mamíferos, el Gran Intercambio Biótico Americano en el Plioceno tardío, cuya consecuencia fue la introducción de ciertos grupos de carnívoros en América del Sur, entre los cuales se encuentran los miembros de la familia Felidae (Johnson *et al.* 1999; Trigo *et al.* 2013).

América del Sur alberga 11 especies de félicos salvajes, de las cuales siete están incluidas en el linaje de los ocelotes y actualmente comprenden un único género, *Leopardus* (Gómez Fernández *et al.* 2020). Este género, con una larga historia de problemas taxonómicos, corresponde a un clado endémico de gatos neotropicales, con porte mediano a pequeño que exhiben melanismo como una variante fenotípica en gran parte de sus poblaciones naturales (Schneider *et al.* 2015).

La diversificación inicial dentro del género *Leopardus*, datada entre 3,91 y 3,02 Ma AP (Ruiz García *et al.* 2018), actualmente comprende siete especies existentes tradicionalmente reconocidas: ocelote (*Leopardus pardalis*), margay (*Leopardus wiedii*), gato montés de los Andes (*Leopardus jacobita*), gato de las pampas (*Leopardus colocolo*), huina (*Leopardus guigna*), tigrina (*Leopardus tigrinus*) y el gato montés (*Leopardus geoffroyi*) (Trindade *et al.* 2021).

Varios estudios moleculares centrados en el género *Leopardus* han revelado una historia evolutiva compleja, que incluye diferentes episodios de hibridación interespecíficos (Trigo *et al.* 2008, 2013; Li *et al.* 2016) y la existencia de especies crípticas (Trigo *et al.* 2008, 2013). Esta propensión a la hibridación se vería facilitada por la fuerte colinealidad entre los genomas de los felinos y la reciente divergencia genética (Li *et al.* 2016), así como la gran similitud del cariotipo entre estas especies (Ruiz García *et al.* 2018).

Análisis recientes indicaron patrones de especiación e hibridación complejos entre al menos cuatro especies dentro de este grupo, reportando el cruzamiento entre el gato montés (*L. geoffroyi*) y una especie hermana del sureste de Brasil (*L. guttulus*) en una estrecha zona híbrida en el sur de Brasil (Trigo *et al.* 2008, 2013; Trindade *et al.* 2021).

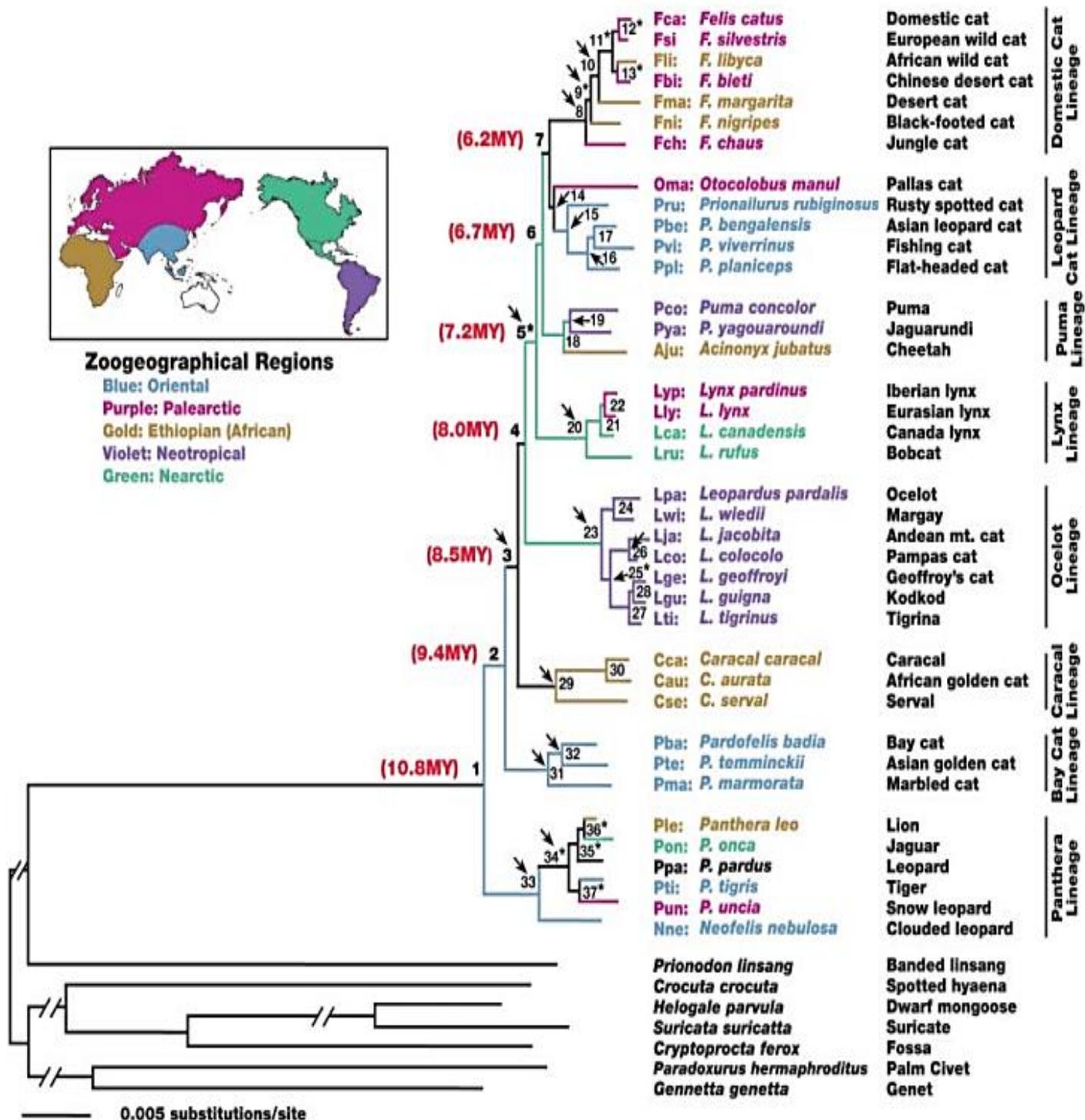


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre especies de felinos y taxones externos representados en un árbol de máxima verosimilitud. Las inserciones/eliminaciones raras que admiten linajes como caracteres cladísticos derivados compartidos se indican con una flecha (Johnson *et al.* 2006).

2.2 *Leopardus geoffroyi*

El gato montés (*Leopardus geoffroyi* d'Orbigny & Gervais 1844), también conocido como gato de Geoffroy, es uno de los pequeños felinos más estudiados de América del Sur. El color de su pelaje oscila entre gris ahumado y ocráceo, más intenso en el dorso y blanco en el vientre. Presentan numerosas manchas negras, las cuales pueden agruparse de dos en dos sobre su dorso, de unos 15 a 20 mm de diámetro. En la nuca y en la parte posterior del cuello se observan tres a siete líneas oscuras longitudinales. Sus patas tienen bandas transversales y la cola bandas estrechas que son bastante variables en su distribución (Ximénez 1975; Trigo *et al.* 2013) (Figura 2).



Figura 2: *Leopardus geoffroyi*. Fotografía: Lucía Martínez Retta.

Ximénez (1975) encontró que el cariotipo de la especie es $2n=36$, el cual incluye 34 cromosomas autosómicos metacéntricos, un cromosoma X metacéntrico pequeño y un cromosoma Y submetacéntrico pequeño.

Esta especie presenta dimorfismo sexual en cuanto al tamaño, siendo los machos más grandes que las hembras (Johnson y Franklin 1991; Lucherini *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2006), lo que permitiría reducir la competencia entre sexos por los recursos alimenticios mediante la explotación de presas de diferentes portes. En relación a la longitud del tronco, este varía entre los 45 y los 100 cm, y considerando su cola, entre 69-125 cm. Su peso oscila entre los 2,2 y los 7,8 kg (Ximénez 1975; Trigo *et al.* 2008).

El estudio de la clasificación taxonómica intraespecífica para el gato montés ha sido foco de atención para muchos investigadores. Ximénez (1975) y Wozencraft (2005) han

propuesto la existencia de cinco subespecies putativas basándose en estudios morfológicos y en el color del pelaje: *L. g. geoffroyi*, *L. g. paraguayae*, *L. g. euxanthus*, *L. g. salinarum* y *L. g. leucobaptus*. Nascimento (2014), reevaluó las unidades taxonómicas para estos gatos mediante el uso de morfología externa y craneodental, detectando un alto grado de variación morfológica, pero sin evidencia de división subespecífica. Por su parte, Johnson *et al.* (1999), a partir del uso de marcadores nucleares y mitocondriales, indican que la especie no presenta estructuración de la variabilidad genética, sugiriendo que se ha mantenido como una gran población panmíctica sin barreras significativas al flujo génico. Gómez Fernández *et al.* (2020), mediante el uso de marcadores mitocondriales, sugieren que *L. geoffroyi* constituiría una especie monotípica con uno de los niveles más altos de variabilidad genética dentro del género *Leopardus*, distribuida en muchos biomas diferentes, apoyando la hipótesis filogenética propuesta por Johnson *et al.* (1999) sobre la inexistencia de barreras al flujo génico.

En contraposición, Bou *et al.* (2021) mediante la utilización de *loci* de microsatélites, encontraron que las poblaciones de gato montés pertenecientes a la Sabana Uruguaya tienen una identidad genética propia, ligeramente diferenciada de aquella correspondiente a las poblaciones de la Pampa Húmeda Argentina, sugiriendo la eficiencia del Río Uruguay como barrera al flujo génico.

2.2.1 Ecología trófica

Se sabe que el patrón de actividad de los mamíferos carnívoros está influenciado por una serie de factores, incluidas las condiciones ambientales, el comportamiento social y la interferencia de los competidores (Pereira *et al.* 2010).

El gato montés es considerado un depredador oportunista nocturno, que utiliza la búsqueda activa como estrategia de caza (Pereira *et al.* 2012). Factores como la abundancia de las presas, el tamaño de las mismas y la relación costo-beneficio de su consumo, influyen en los hábitos alimentarios de la especie (Johnson y Franklin 1991; Novaro *et al.* 2000; Manfredi *et al.* 2004).

Los roedores sigmodontinos e histricognatos, así como aves paseriformes, son las presas más frecuentes, mientras que la liebre europea (*Lepus europaeus*), los armadillos (*Zaedyus pichiy* y *Chaetophractus villosus*), la mara patagónica (*Dolichotis patagonum*),

las lagartijas y los anfibios constituyen recursos alimenticios alternativos (Canepuccia *et al.* 2007; Bisceglia *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2012; Guidobono *et al.* 2016).

2.2.2 Distribución y Ecología espacial

Los modelos de alimentación óptima en relación con el tamaño del territorio predicen que las necesidades energéticas de un animal y la densidad del alimento disponible son factores importantes que influyen en el tamaño del área de distribución de los mismos (Pereira *et al.* 2006).

L. geoffroyi puede dominar los gremios de gatos pequeños en hábitats templados y comparativamente abiertos. Caruso *et al.* (2012) establecen que esta supuesta dominancia estaría relacionada con la gran plasticidad ecológica del gato montés, respaldada por las variaciones relativamente amplias en la dieta y el tamaño del área de distribución. La especie muestra una flexibilidad ecológica muy alta, habitando principalmente en ambientes áridos y semiáridos como el Desierto de Monte y la Estepa Patagónica, pero también se la puede encontrar en una amplia gama de hábitats naturales que incluye matorrales, bosques secos, sabanas, pastizales, marismas y estepas de los neotrópicos subtropicales y templados, en áreas prístinas y perturbadas (Ximénez 1975; Perovic y Pereira 2006; Bisceglia *et al.* 2008; Cuyckens *et al.* 2016; Tirelli *et al.* 2018). Por este motivo la distribución del gato montés se extiende por todo el sur de América del Sur (Figura 3), desde el centro de Argentina, donde se originó y comenzó su diversificación y expansión hacia la Patagonia Argentina, al sur, y hacia Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay, al norte (Nowell y Jackson 1996; Gómez Fernández *et al.* 2020).



Figura 3: Mapa de la distribución de *L. geoffroyi* en Sudamérica dentro de la región Neotropical (Pereira *et al.* 2015).

