

**ESTUDIOS GENÉTICOS DEL PUMA (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) EN EL
CENTRO-SUR DE ARGENTINA: HERRAMIENTAS PARA SU MANEJO Y
CONSERVACIÓN**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



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

Pergamino, 09/12/2022

**ESTUDIOS GENÉTICOS DEL PUMA (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) EN EL
CENTRO-SUR DE ARGENTINA: HERRAMIENTAS PARA SU MANEJO Y
CONSERVACIÓN**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

REGINA PAOLA MAZZEI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Juan Ignacio Zanón-Martínez
Evaluador

Ivanna Tomasco
Evaluadora

Andrés Lavore
Evaluador

Matias Exequiel Mac Allister
Co-Director

Gabriela Paula Fernández
Directora

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

Pergamino, 09/12/2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Puma concolor</i>	5
1.2. Descripción, morfología y reproducción del puma.....	8
1.3. Patrón de predación y dieta.....	10
1.4. Áreas de acción y dispersión.....	12
1.5. Distribución del <i>Puma concolor</i>	13
1.5.1. Su distribución en el mundo.....	13
1.5.2. Distribución en Argentina.....	14
1.6. Situación actual y amenazas.....	16
1.7. Variabilidad genética y patrones filogeográficos en <i>Puma concolor</i>	19
1.7.1. Región Control del ADN mitocondrial.....	20
1.8. Problemática de estudio.....	21
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo General.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Área de estudio.....	22
4.2. Obtención de las muestras.....	22

4.3. Procedimientos de laboratorio.....	26
4.3.1. Extracción de ADN.....	26
4.3.2. Amplificación del marcador molecular mitocondrial Región Control.....	27
4.3.3. Comprobación de la eficacia de la amplificación.....	28
4.3.4. Secuenciación de los fragmentos amplificados de ADNmt.....	28
4.4. Análisis de datos genéticos.....	29
4.4.1. Limpieza y alineamiento de las secuencias.....	29
4.4.2. Patrón filogeográfico.....	29
4.4.2.1. Variabilidad genética y distribución haplotípica.....	30
4.4.2.2. Abordaje filogenético.....	30
4.4.2.3. Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional (BAPS).....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Estimaciones de variabilidad genética.....	31
5.2. Análisis filogenético.....	33
5.3. Relaciones haplotípicas.....	34
5.4. Distribución geográfica de los haplotipos.....	36
5.5. Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional.....	37
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIONES.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Puma concolor*

El puma (*Puma concolor* Linnaeus 1771) es una de las especies de carnívoros de mayor tamaño de América (Currier, 1983) (Figura 1). La especie, clasificada dentro de la familia Felidae (Fischer de Waldheim, 1817) se ubica en la subfamilia Felinae (Fischer de Waldheim, 1817) junto con los felinos pequeños, debido a que, a diferencia de los grandes félidos de la subfamilia Pantherinae (Pocock, 1917), la estructura del aparato hioides estacionario no les permite emitir rugidos (Currier, 1983; Clavijo y Ramírez, 2009).



Figura 1. *Puma concolor*. Fuente de la imagen: <http://www.pampadiario.com/>

La mayoría de los registros fósiles de *Puma concolor* en América del Norte y del Sur tienen menos de medio millón de años (Pleistoceno tardío y Holoceno), con algunas excepciones, como el registro de un cráneo de *Puma concolor* en los acantilados costeros del Arroyo Santa Elena, al norte de la ciudad de Mar del Plata (provincia de Buenos Aires, Argentina) datado para el Pleistoceno medio temprano

[Etapa/Edad Ensenada, alrededor de 2,1 a 0,5 millones de años (MA)] (Chimento y Dondas, 2017).

Por otra parte, tanto los estudios moleculares como los basados en caracteres morfológicos, sugieren que el origen evolutivo del puma se remonta al Mioceno tardío (5–8 MA), a partir de un ancestro común con el guepardo africano (*Acinonyx jubatus*) y el jaguarundi americano (*Herpailurus yaguaroundi*) (Janczewski *et al.*, 1995; Johnson y O'Brien, 1997; Pecon-Slattery y O'Brien, 1998).