Con respecto a la distribución del gato montés en Argentina, el advenimiento de la frontera agrícola que caracteriza a dicho país, con el consecuente incremento de la actividad antrópica, habría determinado la migración de *L. geoffroyi* a zonas marginales o áreas prístinas, sobre todo en las provincias con mayor actividad agropecuaria (Castillo *et al.* 2008). No obstante, se han reportado e identificado ejemplares de *L. geoffroyi* en 22 de las 23 provincias totales, no siendo observado sólo en la provincia de Tierra del Fuego (Pereira *et al.* 2019).

Manfredi *et al.* (2012) han mencionado dos factores principales como impulsores de la selección de hábitats en el gato montés: (1) Cobertura densa, que facilitaría el acecho de las presas y proporcionaría un refugio seguro para el descanso diurno y (2) la abundancia de presas. Pereira *et al.* (2015) confirmaron que *L. geoffroyi* tiende a asociarse con áreas de cobertura más densa en las zonas predominantemente abiertas de la mayor parte de su distribución.

Por otra parte, Cuychenks *et al.* (2016) estimaron la extensión de ocurrencia de la especie en un área de 3.000.000 km², en concordancia con el propuesto por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Pereira *et al.* 2015). Ambos trabajos indican que las características bioclimáticas más importantes que afectan la presencia de estos gatos parecen ser la estacionalidad de la temperatura, la temperatura media del trimestre más frío y la precipitación anual. Pero al analizar como variable la cobertura del suelo, esta última redujo notablemente la importancia de las variables anteriores. En este sentido la Patagonia Argentina presentaría los valores más bajos de probabilidad de ocurrencia por poseer un clima menos adecuado y una cobertura vegetal menos densa (Cuychenks *et al.* 2016).

2.3 Estado de conservación

Las variaciones en la organización social de los carnívoros tienen importantes implicaciones para su conservación (Millspaugh y Marzluff 2001). Recientemente, Zuliani y Monjeau (2021) indicaron tres causas por las cuales se puede dar el evento de extinción de las especies: biológicas, ambientales y antrópicas. En la actualidad, la mayoría de las especies nativas están expuestas a factores como la pérdida, la degradación y la fragmentación del hábitat, la caza furtiva, la competencia con especies exóticas, la depredación por perros, el atropellamiento, entre otras. La disponibilidad de presas, así como el impacto humano, en particular el relacionado a la alteración y destrucción de hábitats naturales son las principales causas de las amenazas más generalizadas para la conservación de la biodiversidad (Manfredi *et al.* 2012; Castillo *et al.* 2019).

El papel que juegan los mamíferos carnívoros en los ecosistemas puede verse profundamente alterado por la creciente densidad de población humana y la consiguiente demanda de alimentos y recursos naturales que erosionan y fragmentan rápidamente los hábitats de los carnívoros (Caruso *et al.* 2016; Bou *et al.* 2021). La presencia de ganado,

por ejemplo, puede inducir cambios que lleven a la alteración de la densidad de pequeños mamíferos, aves, invertebrados y otras especies al afectar la disponibilidad de alimento y pastizal de cobertura (Pereira *et al.* 2012).

Además del efecto indirecto de la modificación del hábitat, los impactos antropogénicos directos, como la mortalidad causada por los atropellamientos en las carreteras, o los conflictos entre humanos y vida silvestre, también pueden afectar la distribución y abundancia de una especie (Caruso *et al.* 2016).

En la década del 80, *L. geoffroyi* se convirtió en la especie de felino más comercializada en el mundo, siendo su cuero la principal materia prima para la elaboración de chaquetas (entre 15 y 16 pieles por prenda) y tapados (entre 23 y 24 pieles por unidad) (Johnson y Franklin 1991; González *et al.* 2016).

Si bien, en 1992 la especie fue promovida al Apéndice I de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), lo que provocó el fin de la comercialización legal de su piel (Pereira *et al.* 2015), actualmente existen evidencias de que siguen sufriendo presión de caza, sobre todo en respuesta a la depredación de animales de corral.

Se ha establecido como depredador natural del gato montés al puma (*Puma concolor*) (Johnson y Franklin 1991; Pereira *et al.* 2010; Pereira y Novarro 2014), aunque existe un registro aislado documentado por Johnson y Franklin (1991) sobre acoso y probable muerte por parte de un zorro culpeo (*Lycalopex culpaeus*).

En uso de la información presentada, la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM), considerando la plasticidad conductual (tolerancia a la modificación y degradación del hábitat) que le permite a esta especie habitar tanto zonas bien conservadas como sitios que han sido altamente modificados por la actividad antrópica, y en conocimiento de su amplia distribución a nivel global ha categorizado el estado de conservación, a nivel nacional, de esta especie como de “Preocupación Menor” (LC, por sus siglas en inglés) (Pereira *et al.* 2019). A nivel mundial, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) ha establecido el mismo nivel de categoría (Pereira *et al.* 2015).

A pesar de la categorización propuesta, la falta de un plan de acción específico para esta especie, el aumento de la fragmentación y pérdida de hábitats, la vigencia de la caza en represalia y el incremento de atropellamientos son factores que pueden provocar un declino importante en la abundancia de *L. geoffroyi*, y la consecuente pérdida de variabilidad genética a nivel poblacional.

2.4 Estudios filogeográficos

El estudio de la distribución geográfica de linajes genéticos es llevado a cabo por la filogeografía, disciplina integradora que, a nivel intraespecífico, se ocupa del análisis e interpretación de las distribuciones espaciales de linajes dentro y entre poblaciones. La filogeografía enfatiza los aspectos históricos de las distribuciones espaciales contemporáneas de los linajes genéticos (Avise 1996).

A finales de los años 70, empezó a gestarse un cuerpo de evidencias que señalaban al ADN mitocondrial (ADNmt) como una molécula adecuada para estudiar las relaciones filogenéticas entre los organismos (Igea de Castro 2012).

La posterior aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) unida a la relativa facilidad de amplificar el ADN de este orgánulo comparado con el ADN nuclear hizo que se popularizara su uso hasta el punto de constituir la herramienta de trabajo principal de esta disciplina (Stoneking *et al.* 1991; Avise *et al.* 1998; Igea de Castro 2012).

2.4.1 ADN mitocondrial como marcador molecular

El ADNmt es una pequeña molécula circular cerrada covalentemente, de unos 16-20 kilobases (kb) de largo. Contiene genes que codifican ARN mensajeros, ARN ribosomales y ARN de transferencia (Figura 4). Al mismo tiempo carece de intrones y de secuencias espaciadoras considerables entre genes (Avise 1987).

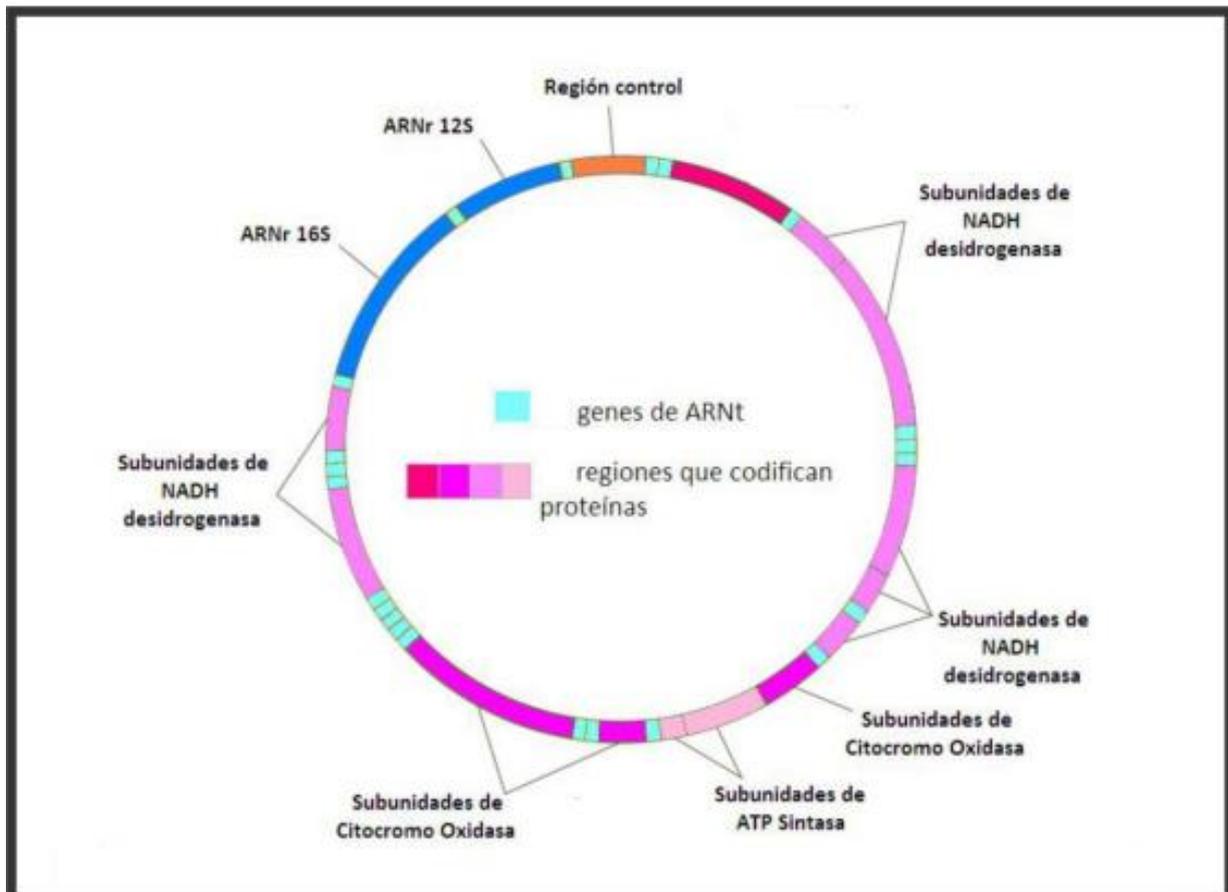


Figura 4. Gráfico representativo del ADN mitocondrial, genes y secuencias reguladoras que lo forman. Imagen modificada de Carnovale (2014).

El ADNmt de mamífero es ideal para estudios filogeográficos debido a que acumula 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. Además, se encuentra en mayor número de copias homólogas (una por mitocondria), lo que implica una ventaja a nivel técnico ya que se puede obtener a partir de muestras biológicas más degradadas. El genoma mitocondrial se hereda vía materna, sin recombinación, evitando así las “ambigüedades” encontradas en los genomas nucleares como consecuencia del proceso de meiosis (Giles *et al.* 1980). Estas características convierten al ADNmt especialmente útil para la evaluación de las relaciones entre especies y poblaciones (Brown *et al.* 1979; Avise 1998) y la determinación de las relaciones de ancestralidad-descendencia entre taxones (Stoneking *et al.* 1991).

Segmentos de ADNmt 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 (Trigo *et al.* 2008; Li *et al.* 2016; da Silva Santos *et al.* 2018; Gómez Fernández *et al.* 2020).

2.5 Problemática de estudio

Existe un importante déficit de información respecto a la variabilidad genética en la población de *Leopardus geoffroyi* del norte de la provincia de Buenos Aires, por lo que, hasta el momento, no fue posible su comparación con la del resto de las poblaciones de gato montés a lo largo del rango de su distribución geográfica, ni la determinación de sus posibles patrones de estructuración. Por otro lado, aunque su estado de conservación es considerado de Preocupación Menor (LC), la caza paliativa, la fragmentación y pérdida de hábitat derivada del advenimiento de la agricultura y el atropellamiento, entre otros factores de causa antrópica, pueden estar provocando un declino en su abundancia, y la pérdida de variabilidad genética a nivel local, aún no cuantificado.

A través de este estudio se espera enriquecer el conocimiento sobre la variabilidad genética de la población de gato montés del norte de la provincia de Buenos Aires, mediante la utilización del marcador molecular mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5) previamente utilizado para este tipo de estudio y para esta especie.

Creemos que la información resultante será relevante y fundamental para planificar estrategias de conservación y manejo de la especie.

3. Hipótesis

Dada la amplia distribución geográfica de *Leopardus geoffroyi*, así como la fragmentación de su ambiente natural, la población de gato montés del norte de la provincia de Buenos Aires presenta diferencias genéticas con otras poblaciones a lo largo del rango de su distribución.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Caracterizar la variabilidad genética de la población de gato montés del norte de la provincia de Buenos Aires, mediante el uso de un marcador molecular mitocondrial.

4.2 Objetivos Específicos

1. Generar una base de datos genéticos (tejido y ADN) para la población de gato montés (*Leopardus geoffroyi*) del norte de la provincia de Buenos Aires.
2. Caracterizar la variabilidad genética de la población incluida en el estudio a partir del marcador mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5).
3. Establecer las relaciones filogenéticas entre la población estudiada y otras a lo largo de su distribución geográfica a partir del set de secuencias de ND5.

5. Materiales y métodos

5.1 Obtención de muestras

El trabajo se desarrolló a partir de 22 muestras de tejido (piel y músculo) provenientes de individuos atropellados, de las cuales 13 se colectaron en la región norte de la provincia de Buenos Aires, en los partidos de Chascomús (n=1), Gral. Madariaga (n=1), Lavalle (n=1), Lincoln (n=1), Magdalena (n=1) y Pergamino (n=8). Las restantes nueve muestras se obtuvieron en colectas efectuadas fuera de la provincia de Buenos Aires: La Pampa (n=6), Entre Ríos (n=1) y Santa Fe (n=2) (Figura 5).

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, UNNOBA-CICBA) y conservadas en alcohol 96° en freezer (-20°C) para su posterior utilización.

Tabla 1: En la tabla se indica para cada provincia muestreada, el partido/departamento, localidad, coordenadas geográficas de los sitios de colecta y la identificación en el mapa

Provincia	Partido/departamento	Localidad	N	Latitud	Longitud	ID mapa
Buenos aires	Pergamino	Alfonso	1	-33,931757	-60,736101	1
		Rancagua	4	-34,008127	-60,487073	
				-34,00832	-60,48697	
				-34,03718	-60,438504	
				-34,008127	-60,487073	
		Fontezuela	1	-33,9147778	-60,4567777	
	Pergamino	2	-33,972498	-60,52386		
	Gral. Lavalle	Gral. Lavalle	1	-36,5088611	-57,0841111	2
	Magdalena	Magdalena	1	-35,0636111	-57,6240833	3
	Chascomús	Chascomús	1	-35,6898333	-58,3467777	4
Cañuelas	Alejandro Petión	1	-34,9891389	-58,6697222	5	
Rojas	Rojas	1	-34,303999	-60,742636	6	
Lincoln	Lincoln	1	-34,93725	-61,492611	7	
Campana	Isla Talavera	1	-33,96925	-58,965027	8	
Gral. Madariaga	General Madariaga	1	-37,0459444	-57,1548638	9	
Santa Fe	Caseros	Los Molinos	1	-33,047235	-61,40925	10
Entre Ríos	Colón	Arroyo Caraballo	1	-30,838379	-58,499413	11
	Uracán	Unanue	1	-37,6073763	-64,18700617	12
	Chical C6	Algarrobo del 6guila	1	-36,6046364	-67,28863581	13
La Pampa	Toay	Ataliva Roca	1	-36,9292579	-64,28377457	14
	Capital	Anguil	1	-36,5459304	-64,06333856	15
	Capital	Mauricio Mayer	1	-36,3084054	-63,943303	16

5.2 Actividades de laboratorio

5.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de extracción con Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell 2006). 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% teñido con bromuro de etidio, sometido a 110 volts durante 50 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.

5.2.2 Obtención y amplificación del fragmento génico mitocondrial.

Se realizó la amplificación de un fragmento correspondiente al *locus* ND5, el cual consta de aproximadamente 750pb, a partir de los *primers*: ND5-DF1 (5'-TTGGTGCAACTCCAATAAAAAGT-3') y *Reverse*: ND5-DR1 (5'-AGGAGTTGGGCCTTCTATGG-3') (Trigo *et al.* 2008).

Esta fue llevada a cabo utilizando la técnica de PCR. 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 MgCl₂; 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 Gómez Fernández *et al.* (2020), quienes iniciaron con una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 segundos, ligado del primer al ADN molde (*annealing*) a 65°C por 20 segundos, con decremento de 1 °C en cada ciclo y una fase de extensión de 90 segundos a 74°C. Esto fue sucedido por 10 ciclos de desnaturalización a 94 °C para 40 segundos, *annealing* a 56°C durante 20 segundos y extensión de 90 segundos a 74°C y finalmente 20 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, *annealing* a 54°C mediante 10 segundos y extensión de 90 segundos a 74°C. La fase de extensión final consta de 5 minutos a 74°C.

Para todas las corridas de PCR se incluyeron tanto controles negativos como positivos, para descartar la existencia de contaminación y verificar la eficiencia de la reacción de PCR, respectivamente.

5.2.3 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 recurrió a 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.

5.2.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados fueron purificados y luego secuenciados por la Empresa MACROGEN (Corea) a través de un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem, Estados Unidos).

5.3 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y corregidas usando el programa BioEdit (Hall 2004). Luego se llevó a cabo un alineamiento múltiple entre estas secuencias y otras (de la misma especie) extraídas desde la base de datos *GenBank*, pertenecientes a localidades dentro del rango de su distribución (ver anexo I). Para este alineamiento múltiple se utilizó el algoritmo ClustalX a través del programa BioEdit (Hall 2004).

Para descartar la presencia de pseudogenes, se tradujo a proteína todo el set de secuencias utilizadas con el código genético mitocondrial para vertebrados en el programa MEGAX.

A partir del set de datos obtenidos se generaron árboles filogenéticos utilizando las metodologías de reconstrucción filogenética, método del vecino más cercano (NJ) y máxima verosimilitud (ML), empleando las opciones recomendadas por el programa MEGAX (Kumar *et al.* 2018) 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. Además, se generó un tercer árbol filogenético utilizando el método de inferencia bayesiana con el programa BEAST v1.10.4 (Drummond y Rambaut 2007). Se utilizó un árbol de especiación Yule y un reloj molecular relajado (*uncorrelated exponential*), la búsqueda se realizó con el modelo HKY y se emplearon quince millones (15×10^6) de generaciones, tomando árboles cada mil quinientas (1500) de las mismas. Las corridas independientes fueron resumidas en TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond y Rambaut 2007); los primeros 3 mil árboles (el 10%) fueron descartados y los restantes se utilizaron para visualizar el árbol más probable en FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para llevar a cabo la identificación taxonómica molecular de las secuencias se incorporaron secuencias de *L. geoffroyi* generadas por Gómez Fernández *et al.* (2020), así como de especies de felinos (*Felis catus*, *L. tigrinus*, *L. colocolo*) que comparten área de distribución con *L. geoffroyi* (Anexo I).

El análisis morfológico se realizó en base a las descripciones de Ximénez (1975).

La variabilidad genética fue estimada a través de los índices: número de sitios polimórficos, número de haplotipos, y la diversidad nucleotídica y haplotípica, utilizando el programa DNASP6 (Librado y Rozas 2009). Las relaciones haplotípicas se obtuvieron mediante el algoritmo Median Joining (Bandelt *et al.* 1999) a través del programa POPART (Leigh y Bryant 2015).

El análisis de la estructuración de la población se llevó a cabo utilizando el Análisis Bayesiano mediante el software BAPS 6.0 (Corander *et al.* 2008). Usamos un modelo de mezcla y los cálculos se realizaron probando varios grupos (K) de 1 al 10, con cinco repeticiones para cada K. Los cálculos se realizaron testeando el número de *cluster* (K) de 1 a 10, con 100 réplicas para cada K. Asimismo, se calculó la divergencia K-L entre cada *cluster* hallado.

Se realizó un test de neutralidad con el programa Arlequin v3.5.2 (Excoffier y Lischer 2010), utilizando un número de 1000 simulaciones.

6. Resultados

Luego de la conversión a proteína se descartó la presencia de codones *stop* prematuros (Figura 6), por lo cual se procedió con los análisis filogenéticos utilizando el total de secuencias generadas (n=22).

1. 1295 ND5 BS.AS Rancagua	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P Y Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
2. 1299 ND5 BS.AS Lavalle	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
3. 1301 ND5 BS.AS Pergamino LaBenicia	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
4. 1324 ND5 BS.AS Rojas	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P Y Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
5. 1354 ND5 BS.AS Rancagua	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P Y Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
6. 1678 ND5 BS.AS I.Talavera	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
7. 1686 ND5 ER Col n ArroyoCarballo	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P Y Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
8. 1844 ND5 LP Toay AtalivaRoca	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
9. 1879 ND5 SF Caseros LosMolinos	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
10. 1901 ND5 BS.AS Fontezuela	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
11. 1323 ND5 BS.AS RN32-TORO	L L L L P I I M S N T Q L Y K N S L Y P H Y V K T T I S Y A F I I S M I P T M M F I S S G Q E A V I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S T I F I P V A L F V T W S I M E F S
12. 1836 ND5 LP Utrac n Unanu	L L L L P I I M S N T Q L Y K N S L Y P H Y V K T T I S Y A F I I S M I P T M M F I S S G Q E A V I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S T I F I P V A L F V T W S I M E F S
13. 1842 ND5 LP Capital Anguil	L L L L P I I M S N T Q L Y K N S L Y P H Y V K T T I S Y A F I I S M I P T M M F I S S G Q E A V I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S T I F I P V A L F V T W S I M E F S
14. 1860 ND5 LP ChicalC AlgarroboDeIAguila	L L L L P I I M S N T Q L Y K N S L Y P H Y V K T T I S Y A F I I S M I P T M M F I S S G Q E A V I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S T I F I P V A L F V T W S I M E F S
15. 1261 ND5 BsAs Alfonso	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
16. 1265 Bs.As Rancagua ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
17. 1309 BsAs Magdalena ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
18. 1310 BsAs Chascom s ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
19. 1311 BsAs Beriso ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
20. 1333 BsAs Lincoln ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
21. 1743 BsAs Gral.Madariaga EstElAmanecer ND	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
22. 1868 LP Capital MauricioMeyer ND5	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
23. MN793073.1 BsA54 C1 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
24. MN793073.1 BsA55 C1 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
25. MN793073.1 BsA510 C1 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
26. MN793074.1 BsA512 C2 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
27. MN793074.1 BsA516 C2 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
28. MN793075.1 BsAs C3 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
29. MN793076.1 BsAs C4 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
30. MN793077.1 BsAs C5 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S
31. MN793078.1 CDB C6 (ND5)	L L L L P I I M S N T Q L Y K N N L Y P H Y V K T T I S Y A F A I S M I P T M M F I S S G Q E T I I S N W H W L S I Q T L K L S L S F K M D Y F S I I F I P V A L F V T W S I M E F S

Figura 6. Alineamiento del set de secuencias utilizado para el análisis filogenético, traducido a secuencias de aminoácidos. El marco de lectura correcto se estableció mediante comparación con las secuencias analizadas por Gómez Fernández *et al.* (2020). Los diferentes colores distinguen a los diferentes aminoácidos. La presencia de un codón *stop* se observaría mediante un asterisco (*).

6.1 Estimaciones de variabilidad genética

Luego de la edición manual de los fragmentos de ND5 se analizó un total de 22 secuencias de 646 pb. El conjunto de secuencias analizado mostró un elevado grado de polimorfismo, obteniendo un total de 14 haplotipos e identificando 89 sitios polimórficos, de los cuales 85 fueron informativos (ver Anexo II). La diversidad nucleotídica arrojó un valor de Pi: $0,418 \pm 0,0142$, mientras que el valor obtenido para la diversidad haplotípica fue de Hd: $1,000 \pm 0,00073$.

6.2 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 646 pb del gen ND5, fueron congruentes entre sí, por lo tanto, se presenta únicamente la filogenia obtenida a partir de inferencia bayesiana (Figura 7).