El origen geográfico del puma sería, de acuerdo a numerosos autores, América del Norte, habiendo emigrado junto con otros carnívoros placentarios a América del Sur hace 2-4 millones de años, durante el Gran Intercambio Biótico Americano (GIBA), gracias a la formación del istmo de Panamá (Webb y Marshall, 1981; Stehli y Webb, 1985; Webb y Rancy, 1996; Woodburne, 2010; Eizirik, 2012).

En relación a la clasificación taxonómica intraespecífica del puma, Culver *et al.* (2000) realizaron un estudio filogeográfico en el cual evaluaron la diversidad genética actual e histórica del puma a través 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). Dicho estudio indicó que la mayoría de las 32 subespecies clásicas de puma no correspondían a unidades genéticas definibles y redujeron el número de subespecies reconocidas a seis: *P. concolor cougar* (América del Norte), *P. concolor costaricensis* (América Central), *P. concolor concolor*, *P. concolor cabrae*, *P. concolor puma* y *P. concolor capricorniensis* (América del Sur) (Figura 2). En Argentina podemos encontrar las tres últimas subespecies mencionadas (Culver *et al.*, 2000; Perovic y Pereira, 2006). Las cuatro subespecies que se distribuyen en América del Sur indican que la mayor parte de la subdivisión histórica de la especie se produjo en dicho subcontinente. Por otra parte, se observó que los pumas de América del Norte parecen ser parte de una única población panmítica que comparte el mismo haplotipo de ADN mitocondrial y tiene una baja variabilidad genética, lo que puede deberse a la

extinción de la especie hace 0,3 millones de años, junto con otros grandes mamíferos de América del Norte durante la glaciación del Pleistoceno medio (Culver *et al.*, 2000). En consecuencia, los pumas presentes en América del Norte probablemente desciendan de un evento de recolonización reciente desde América del Sur ocurrido hace alrededor de 10.000-12.000 años atrás (Pleistoceno tardío/Holoceno), ya que en esta última región se observó mayor diversidad genética que para los pumas distribuidos en América Central y América del Norte (Culver *et al.*, 2000; Caragiulo *et al.*, 2013; Ochoa *et al.*, 2017; Ochoa *et al.*, 2019; Head, 2021).



Figura 2. Rangos geográficos de las seis subespecies de *Puma* definidas a través de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares. NA: Norteamérica, CA: Centroamérica, NSA: Norte de

Sudamérica, ESA: Este de Sudamérica, CSA: Centro de Sudamérica, SSA: Sur de Sudamérica. Imagen tomada de Mac Allister (2019) (modificada de Culver *et al.*, 2000).

1.2. Descripción, morfología y reproducción del puma

El *Puma concolor* es la cuarta especie de felino más grande del mundo, con una masa corporal comparable a la del leopardo (*Panthera pardus*) o al leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) (Logan y Sweanor, 2001). En América Central y América del Sur, es junto con el yagareté (*Panthera onca*), el mayor predador (Laundré y Hernández, 2010) y, en América del Norte, comparte su territorio con tres grandes carnívoros, el lobo (*Canis lupus*), el oso gris (*Ursus arctos horribilis*) y el oso negro (*Ursus americanus*) (López-González y Romero, 1998).

Al igual que en muchos mamíferos, el tamaño corporal del puma generalmente aumenta con el aumento de la latitud (Kurtén, 1973). Es variable entre las subespecies, pero los machos generalmente pesan entre 55 y 70 kg (con machos adultos de hasta 120 kg registrados) y las hembras entre 35 y 45 kg (Banfield, 1974; Currier, 1983; Machado *et al.*, 1998). La longitud total desde el hocico hasta la punta de la cola suele oscilar entre 2,2 y 2,3 m en los machos y entre 2,0 y 2,1 m en las hembras (Currier, 1983). El puma es grande y delgado (Currier, 1983), la cabeza es pequeña en relación con el cuerpo; el cuello y la cola son largos; la cara es corta y las orejas son pequeñas, cortas y redondas (Matte, 2012). Presenta adaptaciones morfológicas necesarias para el tipo de caza de emboscada que emplea, tales como garras afiladas y retráctiles, músculos bien desarrollados, mandíbula de huesos robustos y sin movimiento hacia atrás y hacia adelante, al igual que una clavícula desarrollada que le confiere más fuerza y flexibilidad en los cuartos delanteros (Currier, 1983). Las extremidades traseras son más largas en relación a las delanteras, indicando una posible adaptación para saltar en suelos irregulares (Gonyea y Ashworth, 1975). Tienen cinco dedos en las patas delanteras y cuatro en las traseras (CEAL, 1985). Son ágiles, tienen un gran poder de impulso, facilidad para nadar, pero evitan entrar al agua. La visión es el sentido más agudo, seguido del oído (Nowak, 1999).