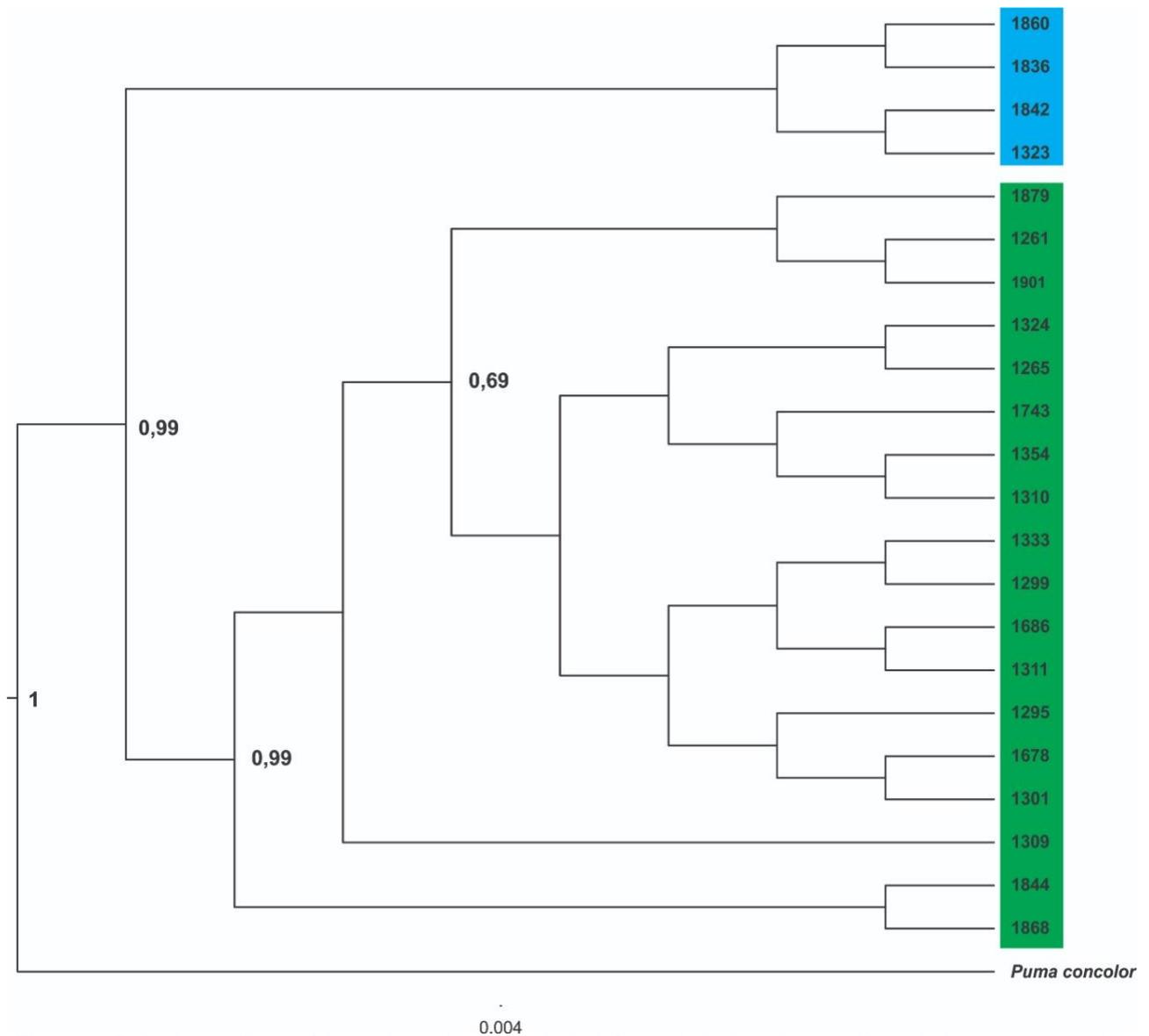


Figura 7. Relaciones filogenéticas obtenidas a partir de inferencia bayesiana, utilizando las 22 secuencias de ND5 (646 pb) generadas en este estudio. En celeste y verde se indican los dos grandes clados observados. Solo se muestran los valores de probabilidad posterior mayores a 0,5. *Puma concolor* es utilizado como *outgroup*.

6.3 Relaciones haplotípicas

Las relaciones haplotípicas para el set completo de haplotipos de ND5, se muestran en la figura 8. Las relaciones genéticas de los 14 haplotipos obtenidos para el fragmento de 646 pb del gen ND5 estudiado no se corresponden con las distancias geográficas. El haplotipo 12 (Hap12) se encuentra en el centro de la red haplotípica y se conecta con el haplotipo 13 (Hap13), del cual difiere en dos mutaciones. Este último a su vez, se distingue del haplotipo 5 (Hap5) a través de dos mutaciones. Tanto el Hap13 como el Hap5 se

encuentran separados por 74 mutaciones del haplotipo más próximo (Hap8), encontrado en un solo individuo perteneciente a la provincia de Bs As. A este último se conectan los restantes tres haplotipos que constituyen el clado identificado en azul en el árbol filogenético (Figura 7). La presencia de tal número de mutaciones sugeriría que estos individuos no pertenecen a *L. geoffroyi*.

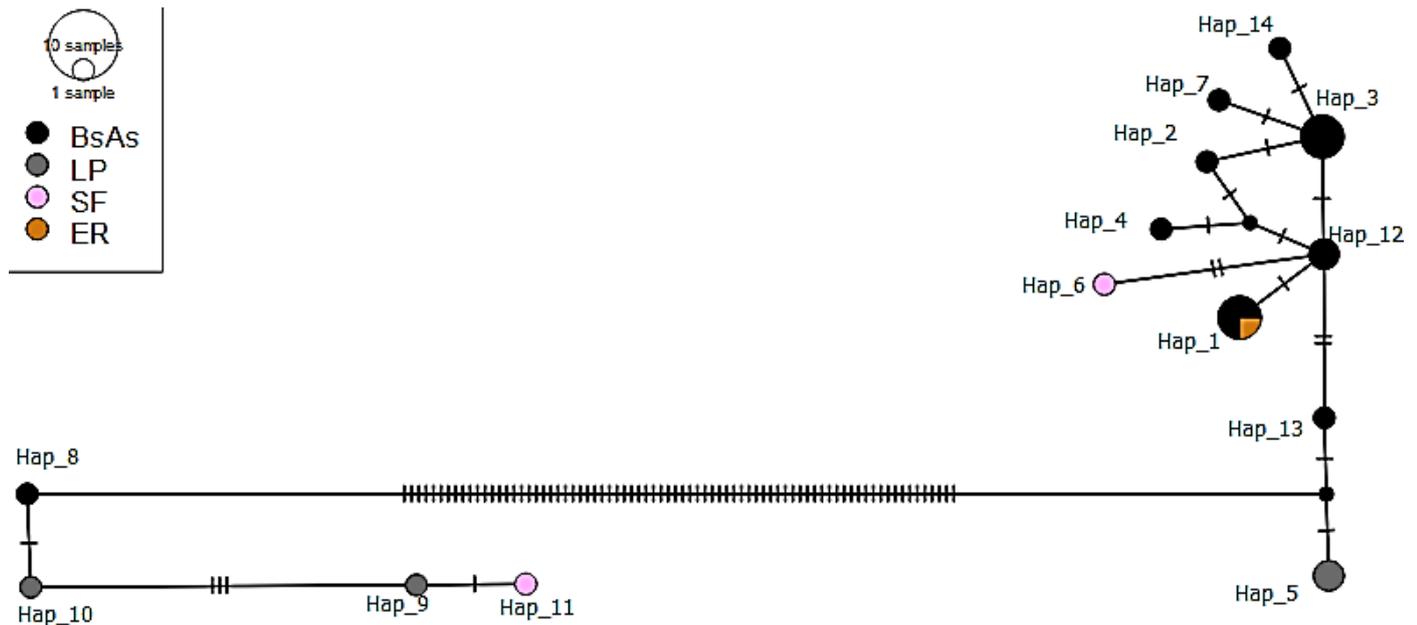


Figura 8. Relaciones haplotípicas obtenidas para las secuencias del fragmento del gen ND5 (646 pb) de los individuos colectados en las provincias de Buenos Aires (BsAs), La Pampa (LP), Entre Ríos (ER) y Santa Fe (SF). El diámetro de los círculos refleja la frecuencia de cada haplotipo. La longitud de las líneas de unión es proporcional al número de mutaciones existentes entre cada haplotipo, y las líneas perpendiculares a esta corresponden al número de mutaciones.

6.4 Caracterización de los haplotipos divergentes

Cuando fueron incorporadas secuencias de otros felinos la filogenia obtenida agrupó a estos en dos grandes clados, uno de los cuales queda conformado por los individuos portadores de los haplotipos divergentes con secuencias de “gato doméstico”. En el segundo clado podemos observar que las muestras seleccionadas al azar obtenidas en la colecta se agrupan con las muestras de *L. geoffroyi*, corroborando la identidad de las mismas (Figura 9).

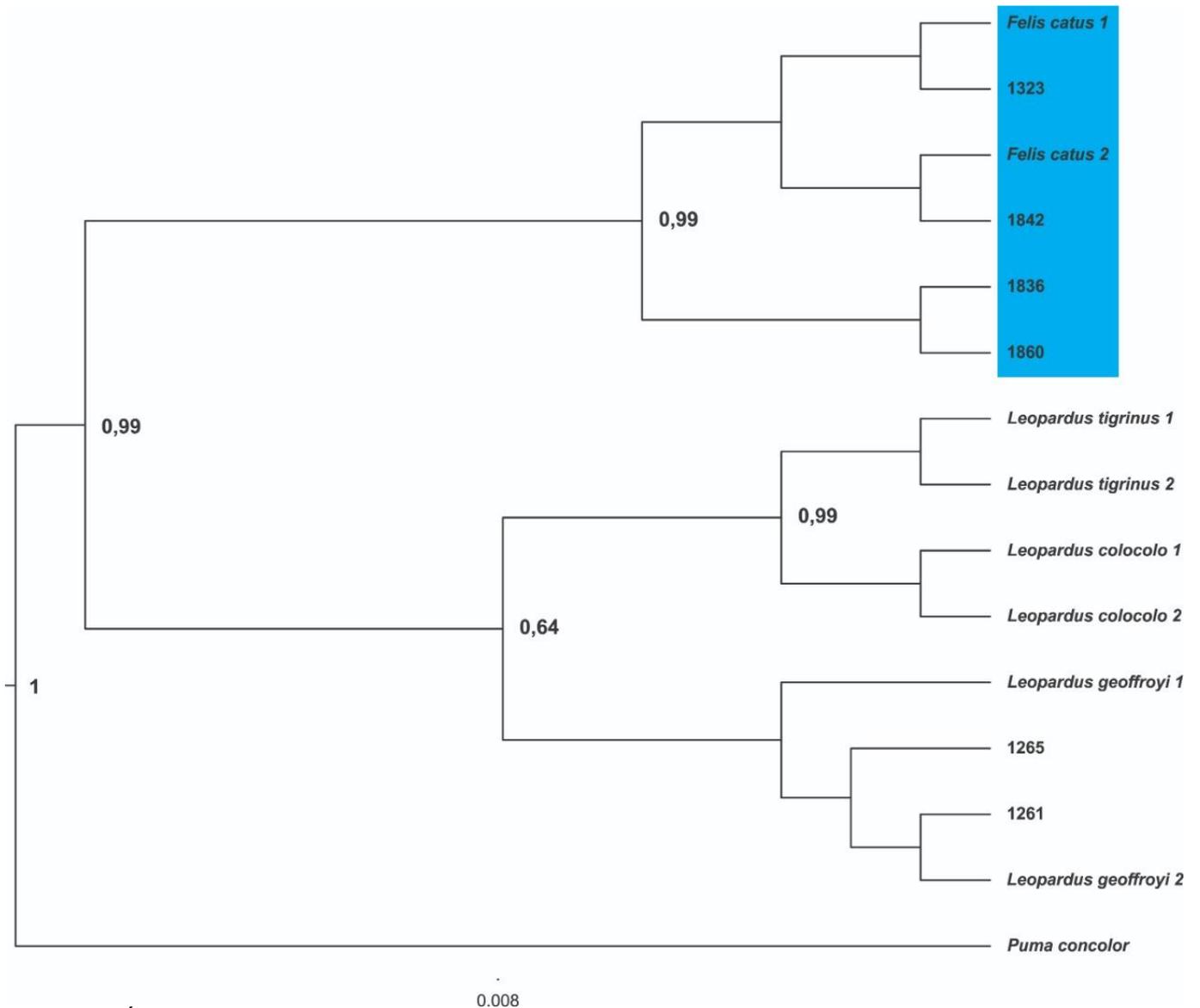


Figura 9. Árbol filogenético producto del análisis de inferencia bayesiana a partir las muestras analizadas para el gen ND5. Los números en los nodos indican la probabilidad posterior (se muestran solo valores mayores a 0,5). Las muestras de *L. geoffroyi*, *L. colocolo*, *L. tigrinus* y *P. concolor* se obtuvieron de *GenBank*, Se remarca el clado conformado por los individuos portadores de los haplotipos divergentes y las secuencias de gatos domésticos. *Puma concolor* es utilizado como *outgrup*.

El análisis morfológico siguiendo la descripción de Ximénez (1975) respecto del pelaje, la distribución de manchas y presencia de bandas transversales en cola y patas nos permitió confirmar la identidad “fenotípica” de los individuos portadores de los Hap8, Hap11 y Hap12 como *L. geoffroyi* (Anexo III). Con respecto a la identidad de los individuos portadores de los haplotipos Hap 9 y Hap 10, de acuerdo al registro fotográfico y de anotaciones de campo disponibles, los fenotipos corresponderían a gato doméstico (comunicación personal Juan Zanón).

Confirmada la identidad de las secuencias que constituyen los Hap8, Hap9, Hap10 y Hap11, así como la ausencia de pseudogenes, hemos decidido apartarlos del análisis. A continuación, se efectuaron los análisis de estimación de la variabilidad y de relaciones haplotípicas.

Se ha tomado la decisión de conservar el identificador de los haplotipos con la finalidad de facilitar las comparaciones futuras.

6.5 Estimaciones de variabilidad genética de *L. geoffroyi*

Las secuencias de ND5, cuya extensión comprendía 646 pb, para 18 muestras analizadas, mostraron ser igualmente muy polimórficas, obteniendo un total de 10 haplotipos e identificando 12 sitios polimórficos, de los cuales 5 son considerados sitios informativos (ver Anexo IV). La diversidad nucleotídica arrojó un valor de $Pi: 0,26667 \pm 0,0288$, mientras que el valor obtenido para la diversidad haplotípica fue de $Hd: 1,000 \pm 0,00200$.

6.6 Relaciones haplotípicas

Las relaciones haplotípicas para el set completo de haplotipos de ND5, se muestran en la figura 10. De los 10 haplotipos obtenidos siete pertenecen a Buenos Aires, uno es compartido con Entre Ríos y tanto La Pampa como Santa Fe presentan haplotipos únicos.

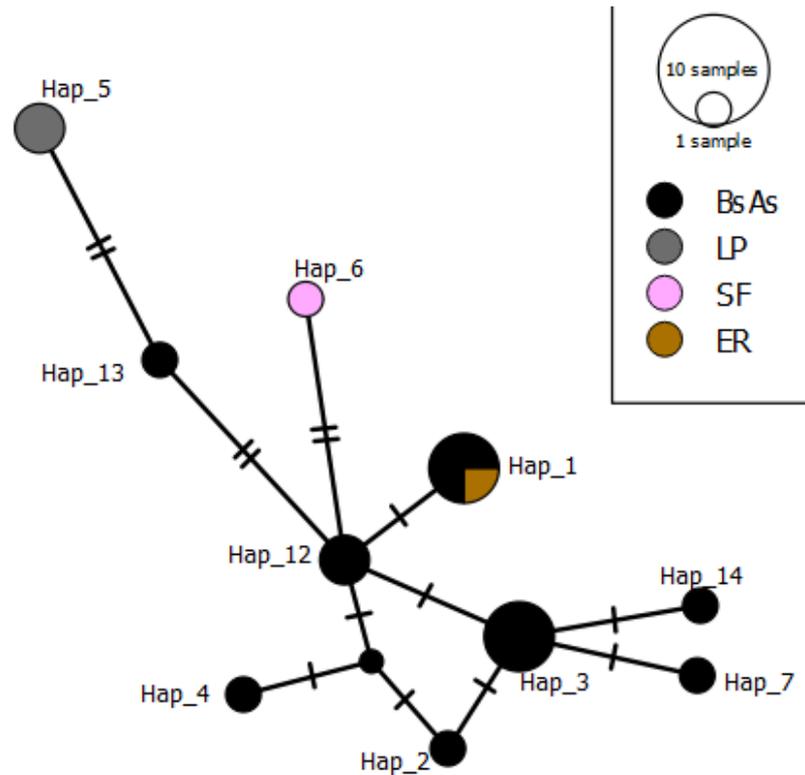


Figura 10. Relaciones haplotípicas obtenidas para las secuencias del fragmento del gen ND5 (646 pb) de los individuos colectados en las provincias de Buenos Aires (BsAs), La Pampa (LP), Entre Ríos (ER) y Santa Fe (SF). El diámetro de los círculos refleja la frecuencia de cada haplotipo. La longitud de las líneas de unión es proporcional al número de mutaciones existentes entre cada haplotipo y las líneas perpendiculares a esta, el número de mutaciones.

6.7 Estimaciones de variabilidad genética en toda la distribución de *L. geoffroyi*.

Las secuencias del fragmento del gen ND5, para las 90 muestras analizadas en este trabajo, mostraron un elevado polimorfismo, obteniendo un total de 31 haplotipos e identificando 35 sitios polimórficos, de los cuales 10 son considerados sitios informativos (ver anexo V). La diversidad nucleotídica arrojó un valor de $Pi: 0,00531 \pm 0,0073$, mientras que el valor obtenido para la diversidad haplotípica fue de $Hd: 0,924 \pm 0,00025$.

Los árboles obtenidos a partir de las metodologías de máxima verosimilitud (ML), método del vecino más cercano (NJ) e inferencia bayesiana, fueron congruentes entre sí, por lo tanto, se presenta únicamente la filogenia obtenida a partir de inferencia bayesiana (Figura 11).

La decisión de la formación de los grupos mencionados se tomó a raíz de analizar la distribución de haplotipos por provincias y observar que el diagrama generado no aportaba información adicional.

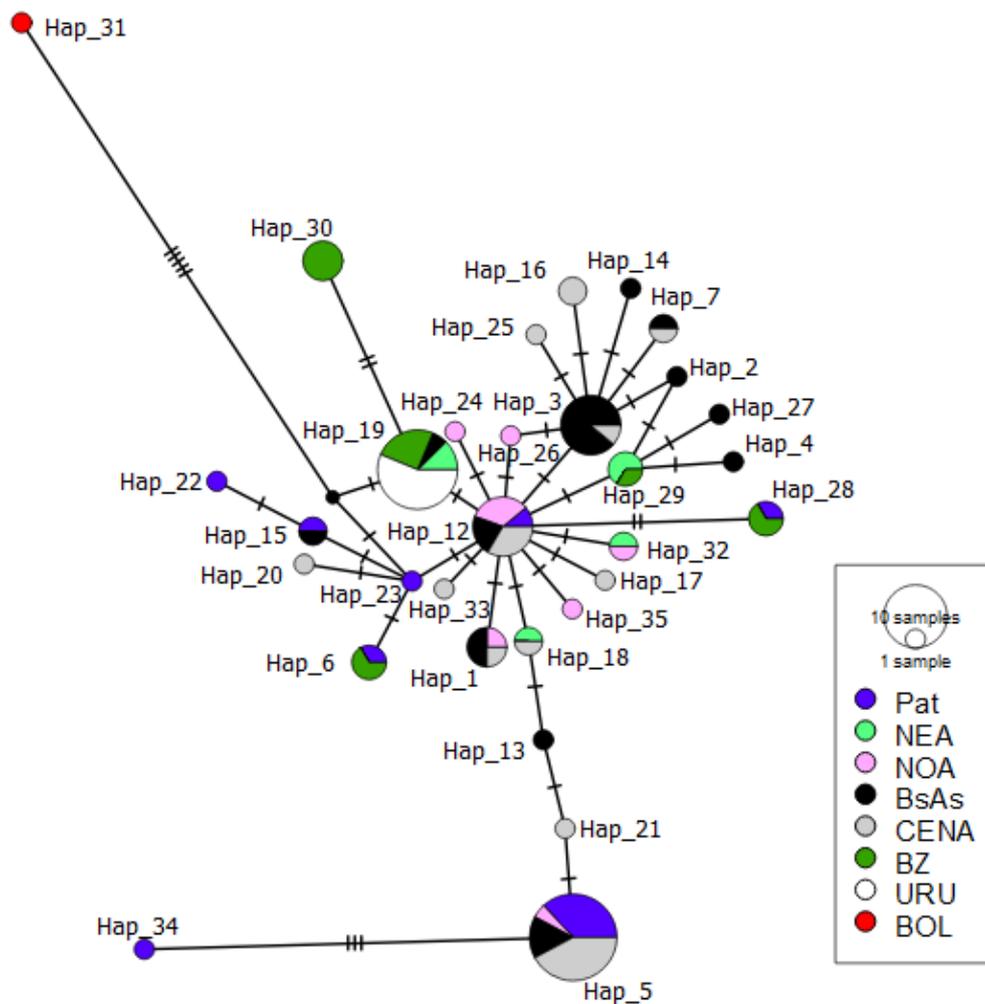


Figura 12. Relaciones haplotípicas obtenidas para las secuencias del fragmento del gen ND5 (646 pb) de los individuos de Buenos Aires (BsAs), La Pampa-San Luis-Mendoza-Córdoba-Santa Fe (CENA), Jujuy-Salta-La Rioja-Santiago del Estero-Tucumán (NOA), Neuquén-Río Negro-Chubut-Santa Cruz (Pat), Chaco-Formosa-Corrientes-Entre Ríos (NEA), Brasil (BZ), Uruguay (URU) y Bolivia (BOL). 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.

Los 31 haplotipos obtenidos para el fragmento de 646 pb del gen ND5 estudiado no siguen una distribución determinada por la presencia de barreras naturales o por ambientes contrastantes. El Hap12 es el central de la red y uno de los que poseen distribución más amplia, observándose un patrón de tipo “estrella” con los haplotipos más

cercanos. Este se conecta con el haplotipo Hap13 por medio de 2 mutaciones y 2 mutaciones más lo separan del Hap5. Este último se distingue del Hap34 por la presencia de 3 mutaciones.

6.8 Identificación de *cluster's* genéticos

Con respecto al análisis de la estructura poblacional mediante un análisis bayesiano (Figura 13), se buscó encontrar grupos o *clusters* (K) homogéneos de poblaciones entre los sitios estudiados, como también detectar mezcla en individuos. Se utilizaron las poblaciones formadas para el análisis anterior.

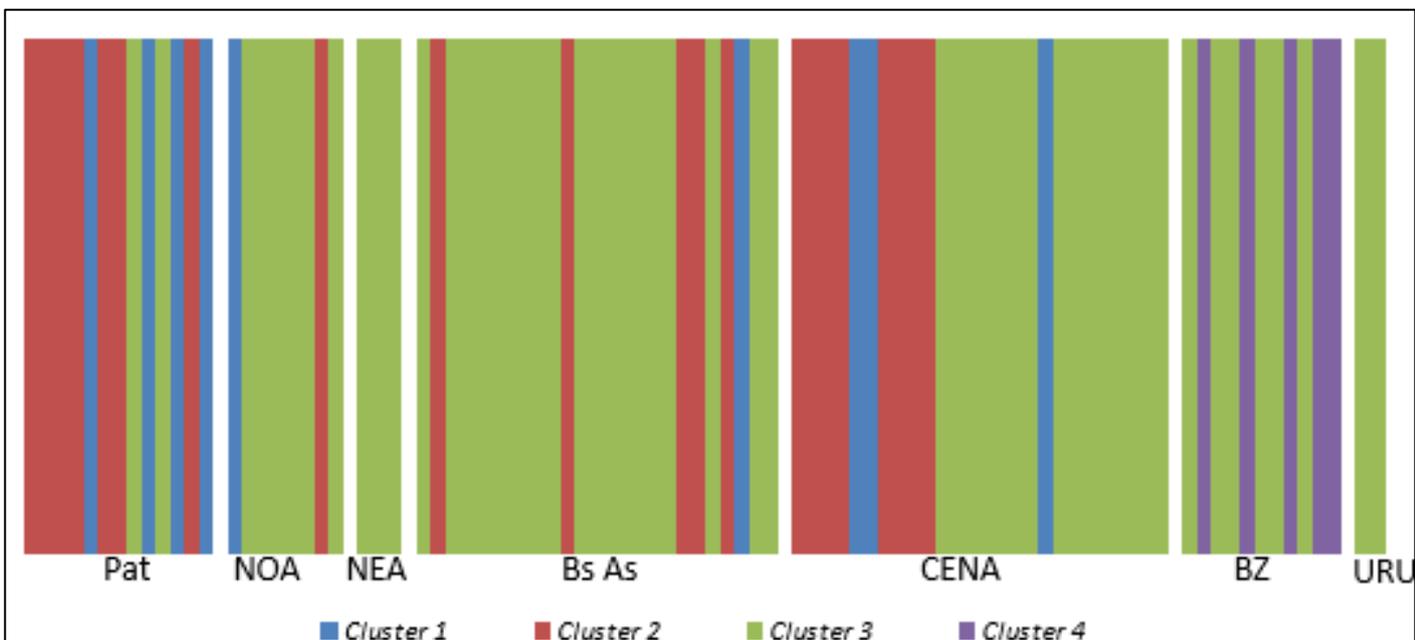


Figura 13. Distribución de las muestras, agrupadas en poblaciones, en diferentes *clusters*: Patagonia (Pat), Noroeste de Argentina (NOA), Noreste de Argentina (NEA), Buenos Aires (BsAs), Centro de Argentina (CENA), Brasil (BZ) y Uruguay (URU). Las barras blancas indican límites entre los *clusters*.