Posee una coloración general uniforme en todo el cuerpo, con un pelaje que varía desde tonalidades de grises hasta pardo rojizo, más pálido (a veces casi blanco) en labios, interior de orejas, mentón y partes inferiores del cuerpo y más oscuro (negro o marrón oscuro) en comisuras de la boca, exterior de orejas y punta de la cola (Iriarte, 2008; Chebez y Nigro, 2010). Los cachorros tienen manchas oscuras en el pelaje y ojos azules hasta aproximadamente los seis meses de vida (Matte, 2012). El patrón de pelo agutí es común entre los mamíferos y probablemente ayude en el camuflaje (Currier, 1983).

El puma es un animal territorial, de hábitos solitarios y crepusculares o nocturnos, aunque también presenta actividad diurna (Iriarte *et al.*, 2013). Tal como sucede en otras especies poligínicas, el territorio de los machos se superpone con el de varias hembras (Logan y Swenar, 2001). Como refugio utiliza cuevas, madrigueras en espesa vegetación y árboles altos (Silva, 1984). Para el marcado del territorio, habitualmente orina en los árboles, rasca troncos y suelos y defeca en lugares visibles como senderos y rocas (Nowak, 1999).

Estudios recientes señalan que esta especie no es completamente solitaria sino que las asociaciones entre machos y hembras ocurren dentro y fuera de las épocas de apareamiento (Elbroch *et al.*, 2015, 2017), la cual puede durar hasta 16 días (Logan y Swenar, 2010). Las hembras eventualmente pueden tener comportamiento poliándrico, reproduciéndose con más de un macho (Allen *et al.*, 2015). Además pueden entrar en celo en cualquier época del año, pero la mayoría de los nacimientos se producen en primavera o verano. El intervalo entre nacimientos suele ser de 18 a 24 meses, aunque puede ocurrir a los 12 meses (Russell, 1980; Currier, 1983). El período de gestación se extiende entre 13 y 14 semanas (Muñoz-Pedreros y Yáñez-Valenzuela, 2009) y las camadas, generalmente, varían de 1 a 3 cachorros (Logan y Swenar, 2010). 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), tiempo tras el cual se separan y establecen sus propios territorios (Nowell y Jackson, 1996).

1.3. Patrón de predación y dieta

La intensidad de la predación suele variar espacialmente dependiendo de factores como la disponibilidad de refugios para la presa y el predador y la abundancia de presas alternativas, entre otros (Kolowski y Holekamp, 2006; Ford *et al.*, 2014; Bolgeri y Novaro, 2015). La estructura del hábitat es particularmente importante para poder preda. Para esta especie, ambientes que proveen suficiente visibilidad para observar su presa pero, al mismo tiempo, permanecer oculto, son ideales ya que el predador puede acercarse a una determinada distancia sin ser detectado (Laundré y Hernández, 2010). Principalmente, al puma se lo encuentra en ambientes dominados por una abundante cobertura de vegetación y una topografía irregular que le permiten acechar y emboscar a sus presas, y, aunque es una especie veloz y ágil, posee una reducida capacidad pulmonar, la cual limita su habilidad de realizar persecuciones por largas distancias de presas veloces, así como de escapar de otros predadores con mayor resistencia (como por ejemplo los lobos; Murphy y Ruth, 2010). Por necesidad, los pumas están adaptados a estrategias de caza en las cuales sujetan y controlan presas de gran tamaño, utilizando músculos bien desarrollados de los miembros anteriores y de los hombros (Gonyea, 1976; Taylor, 1989; Taber *et al.*, 1997; Logan y Swenar, 2001; Murphy y Ruth, 2010; Zanón-Martínez *et al.*, 2017).