Analizando la salida del software se puede observar que no hay una estructuración marcada para el conjunto de datos utilizado. Vale resaltar la presencia exclusiva del *cluster* 4 en la población de Brasil, al igual que su ausencia en las poblaciones restantes. La región de estudio en este trabajo contiene el 75% de los *clusters* observados y la totalidad de los presentes en nuestro país.

6.9 Test de neutralidad

Los tests de neutralidad, D Tajima's y Fs Fu's, para las muestras de Argentina arrojaron valores negativos de $D = -1,369$ ($p = 0,056$) y $Fs = -20,557$ ($p = 0,000$).

7. Discusión

Los resultados obtenidos nos permiten ampliar el conocimiento sobre la variabilidad genética existente en las poblaciones de *L. geoffroyi*, pertenecientes a la región norte de la provincia de Buenos Aires, para el marcador mitocondrial ND5 que hasta el momento no había sido estudiada al detalle.

El análisis filogenético realizado a partir de las muestras obtenidas en este trabajo indicó la existencia de dos clados divergentes con altos valores de probabilidad posterior (Figura 7), de los cuales, el primero fue excluido de los análisis posteriores luego de haber corroborado que no se trataba de secuencias pertenecientes a la especie en estudio, sino que correspondían a haplotipos de *Felis catus*. La red haplotípica obtenida a *posteriori* (Figura 8) da indicio de la alta variabilidad genética que presenta el gato montés de la región norte de la provincia de Buenos Aires.

El análisis filogenético realizado para los haplotipos obtenidos a lo largo de su distribución agrupó con valores de probabilidad posterior superiores a 0,5 a los diferentes haplotipos (Figura 11). Sin embargo, no se ha podido determinar una estructuración de los mismos dentro de la región de estudio del presente trabajo ni a lo largo de su distribución (Figura 13).

La presencia de haplotipos compartidos entre los individuos localizados en la región norte de la provincia de Buenos Aires y el resto de la distribución geográfica de la especie, así como la ausencia de estructuración genética en *clusters*, no apoya la hipótesis planteada, indicando que la especie se comporta como una unidad evolutiva única, en concordancia con los resultados obtenidos por Johnson *et al.* (1999) y Gómez Fernández *et al.* (2020). Respecto a la población uruguaya, y en contraposición a los resultados obtenidos por Bou *et al.* (2021) a partir de *loci* de microsatélites, no fueron observadas diferencias genéticas con las poblaciones argentinas, aunque esto podría ser explicado por a la baja cantidad de muestras de Uruguay ($n=2$), y el marcador utilizado.

Si bien no se ha observado la existencia de agrupamientos genéticos en el set de haplotipos estudiados, se puede destacar la presencia exclusiva de un *cluster* perteneciente a Brasil. Esto sugiere que son necesarios más estudios que contrasten la identidad genética de individuos situados en los límites de distribución de la especie.

De la misma manera será necesario aumentar el esfuerzo de colecta de muestras en el norte de la distribución de la especie, ya que solo se cuenta con una secuencia de Bolivia. Si bien se ha registrado como un haplotipo exclusivo para esta región (Hap31), su diferenciación genética (en número de mutaciones) respecto a haplotipos de áreas geográficas distantes (como por ejemplo Patagonia), no es mayor que la encontrada dentro de regiones cercanas (por ejemplo, entre haplotipos de Patagonia, o entre haplotipos de la región central de Argentina; Figura 12).

La baja diversidad nucleotídica, la alta diversidad haplotípica y la evidencia de un número elevado de haplotipos en baja frecuencia (valores negativos del D de Tajima y de F_s de Fu) sugieren la existencia de un proceso de expansión reciente y rápida, tal como lo planteado por Gómez Fernández *et al.* (2020).

De los 31 haplotipos obtenidos para el gen ND5 (Figura 12), los haplotipos Hap5, Hap19 y Hap12 son los más frecuentes, siendo este último el haplotipo central. Dichos haplotipos presentan una distribución amplia, a través de diferentes provincias, e incluso a pesar de la existencia de ríos de gran caudal (como el Río Colorado o el Paraná), por lo que no parecen ser una barrera efectiva al flujo génico.

En relación de la gran divergencia encontrada para los haplotipos Hap8, Hap9, Hap10 y Hap11, evidenciada en la profunda diferenciación filogenética respecto a secuencias pertenecientes al género *Leopardus*, así como a su alto grado de similitud con secuencias de *Felis catus*, nos permite sugerir la existencia de un proceso de hibridación entre dichas especies.

La formación de híbridos entre diferentes especies de felinos ha sido ampliamente documentada en la bibliografía, tanto entre especies co-genéricas, como es el caso de los híbridos observados entre *L. geoffroyi* y *L. tigrinus* (Trigo *et al.* 2008) o *L. geoffroyi* y *L. guttulus* (Trigo *et al.* 2013), como para especies de géneros diferentes, como es el caso

de los híbridos registrados entre el gato doméstico (*Felis catus*) y el serval (*Leptailurus serval*) (Dickman *et al.* 2019).

La presencia de pseudogenes, como hipótesis alternativa al patrón de diferenciación observado, si bien ha sido reportado en numerosos estudios dentro de la familia *felidae* (Li *et al.* 2005; Shrestha *et al.* 2011) en este caso quedaría descartada por la ausencia de codones *stop* en el conjunto de secuencias analizadas (Figura 6) y la homología con secuencias de ND5 de *F. catus*.

La hibridación entre especies animales se ha vuelto recientemente más reconocida como un fenómeno importante, especialmente en el contexto de radiaciones recientes (Trigo *et al.* 2013). Allendorf *et al.* (2001) proponen que la producción de híbridos fértiles puede tener una importancia considerable para la adaptación futura e incluso la especiación.

Para Li *et al.* (2016) esta propensión a la hibridación se ve facilitada por la fuerte colinealidad entre los genomas de los felinos junto con la reciente divergencia genética, mientras que, por su parte, Ruiz García *et al.* (2018) sugieren a la gran similitud del cariotipo entre estas especies como otro factor a considerar.

Nuestros análisis revelaron que el hipotético evento de hibridación se llevó a cabo entre un *Leopardus geoffroyi* macho y un individuo hembra de la especie *Felis catus* (Figura 9). La distinción de los sexos es posible gracias a que el material mitocondrial no se recombina y presenta herencia materna.

Si bien la evidencia de hibridación e introgresión entre dos especies de gatos está respaldada por la observación de haplotipos divergentes, se requiere de la utilización de otro tipo de marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, así como estudios morfológicos y/o citogenéticos para dar soporte a dicha hipótesis.

Debido a que las muestras obtenidas para este trabajo fueron producto de atropellamiento en rutas, al igual que Caruso *et al.* (2016), destacamos a este impacto antropogénico directo como uno de los causantes más considerable de la pérdida de abundancia de este felino. La formación de híbridos puede llevar a una pérdida de identidad genética de la especie, teniendo el potencial de convertirse en otra causa del declino de la abundancia de esta.

La información generada en este trabajo constituye un aporte fundamental para la elaboración de un plan de manejo adecuado que permita garantizar tanto la preservación como el mantenimiento de la diversidad de la especie, entendida como una unidad evolutiva única, con gran capacidad de adaptarse a diferentes hábitats tanto en zonas bien conservadas como sitios que han sido altamente modificados por la actividad antrópica.

8. Conclusiones y consideraciones finales

La extensa distribución de *Leopardus geoffroyi*, así como los diferentes procesos evolutivos que han actuado durante la expansión y diversificación de la especie, habrían determinado la relativamente alta variabilidad genética observada en la actualidad, así como la baja diferenciación entre la población del norte de la provincia de Buenos Aires y otras poblaciones a lo largo de su distribución geográfica.

Si bien no se observó estructuración genética en las poblaciones argentinas, se identificó un *cluster* exclusivo perteneciente a Brasil. Por lo tanto, con la obtención de un mayor número de individuos, y marcadores moleculares más variables, se sugiere indagar sobre los procesos evolutivos que habrían determinado dicho patrón de diferenciación genética. También se resalta la importancia de aumentar los muestreos en regiones sub-representadas (como Bolivia).

El proceso de hibridación entre individuos del mismo género es un proceso ampliamente representado dentro de la familia Felidae, e inclusive entre individuos de diferentes géneros, tal como el sugerido en este estudio, entre *L. geoffroyi* y *Felis catus*.

Por último, este trabajo sienta las bases para futuros estudios taxonómicos y filogenéticos que incluyan nuevas poblaciones distribuidas en la totalidad del área de ocupación de la especie, un mayor número de individuos y de marcadores moleculares, con el fin de poder complementar los datos obtenidos y dilucidar la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones. Se pretende, de esta manera, adquirir las herramientas para la toma de decisiones en términos de manejo y/o control de esta especie entendida como una unidad evolutiva única.

9. Bibliografía

- Abràmoff, MD; Magalhães, PJ; Ram, SJ. 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics International* 11(7): 36-41.
- Allendorf, FW; Leary, RF; Spruell, P; Wenburg, JK. 2001. The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 613–622.
- Avise, JC. 1996. Space and time as axes in intraspecific phylogeography. In: *Past and Future Rapid Environmental Changes: The Spatial and Evolutionary Responses of Terrestrial Biota* (eds Huntley, B, Cramer, W, Morgan, AV, Prentice, HC, Allen, JRM), pp. 381–388. Springer-Verlag, New York.
- Avise, JC. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*: 7: 371- 379.
- Avise, JC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. Vol. 18 (c): 489-522.
- Bandelt, HJ; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.
- Bisceglia, SBC; Pereira, JA; Teta, P; Quintana, RD. 2008. Food habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in the central Monte desert of Argentina. *Journal of Arid Environments* 72(6): 1120-1126.
- Bou, N; Soutullo, Á; Hernández, D; Mannise, N; González, S; Bartesaghi, L; Pereira, J; Merino, M; Espinosa, C; Trigo, TC; Cosse, M. 2021. Population structure and gene flow of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in the Uruguayan Savanna ecoregion. *Journal of Mammalogy* 102(3): 879-890.
- Brown, WM; George, M; Wilson, AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(4): 1967-1971.
- Canepuccia, AD; Martinez, MM; Vassallo, AI. 2007. Selection of waterbirds by Geoffroy's cat: Effects of prey abundance, size, and distance. *Mammalian Biology* 72(3): 163-173.