En general, los pumas, luego de matar a sus presas, suelen arrastrarlas hacia áreas con una mayor cobertura, donde las cubren con la vegetación disponible y de esa manera quedan disponibles para alimentarse en otro momento (Beier *et al.*, 1995; Hayward *et al.*, 2006; Murphy y Ruth, 2010).

La dieta del puma puede variar con la latitud: los individuos de clima templado generalmente consumen presas de mayor tamaño que aquellos de climas tropicales (Iriarte *et al.*, 1990). Además, en la actualidad, factores antrópicos como la introducción de especies silvestres y domésticas, la fragmentación y modificación de los hábitats y la persecución directa de las presas, han modificado la dieta de este depredador, así como también aumentado

su riesgo de extinción tanto local como ecológica (Novaro *et al.*, 2000; Zanón-Martínez *et al.*, 2012). El puma es un predador generalista y oportunista, teniendo una dieta muy diversa (Sunquist y Sunquist, 2002; Iriarte *et al.*, 2013). Consume preferentemente mamíferos terrestres de diferentes tamaños. En las zonas templadas de Norte América las presas principales son los grandes ungulados, especialmente venados. En Centro América el puma se alimenta con mayor frecuencia de especies medianas y pequeñas; mientras que en Sud América las presas tienden a ser de tamaño mediano: capibaras (*Hydrochaeris*) y agutíes (*Dasyprocta* y *Agouti*) en Perú y Brasil, venados (*Mazama*), armadillos (*Dasypus*) y pecaríes (*Tayassu* y *Pecari*) en el Chaco y pudúes (*Pudu puda*) en Chile, aunque las presas de gran tamaño como el guanaco no son raras en algunas regiones del sur de Chile (Emmons, 1987; Iriarte *et al.*, 1990; Taber *et al.*, 1997; Rau y Jiménez, 2002; Pacheco *et al.*, 2004). Las presas pequeñas (liebres europeas y roedores pequeños) son comunes en varias regiones, pero no siempre constituyen gran porcentaje en biomasa. Al parecer, el puma tiende a concentrar su dieta en unas pocas especies en cada región, las cuales conformarían la mayor parte del aporte en biomasa, a la vez que aprovechan presas de diferentes tamaño en algunas regiones, lo cual podría estar correlacionado con la abundancia de las presas. Además, no descarta reptiles y aves e incluso, en circunstancias donde hay escasez de presas salvajes, los animales domésticos se vuelven parte de su dieta (Currier, 1983; Iriarte *et al.*, 1990; Nowak, 1999; McClinton *et al.*, 2000; Fontana *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2004; Sarasola *et al.*, 2016). En Argentina, como prueba de su reconocido comportamiento generalista y oportunista, el puma podría depredar fuertemente, independientemente de su tamaño, a las especies más abundantes y disponibles en un área determinada, como las vizcachas de llanura (*Lagostomus maximus*) en el desierto del Monte en el centro de Argentina (Branch *et al.*, 1996), pingüinos en la costa sur de la Patagonia (Zanón-Martínez *et al.*, 2012), palomas en el bosque semiárido del bioma Espinal (Sarasola *et al.*, 2016) o ungulados salvajes como los guanacos (*Lama guanicoe*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*) en el noroeste argentino (Donadio *et al.*, 2009). Además, puede alimentarse de , liebres europeas (*Lepus europaeus*), agutíes (*Dasyprocta* spp.),

corzuelas (*Mazama* spp.), tapires (*Tapirus terrestris*), maras (*Dolichotis patagonum*), ñandúes (*Rhea americana*), choiques (*Rhea pennata*), piches (*Zaedyus pichiy*), peludos (*Chaetophractus villosus*) y también suele preñar ganado doméstico, sobre todo yeguarizos, ovinos o caprinos (Branch *et al.*, 1996; Novaro *et al.*, 2000; Donadio *et al.*, 2009; Chebez y Nigro, 2010; Zanón-Martínez *et al.*, 2012; Fernández y Baldi, 2014; Sarasola *et al.*, 2016; Zanón-Martínez *et al.*, 2016).

1.4. Áreas de acción y dispersión

El solapamiento de las áreas de acción (o *home range*) y sus tamaños, en el caso del puma, se ven muy influenciados por el sexo de los individuos (Grigione *et al.*, 2002; Logan y Sweanor, 2010). Su territorio varía entre 56 y 375 km², el cual en el macho es mayor y rara vez se superpone con territorios de otros machos (Pierce *et al.*, 2000). Generalmente se superpone con el área de acción de varias hembras, siendo que la mayoría de las mismas no ocupan más de 100 km² (Nowell y Jackson, 1996), ocupando áreas aún más restringidas cuando están acompañadas de descendencia (Grigione *et al.*, 2002). El tamaño del área de acción de esta especie también se ve afectado por las interacciones sociales, el comportamiento reproductivo, la estructura del hábitat (Jetz *et al.*, 2004; Laundré y Loxterman, 2007), el tipo de presas disponibles y sus abundancias, así como por los factores antrópicos (Logan y Sweanor, 2001; Grigione *et al.*, 2002).

En las poblaciones de pumas, la dispersión generalmente ocurre entre los 10 y 33 meses. La dispersión comienza cuando la madre deja al cachorro en uno de los límites de su territorio y se va al lado opuesto, donde permanece durante 2-3 semanas (Beier, 1995). Tienen la capacidad de dispersarse largas distancias, las cuales son mayores en los machos que en las hembras. Estas últimas generalmente exhiben filopatría y establecen su territorio adulto cerca del de su madre (Lindzey *et al.*, 1994; Pierce *et al.*, 2000; Sweanor *et al.*, 2000). En concordancia con otras especies de mamíferos poligínicos, los machos juveniles son los que principalmente dispersan (Anderson *et al.*, 1992; Sweanor *et al.*, 2000)

y seleccionan los territorios según las oportunidades de apareamiento, mientras que las hembras lo eligen según la disponibilidad de presas y recursos (Stoner *et al.*, 2013). Esta dispersión de largo alcance (Pierce *et al.*, 1999) y la capacidad de propagación rápida (Riley y Malecki, 2001) facilitarían el flujo génico y la reducción de la subestructura genética poblacional (Castilho, 2010).

1.5. Distribución del *Puma concolor*

1.5.1. Su distribución en el mundo

El *Puma concolor* es el carnívoro con mayor distribución geográfica en el continente americano, desde Canadá hasta el extremo sur continental de Argentina y Chile (Figura 3) (Sunquist y Sunquist, 2002). Se caracteriza por una gran plasticidad ecológica, como demuestra su presencia en varios tipos de ambientes (desde desiertos áridos, bosques tropicales húmedos hasta bosques fríos de coníferas) a diferentes altitudes que pueden alcanzar hasta 5000 metros en la cordillera de los Andes (Redford y Eisenberg, 1992; Nowell y Jackson, 1996). Se adapta también a los ambientes degradados o modificados, y a situaciones de mucha presión antrópica. Al parecer su supervivencia estaría más ligada al grado de cobertura y refugio que tengan esos ambientes (Chebez y Nigro, 2010).

Para el siglo XIX el puma ocupaba toda la porción sur de Canadá y los Estados Unidos de Norteamérica y de México en América del Norte, así como toda la región continental de Centro y Sudamérica, llegando hasta el Estrecho de Magallanes en su extremo sur de distribución (Currier, 1983). El puma aún persiste en gran parte del área original, excepto en algunas zonas donde la expansión humana y la intensificación de las actividades agro-ganaderas han degradado sus hábitat naturales y, junto con la caza, han provocado su extinción local, regional e incluso ecológica (Nowell y Jackson, 1996; Logan y Swenar, 2001). Esto incluye el centro y este de los Estados Unidos y Canadá (en donde el retroceso ha sido más abrupto), algunas regiones más desarrolladas de Centroamérica, parte de la costa pacífica de Sudamérica, y el sudeste brasileño (Sunquist y Sunquist, 2002), desapareciendo además de gran parte de Uruguay

(Parera, 2002; Perovic, 2002; Martínez-Lanfranco *et al.*, 2010; González *et al.*, 2013). Estudios recientes indican intentos de recolonización en el Medio Oeste de los Estados Unidos debido a la presencia de un hábitat adecuado proporcionado por una espesa cobertura forestal y densidades humanas relativamente bajas (LaRue y Nielsen 2011, LaRue *et al.*, 2012).