- Castillo, DF; Luengos Vidal, EM; Lucherini, M; Casanave, EB. 2008. First Report on the Geoffroy's Cat in a Highly Modified Rural Area of the Argentine Pampas (en línea). *Cat News* 49(May 2015): 27-28.
- Castillo, DF; Luengos Vidal, EM; Caruso, NC; Manfredi, C; Lucherini, M; Casanave, EB. 2019. Spatial organization and habitat selection of Geoffroy's cat in the Espinal of central Argentina. *Mammalian Biology* 94: 30-37.
- Carnovale, CS. 2014. "Determinación de la variabilidad genética en roedores subterráneos del género *Ctenomys* del noroeste de la provincia de Buenos Aires" [Tesis de grado, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires].
- Caruso, N; Manfredi, C; Vidal, EML; Casanaveo, EB y Lucherinio, M. 2012. First Density Estimation of Two Sympatric Small Cats, *Leopardus colocolo* and *Leopardus geoffroyi*, in a Shrubland Area of Central Argentina. *Annales Zoologici Fennici* 49(3): 181-191.
- Caruso, N; Lucherini, M; Fortin, D; Casanave, EB. 2016. Species-specific responses of carnivores to human-induced landscape changes in central Argentina. *PLoS ONE* 11(3): 1-16.
- Corander, J; Marttinen, P; Sirén, J; Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9: 539.
- Cuyckens, GAE; Pereira, JA; Trigo, TC; Da Silva, M; Gonçalves, L; Huaranca, JC; Bou Pérez, N; Cartes, JL; Eizirik, E. 2016. Refined assessment of the geographic distribution of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) (Mammalia: Felidae) in the Neotropics. *Journal of Zoology* 298(4): 285-292.
- Dickman, C. R., Legge, S. M., Woinarski, J. C. Z. (2019). Assessing Risks to Wildlife from Free-Roaming Hybrid Cats: The Proposed Introduction of Pet Savannah Cats to Australia as a Case Study. *Animals*, 9(10), 795.
- Drummond, AJ; Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7(1): 1-8.
- Excoffier, L; Lischer, HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

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

Giles, RE; Blanc, H; Cann, HM; Wallace aD., C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(11 I): 6715-6719.

Gómez Fernández, MJ; Fameli, A; Rojo Gómez, J; Pereira, JA; Mirol, P. 2020. Phylogeographical spatial diffusion analysis reveals the journey of Geoffroy's cat through the Quaternary glaciations of South America. *Biological Journal of the Linnean Society* 129(3): 603-617.

Gonzalez, EM; Bou, N; Cravino, A; Pereira-Garbero, R. 2016. Qué sabemos y qué nos dicen los conflictos entre felinos y humanos en Uruguay. II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. *Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. (September): 237-249.

Guidobono, JS; Muñoz, J; Muschetto, E; Teta, P; Busch, M. 2016. Food habits of geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in agroecosystem habitats of Buenos Aires, Argentina. *Ecología Austral* 26(1): 40-50.

Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0. 0. Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

Igea de Castro. 2012. Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]: 160-165.

Johnson, WE; Franklin, WL. 1991. Feeding and Spatial Ecology of *Felis geoffroyi* in Southern Patagonia. *Journal of Mammalogy* 72(4): 815-820.

Johnson, WE; Slattery, JP; Eizirik, E; Kim, JH; Raymond, MM; Bonacic, C; Cambre, R; Crawshaw, P; Nunes, A; Seuánez, HN; Moreira, MAM; Seymour, KL; Simon, F; Swanson, W; O'Brien, SJ. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8(12 SUPPL. 1): 79-94.

- Johnson, WE; Eizirik, E; Pecon-Slattery, J; Murphy, WJ; Antunes, A; Teeling, E; O'Brien, SJ. 2006. The late miocene radiation of modern felidae: A genetic assesstment. *Science* 311(5757): 73-77.
- Kumar, S; Stecher, G; Li, M; Knyaz, C; Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Leigh, JW; Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 6: 1110–1116.
- Librado, P; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451-1452.
- Li, G; Davis, BW; Eizirik, E; Murphy, WJ. 2016. Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae). *Genome Research* 26(1): 1-11.
- Xia Li; Weihua Li; Hong Wang; Jie Cao; Kenji Maehashi; Liqun Huang; Bachmanov, Alexander A.; Reed, Danielle R.; Legrand-Defretin, Véronique; Beauchamp, Gary K.; Brand, Joseph G.; Flint, Jonathan; 2005. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet* 1(1): e3.
- Lucherini, M; Manfredi, C; Luengos, E; Mazim, FD; Soler, L; Casanave, EB. 2006. Body mass variation in the Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*). *Revista Chilena de Historia Natural* 79(2): 169-174.
- Manfredi, C; Lucherini, M; Canepuccia, AD; Casanave, EB. 2004. Geographical variation in the diet of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in Pampas grassland of Argentina. *Journal of Mammalogy* 85(6): 1111-1115.
- Manfredi, C; Vidal, EL; Castillo, DF; Lucherini, M; Casanave, EB. 2012. Home range size and habitat selection of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*, Felidae, Carnivora) in the pampas grassland. *Mammalia* 76(1): 105-108.
- Millspaugh, JJ; Marzluff, JM. 2001. Radio tracking and animal populations. Press, San Diego, California, 474 pp. ISBN 0-12-497781-2, price (hardcover), *Journal of Mammalogy*, Volume 84, Issue 1: 326–327.

- Nascimento, FO. 2014. On the morphological variation and taxonomy of the Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) (*Carnivora, Felidae*). *Papéis Avulsos de Zoologia* (São Paulo) 54: 129–160.
- Novaro, AJ; Funes, MC; Susan Walker, R. 2000. Ecological extinction of native prey of a carnivore assemblage in Argentine Patagonia. *Biological Conservation* 92(1): 25-33.
- Nowell, K; Jackson, P. 1996. Status survey and conservation action plan: Wild Cats. IUCN/World Conservation Union, Gland, Switzerland, pp382.
- Pereira, JA. 2010. Activity pattern of Geoffroy's cats (*Leopardus geoffroyi*) during a period of food shortage. *Journal of Arid Environments* 74(9): 1106-1109.
- Pereira, JA; Lucherini, M; Trigo, T. 2015. *Leopardus geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 8235:e.T15310A50657011.
- Pereira, JA; Walker, RS; Novaro, AJ. 2012. Effects of livestock on the feeding and spatial ecology of Geoffroy's cat (en línea). *Journal of Arid Environments* 76(1): 36-42.
- Pereira, Javier A.; Lucherini, Mauro; Cuyckens, Griet An Erica; Varela, Diego; Muzzachiodi, Norberto (2019). *Leopardus geoffroyi*. En: SAyDS–SAREM (eds.) Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>
- Pereira, JA; Fracassi, NG; Rago, V; Ferreyra, H; Marull, CA; McAloose, D; Uhart, MM. 2010. Causes of mortality in a Geoffroy's cat population-a long-term survey using diverse recording methods. *European Journal of Wildlife Research* 56(6): 939-942.
- Pereira, JA; Fracassi, NG; Uhart, MM. 2006. Numerical and spatial responses of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) to prey decline in Argentina. *Journal of Mammalogy* 87(6): 1132-1139.
- Pereira, JA; Novaro, AJ. 2014. Habitat-specific demography and conservation of Geoffroy's cats in a human-dominated landscape. *Journal of Mammalogy* 95(5): 1025-1035.

- Perovic, PG; Pereira, JA. 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.
- Ruiz-García, M; Pinedo-Castro, M; Shostell, JM. 2018. Small spotted bodies with multiple specific mitochondrial DNAs: existence of diverse and differentiated tigrina lineages or species (*Leopardus spp: Felidae, Mammalia*) throughout Latin America (en línea). Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis 29(7): 993-1014.
- Santos, A da S; Trigo, TC; de Oliveira, TG; Silveira, L; Eizirik, E. 2018. Phylogeographic analyses of the pampas cat (*Leopardus colocola; carnivora, felidae*) reveal a complex demographic history. Genetics and Molecular Biology 41(1): 273-287.
- Sambrook, J; Russell, DW. 2006. Rapid isolation of yeast DNA (en línea). CSH protocols 2006(1).
- Schneider, A; Henegar, C; Day, K; Absher, D; Napolitano, C; Silveira, L; David, VA; O'Brien, SJ; Menotti-Raymond, M; Barsh, GS; Eizirik, E. 2015. Recurrent Evolution of Melanism in South American Felids. PLoS Genetics 11(2): 1-19.
- Shrestha B, Reed JM, Starks PT, Kaufman GE, Goldstone JV, et al. (2011) Evolution of a Major Drug Metabolizing Enzyme Defect in the Domestic Cat and Other Felidae: Phylogenetic Timing and the Role of Hypercarnivory. PLoS ONE 6(3): e18046.
- Steinfeld, H; Gerber, P; Wassenaar, T; Castel, V; Rosales, M; de Haan, C. 2006. Livestock's long shadow e Environmental issues and options. The Livestock. Environment and Development (LEAD) Initiative & FAO, Rome, Italy.
- Stoneking, M; Hedgecock, D; Higuchi, RG; Vigilant, L; Erlich, HA. 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. American Journal of Human Genetics 48(2): 370-382.
- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipski, A; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2725-2729.

Tirelli, FP; Trigo, TC; Trinca, CS; Albano, APN; Mazim, FD; Queirolo, D; Espinosa, CDC; Soares, JB; Pereira, JA; Crawshaw, PG; MacDonald, DW; Lucherini, M; Eizirik, E. 2018. Spatial organization and social dynamics of geoffroy's cat in the Brazilian pampas. *Journal of Mammalogy* 99(4): 859-873.

Trigo, TC; Freitas, TRO; Kunzler, G; Cardoso, L; Silva, JCR; Johnson, WE; O'Brien, SJ; Bonatto, SL; 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. *Molecular Ecology* 17(19): 4317-4333.

Trigo, TC; Schneider, A; De Oliveira, TG; Lehugeur, LM; Silveira, L; Freitas, TRO; Eizirik, E. 2013. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. *Current Biology* 23(24): 2528-2533.

Trindade, FJ; Rodrigues, MR; Figueiró, H V.; Li, G; Murphy, WJ; Eizirik, E. 2021. Genome-Wide SNPs Clarify a Complex Radiation and Support Recognition of an Additional Cat Species. *Molecular Biology and Evolution* 38(11): 4987-4991.

Wozencraft, W. C. 2005. Order Carnivora. Pp. 532–628 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, vol. 2 (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.

Ximénez, A. 1975. *Felis geoffroyi*, *Mammalian Species*, Issue 54, 21 November 1975, Pages 1–4.

Zuliani, ME; Monjeau, A. 2021. Modelos de distribución potencial de mamíferos nativos en la Patagonia. *Ecología Austral* 32(1): 019-032.

10. ANEXO I

Lista de las secuencias para el fragmento de ND5 tomadas de *GenBank* para *Leopardus geoffroyi*. Se pueden observar los números de acceso a la base de datos *Genbank* (ID *Genbank*) y la referencia correspondiente a cada entrada.

ID GenBanck	ID	Haplotipo	Especie
>MN793073.1	BsAS4	C1	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793073.1	BsAS5	C1	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793073.1	BsAS10	C1	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793074.1	BsAS12	C2	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793074.1	BsAS16	C2	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793075.1	BsAs9	C3	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793076.1	BsAs14	C4	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793077.1	BsAs15	C5	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793078.1	CDB1	C6	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793079.1	CDB2	C7	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793080.1	CDB3	C8	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793081.1	CDB5	C9	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793082.1	CDB6	C10	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793083.1	CHA	C11	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793084.1	CHU1	C12	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793085.1	CHU3	C13	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793085.1	CHU5	C13	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793085.1	CHU8	C13	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793086.1	CHU4	C14	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793087.1	CHU7	C15	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793088.1	ER1	C16	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793089.1	ER10	C17	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793090.1	NEUQ4	C18	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793091.1	PMP5	C19	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793086.1	PMP16	C14	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793092.1	PMP20	C20	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793093.1	PMP15	C21	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793094.1	PMP14	C22	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793074.1	PMP3	C2	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793074.1	PMP4	C2	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793095.1	RIO2	C23	<i>L. geoffroyi</i>

>MN793096.1	RNE3	C24	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793097.1	RNE5	C25	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793095.1	RNE4	C23	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793098.1	SAL2	C6	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793099.1	SFE1	C27	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793100.1	SFE2	C28	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793101.1	SFE5	C29	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793083.1	SFE6	C11	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793102.1	SGO2	C30	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793103.1	SNL1	C31	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793104.1	STC2	C32	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793105.1	TCM2	C33	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793106.1	BsAs2	P1	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793107.1	BsAs7	P2	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793108.1	BZ1	P3	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793108.1	BZ2	P3	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793109.1	BZ10	P4	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793109.1	CORR	P4	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793110.1	BZ4	P5	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793111.1	BZ5	P6	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793111.1	BZ11	P6	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793112.1	BZ9	P7	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793112.1	BZ3	P7	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793112.1	BZ7	P7	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793112.1	URU6	P7	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793113.1	BZ8	P8	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793114.1	BZ12	P9	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793115.1	BOL2	P10	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793116.1	ER2	P11	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793117.1	ER11	P12	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793118.1	FOR2	P13	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793119.1	JUY3	P14	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793120.1	JUY2	P15	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793121.1	MZA4	P16	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793122.1	MZA5	P17	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793123.1	NEQ5	P18	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793124.1	NEQ6	P19	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793125.1	RNE2	P20	<i>L. geoffroyi</i>

>MN793126.1	URU1	P21	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793127.1	RIO4	P22	<i>L. geoffroyi</i>
>MN793128.1	SAL3	P23	<i>L. geoffroyi</i>
>MN313733.1			<i>Felis catus 1</i>
>MN313731.1			<i>Felis catus 2</i>
>KF679955.1			<i>L. tigrinus 1</i>
>KF679953.1			<i>L. tigrinus 2</i>
>KF679962.1			<i>L. colocolo 1</i>
>KF679961.1			<i>L. colocolo 2</i>
>MN793075.1			<i>L. geoffroyi 1</i>
>MN793074.1			<i>L. geoffroyi 2</i>
>KF460523.1			<i>Puma concolor</i>

ANEXO II

Sitios variables observados para los 14 haplotipos obtenidos para el fragmento (646 pb) del gen ND5 en muestras de *L. geoffroyi* (n=22). Con asterisco (*) se indica la posición nucleotídica de los sitios variables informativos.