Figura 3. Distribución de *Puma concolor* (Nielsen *et al.*, 2015) (<http://www.iucnredlist.org/>)

1.5.2. Distribución en Argentina

En Argentina, se ha confirmado su presencia en todas las provincias a excepción de Tierra del Fuego. En Entre Ríos contó con registros hasta la década del ´60, habiendo reaparecido recientemente (Chebez, 2009; Muzzachiodi, 2012; De Angelo *et al.*, 2019).

Históricamente, los pumas estaban presentes en casi todo el territorio argentino (Cabrera y Yepes, 1940), pero desde la introducción del ganado ovino

en 1877, la persecución y caza de esta especie ha sido constante. Esto llevó a que en la segunda mitad del siglo pasado, el puma haya sido extirpado de la mayor parte de la Patagonia (Bellati y Von Thungen, 1990; Novaro y Walker, 2005; Walker y Novaro, 2010) y también de grandes extensiones de la región pampeana (Parera, 2000; De Lucca, 2010, 2011), mientras que en el noreste del país, se ha registrado una declinación de sus poblaciones como consecuencia del alto nivel de fragmentación del territorio (De Angelo *et al.*, 2011). En la provincia de Buenos Aires, con el avance de las actividades agroganaderas, el rango de distribución de la especie también ha sufrido una marcada reducción concentrándose principalmente en la parte meridional y occidental (De Lucca, 2011).

En la actualidad todavía continúa el conflicto histórico entre los ganaderos y el puma, el cual es considerado uno de los principales predadores de ganado junto al zorro colorado (*Lycalopex culpaeus*). Sobre este felino, señalado como especie “plaga” o “dañina”, se centran gran parte de los esfuerzos, privados y estatales, destinados a su remoción (Bellati y Von Thungen, 1990; Travaini *et al.*, 2000; García Brea *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2016; Caruso *et al.*, 2017; Guerisoli *et al.*, 2017). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un restablecimiento de la presencia de este carnívoro en gran parte de la región pampeana (Bonnot *et al.*, 2011; Muzzachiodi, 2012; Chimento y De Lucca, 2014), la mayor parte de la región patagónica (Novaro y Walker, 2005), y la Mesopotamia (Di Blanco *et al.*, 2008; Soler y Cáceres, 2009; Muzzachiodi, 2012; Carmarán, 2013). 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. En particular, en la región pampeana, se han evidenciado cambios en el uso del suelo; áreas tradicionalmente ganaderas han dado lugar a monocultivos (Reboratti, 2010). Esta agriculturización, supone una menor presencia del hombre en los campos, un menor conflicto con depredadores y la posibilidad de que la cobertura vegetal, dada por los cultivos, favorezca el acecho, la captura y el ocultamiento de presas. De esta manera se puede haber favorecido en cierta medida, la recolonización de determinadas áreas del ecosistema de las pampas por parte de este férido (Novaro y Walker, 2005; Walker y Novaro, 2010;

Chimento y De Lucca, 2014). No obstante, en muchas de estas regiones su distribución aún se ve restringida por el hombre. Su presencia es poco frecuente en zonas urbanas y periurbanas, cercanas a viviendas o de uso más intensivo; y utiliza como refugio a las áreas protegidas o remanentes de ambientes naturales (Cabrera, 1961; De Angelo *et al.*, 2011; Pia *et al.*, 2013; Zanón-Martínez *et al.*, 2016).

1.6. Situación actual y amenazas

Globalmente las poblaciones de *Puma concolor* están decreciendo (Nielsen *et al.*, 2015), a pesar de su amplia extensión geográfica y gran plasticidad ecológica (Nowell y Jackson, 1996). Esto es debido, principalmente, a la caza ilegal y legalizada, y la fragmentación y pérdida de hábitat (Logan y Sweanor, 2001; Murphy y McDonald, 2010; De Angelo *et al.*, 2011; Zanón-Martínez *et al.*, 2016; Llanos, 2017; Paviolo *et al.*, 2018). Su presencia puede ser influenciada por factores antrópicos (actividades agrícola-ganaderas, presencia de caminos, centros habitados, entre otros) y variables como la cobertura vegetal, la topografía, la pendiente, la altitud y la presencia de cuerpos de agua, no sólo en forma directa sino también a través de los efectos que tienen sobre sus presas (Sweanor *et al.*, 2008; Monroy-Vilchis *et al.*, 2009; Llanos, 2017; Paviolo *et al.*, 2018). Las perturbaciones de cualquiera de estas variables afectan negativamente la riqueza de especies, la abundancia y distribución de poblaciones y la diversidad genética (Best *et al.*, 2001; Gibbs, 2001; Fahrig, 2003), y los carnívoros, como el puma, son particularmente vulnerables a esto por sus características biológicas intrínsecas (grandes tamaños corporales, amplias superficies territoriales, bajas densidades poblacionales, tasas de crecimiento poblacional bajas) (Crooks *et al.*, 2011). Los mismos ejercen una profunda influencia sobre las comunidades biológicas, a través de la predación y de la competencia interespecífica (Treves y Karanth, 2003; Ripple *et al.*, 2014) y su presencia puede considerarse un indicador de la integridad y el potencial de recuperación de un entorno. La ausencia de grandes carnívoros permite la aparición de explosiones poblacionales de depredadores medianos, que a su vez aumentan la presión de depredación sobre sus especies

de presas y pueden conducir a la extinción de especies más raras (Noss *et al.*, 1996). Por lo tanto, es importante mantener poblaciones viables de depredadores en los entornos para que jueguen su papel en la regulación de los ecosistemas y la conservación de la biodiversidad (Miller *et al.*, 2001; Terborgh *et al.*, 2001; Ripple *et al.*, 2014). Por estas razones, especies como el puma son denominadas “especies paraguas” (Noss *et al.*, 1996) y se pueden usar para establecer pautas para el manejo del ecosistema (Estes, 1996).

El puma, a lo largo de su distribución, se caracteriza por encontrarse también en paisajes dominados por actividades antrópicas (Riley y Malecki, 2001). Esto se produce además por el crecimiento constante de la población humana, la creciente expansión de las fronteras rurales y la deforestación de las áreas naturales, y genera conflictos con los humanos, principalmente por preñar el ganado doméstico (Rominger *et al.*, 2004; Michalski *et al.*, 2006; Zarco-González *et al.*, 2013; Luengos Vidal *et al.*, 2016). La solución encontrada por los agricultores con mayor frecuencia es la matanza de depredadores (Quigley y Crawshaw, 1992; Mazzolli *et al.*, 2002; Guerisoli *et al.*, 2017), que es una de las principales causas de mortalidad y disminución de las poblaciones (Nowell y Jackson, 1996). Inclusive en algunas provincias de Argentina se ha implementado un sistema de pago por recompensa como medida mitigadora en relación a la predación de ganado ovino por parte de pumas. Esto resulta ineficiente a la hora de prevenir la predación del ganado y en consecuencia se efectúan matanzas sin sentido (Ramadori, 2008). Según Novaro *et al.* (2004) esto ha llevado a su desaparición en gran parte de la región patagónica. La predación de animales domésticos puede estar también relacionada con la disponibilidad de presas silvestres de una región; de hecho, cuando las poblaciones de ungulados silvestres de medio y gran tamaño disminuyen o escasean, puede verificarse un aumento de la predación de ganado por parte de los felinos (Polisar *et al.*, 2003; de Azevedo y Murray, 2007; Kabir *et al.*, 2014).

La situación mundial del puma fue clasificada en el 2015 por UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) en la categoría

“Preocupación Menor” (LC), clasificación que se fundamenta principalmente por su amplia área de distribución (Nielsen *et al.*, 2015).