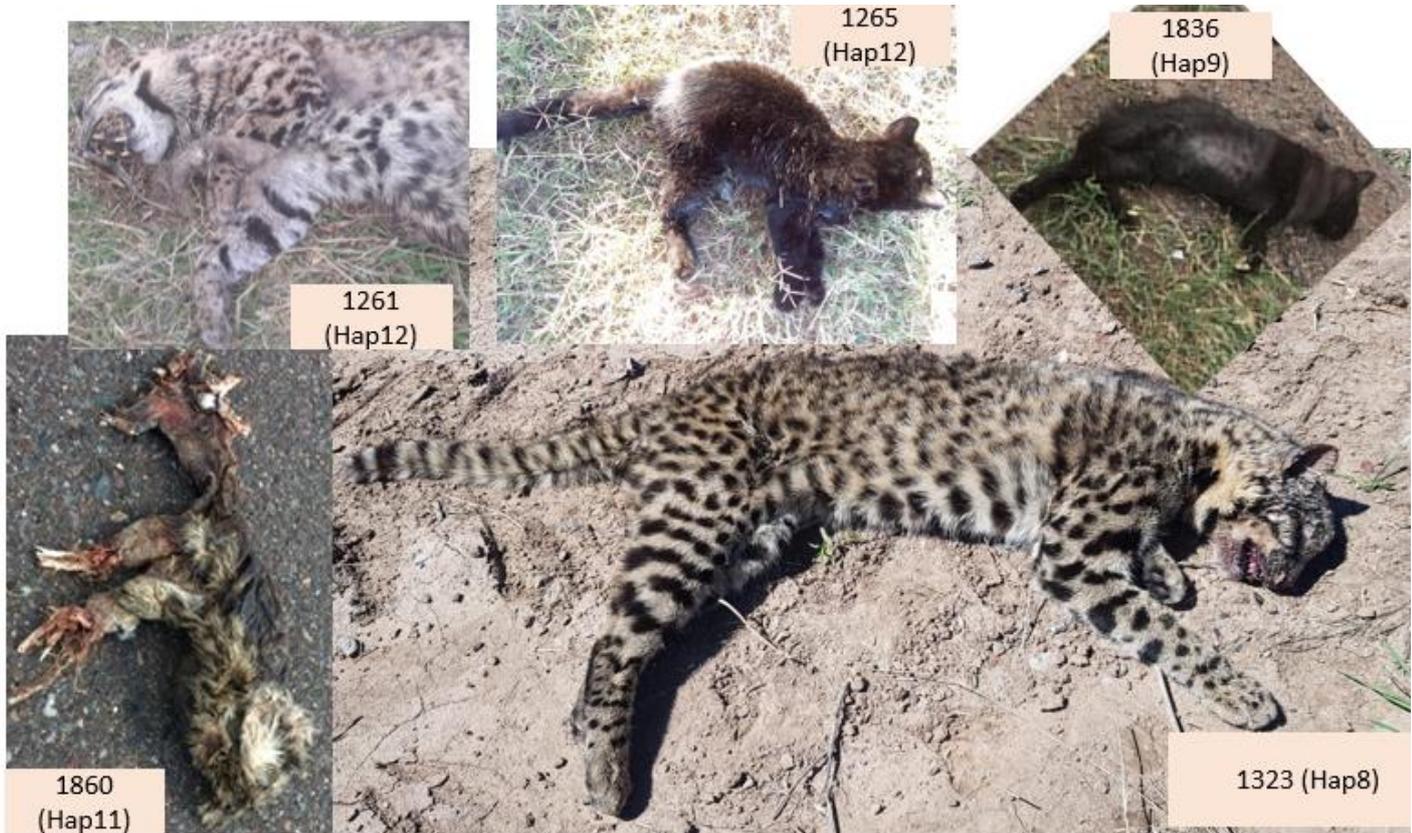
Haplotipos	Sitios variables																												
	5*	11*	12*	14*	17*	20*	29*	41*	52*	53*	59*	63*	96*	97*	98*	104*	117	144*	147*	149*	168*	182*	188*	215*	223*	242*	248*	251*	257*
Hap_1	C	T	C	A	T	T	A	A	A	T	C	T	G	C	T	T	A	A	A	C	T	C	A	C	T	A	T	T	A
Hap_2	.	.	T	C
Hap_3	C
Hap_4	.	.	T	C
Hap_5	C
Hap_6	C
Hap_7	C	T
Hap_8	T	C	.	G	C	C	T	G	G	C	T	C	A	T	C	C	.	G	G	T	C	T	G	T	C	.	C	C	G
Hap_9	T	C	.	G	C	C	T	G	G	C	T	C	A	T	C	C	.	G	G	T	C	T	G	T	C	G	C	C	G
Hap_10	T	C	.	G	C	C	T	G	G	C	T	C	A	T	C	C	.	G	G	T	C	T	G	T	C	G	C	C	G
Hap_11	T	C	.	G	C	C	T	G	G	C	T	C	A	T	C	C	.	G	G	T	C	T	G	T	C	G	C	C	G
Hap_12	C
Hap_13	C
Hap_14	A	C

Haplotipos	Sitios variables																													
	260*	263*	266*	269*	278*	288	296*	300*	308*	317*	329*	347*	362*	365*	368*	371*	374*	383*	386*	404*	407*	416*	419*	422*	425*	440*	447*	452*	455*	
Hap_1	A	T	G	G	A	C	T	C	T	C	T	A	C	T	T	C	G	G	T	G	T	C	C	G	A	C	A	C	G	
Hap_2	G
Hap_3	G
Hap_4
Hap_5	T
Hap_6
Hap_7	G
Hap_8	C	C	A	A	G	.	C	T	C	T	C	G	.	C	C	T	A	A	C	A	A	T	T	A	T	T	G	T	A	
Hap_9	C	C	A	A	G	.	C	T	C	T	C	G	T	C	C	T	A	A	C	A	A	T	T	A	T	T	G	T	A	
Hap_10	C	C	A	A	G	.	C	T	C	T	C	G	.	C	C	T	A	A	C	A	A	T	T	A	T	T	G	T	A	
Hap_11	C	C	A	A	G	.	C	T	C	T	C	G	T	C	C	T	A	A	C	A	A	T	T	A	T	T	G	T	A	
Hap_12
Hap_13
Hap_14	G

Haplotipos	Sitios variables																																
	458*	464*	467*	479*	494	500*	512*	514*	540*	541*	551*	555*	559	572*	574*	578*	581*	584*	588*	594*	596*	600*	603*	608*	611*	615*	623*	629*	632*	638*	645		
Hap_1	T	T	T	C	T	T	T	C	C	T	A	C	A	T	T	A	T	A	T	G	C	C	T	A	C	C	T	C	G	T	G		
Hap_2	
Hap_3	
Hap_4	C	
Hap_5	C	T	A	
Hap_6	C	C	
Hap_7	
Hap_8	C	C	C	T	.	C	C	T	T	C	G	T	.	C	C	.	C	G	C	A	T	T	C	G	T	T	C	T	A	C	.		
Hap_9	C	C	C	T	.	C	C	T	T	C	G	T	.	C	C	.	C	G	C	A	T	T	C	G	T	.	C	T	A	C	.		
Hap_10	C	C	C	T	.	C	C	T	T	C	G	T	.	C	C	.	C	G	C	A	T	T	C	G	T	T	C	T	A	C	.		
Hap_11	C	C	C	T	.	C	C	T	T	C	G	T	.	C	C	.	C	G	C	A	T	T	C	G	T	.	C	T	A	C	A		
Hap_12	
Hap_13	C	A	
Hap_14

ANEXO III

Imagen de individuos que poseen los haplotipos divergentes y dos individuos que conforman el Hap12 identificados como *L. geoffroyi*. No se cuenta con registros fotográficos del individuo portador del Hap10.



ANEXO IV

Sitios variables observados para los 10 haplotipos obtenidos para el fragmento (646 pb) del gen ND5 en muestras de *L. geoffroyi* (n=18). Con asterisco (*) se indica la posición nucleotídica de los sitios variables informativos.

Haplotipo	Sitios variables											
	12*	20	63*	117	260*	288	458*	494	514	559	588	594*
Hap_1	C	T	T	A	A	C	T	T	C	A	T	G
Hap_2	T	.	C	.	G
Hap_3	.	.	C	.	G
Hap_4	T	.	C	C	.	.
Hap_5	.	.	C	.	.	T	C	.	T	.	.	A
Hap_6	.	.	C	C	.	.	C	.
Hap_7	.	.	C	T	G
Hap_12	.	.	C
Hap_13	.	.	C	.	.	.	C	A
Hap_14	.	A	C	.	G

ANEXO V

Sitios variables observados para los 31 haplotipos obtenidos para el fragmento (646 pb) del gen ND5 en muestras de *L. geoffroyi* (n=90). Con asterisco (*) se indican la posición nucleotídica de los sitios variables informativos.

Haplotipos	SITIOS VARIABLES																	
	12*	16	20	30	63*	84	104	117	222	257	260*	269	272*	281	288*	398	422	455
Hap_1	C	C	T	A	T	T	T	A	A	A	A	G	C	G	C	G	G	G
Hap_2	T	.	.	.	C	G
Hap_3	C	G
Hap_4	T	.	.	.	C
Hap_5	C	T	.	.	.
Hap_6	C
Hap_7	C	.	.	T	.	.	G
Hap_8	C
Hap_9	C
Hap_10	.	.	A	.	C	G
Hap_11	C
Hap_12	C	.	C	.	.	.	G
Hap_13	C
Hap_14	C
Hap_15	C	T
Hap_16	C
Hap_17	C	T	.	.	.
Hap_18	C
Hap_19	C
Hap_20	C	A
Hap_21	C	G
Hap_22	C	T
Hap_23	T	.	.	.	C	.	.	.	G
Hap_24	C	T
Hap_25	T	.	.	.	C
Hap_26	C	G	.	.	T
Hap_27	.	.	.	T	C	T	.	.	A	A	.
Hap_28	C	A
Hap_29	C
Hap_30	.	T	.	.	C	T	.	.	.
Hap_31	C	C

Haplotipos	SITIOS VARIABLES															
	485	494	514*	540*	551	552	559	585	587	588*	594*	602	605*	615	623	638
Hap_1	C	T	C	C	A	G	A	A	C	T	G	A	A	C	T	T
Hap_2
Hap_3
Hap_4	C
Hap_5	.	.	T	A
Hap_6	.	C	C
Hap_7
Hap_8
Hap_9	A
Hap_10
Hap_11	C	.	.	G	.	.	.
Hap_12
Hap_13	T
Hap_14
Hap_15
Hap_16	C	C	.
Hap_17	A
Hap_18	G	.	C	.	.	G	.	.	.
Hap_19	C
Hap_20
Hap_21	.	.	.	T
Hap_22
Hap_23
Hap_24	T
Hap_25
Hap_26	C
Hap_27	G	C	.	.	.	T	.	.
Hap_28
Hap_29	A
Hap_30	.	.	T	T	A	T
Hap_31