En Argentina, el estado de conservación del puma ha sido clasificado por la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM) también como de “Preocupación menor” (De Angelo *et al.*, 2019), debido a que presenta una distribución que cubre una buena parte del país y sólo algunas poblaciones pequeñas clasificarían para las categorías de “Casi amenazada” (NT) o “Vulnerable” (VU) (Guerisoli, 2018). A pesar de ello se observan situaciones particulares a nivel regional, siendo su grado de amenaza no debidamente evaluado hasta el presente. A su vez, esta especie prácticamente carece de protección legal explícita en la mayoría de las provincias del país, aunque en algunas podría considerarse amparado por las distintas Leyes Generales de Protección de Fauna, que si bien no protegen específicamente a la especie, sí lo hacen con la Fauna Silvestre en general. Su caza está prohibida en Jujuy, Salta, Mendoza, Córdoba, Misiones y Buenos Aires. La caza control por recompensas está reglamentada en Chubut y en Río Negro, y también se permite su caza control sin recompensa en Santa Cruz, La Pampa y en Neuquén. En estas últimas dos provincias además se permite su caza deportiva pero en el caso de La Pampa solo se autoriza en cotos de caza con criaderos (Chebez y Nigro, 2010; De Angelo *et al.*, 2019).

Estudios locales de América Central y del Sur analizaron el impacto de la predación del ganado por pumas *Puma concolor* y la mayoría de estos encontró percepciones negativas de la población local hacia esta especie, las cuales impulsan la caza preventiva y de represalia (Mazzolli *et al.*, 2002; Rosas-Rosas *et al.*, 2008; Kissling *et al.*, 2009; Borón y Payán, 2016; Peters *et al.*, 2016; Llanos *et al.*, 2020). Por lo tanto, es fundamental comprender la dinámica de este conflicto y el diseño de estrategias que combinen herramientas que favorezcan la tolerancia de los productores y la mitigación de las pérdidas por predación con la conservación de ambientes y especies presas claves del felino (Guerisoli *et al.*, 2017; Llanos *et al.*, 2020). Además, en muchos lugares, la inadecuada gestión y

manejo del ganado es en parte responsable de altos niveles de predación del mismo (Inskip y Zimmermann, 2009; Llanos *et al.*, 2020).

1.7. Variabilidad genética y patrones filogeográficos en *Puma concolor*

La filogeografía es un área de investigación que une la Filogenética con la Genética de Poblaciones y que ha crecido mucho debido a los avances en los métodos de obtención de datos genéticos, la capacidad para almacenar y analizar grandes volúmenes de datos, y al continuo desarrollo de herramientas bioinformáticas. Los métodos filogeográficos permiten conocer la diversidad genética de las especies a lo largo de su distribución geográfica, identificar señales de eventos históricos, como barreras geográficas, fragmentación de hábitats, patrones de dispersión de especies y poblaciones, eventos de migración, extinción de linajes genéticos, y zonas de refugio, dentro de las poblaciones contemporáneas. La aplicación de análisis filogeográficos es una herramienta muy poderosa en estudios de biología de la conservación, permitiendo evaluar el potencial evolutivo de las especies. (Avice, 2000; Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009; Hickerson *et al.*, 2010; Scoble y Lowe, 2010).

Para diferentes estudios filogeográficos en puma, los marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) han resultado una herramienta muy útil ya que han proporcionado información valiosa con respecto a la diversidad y flujo genético, estructura poblacional e historia demográfica y evolutiva de la especie (Matte *et al.*, 2013; Gallo *et al.*, 2021).

El ADN mitocondrial consiste en material genético citoplasmático circular de ADN bicatenario, localizado en el interior de las mitocondrias. Este genoma posee alrededor de 15 a 20 kb y presenta dos regiones de ADN. Una región no codificante (región control o D-loop), que tiene como finalidad la regulación de la expresión de los genes mitocondriales, y una región codificante, que representa el 90% del genoma mitocondrial, formada por 37 genes que codifican 22 ARNt, 2 ARNr y 13 ARNm (Anderson *et al.*, 1981; Wallace, 1986; Núñez Domingo, 2011).

El ADNmt se considera un buen marcador molecular para estudiar la diferenciación genética reciente, ya que evoluciona más rápidamente al acumular mutaciones con 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, haploide y no recombinante, por lo que se evitan las ambigüedades producidas por la recombinación que ocurre durante la meiosis en los genes nucleares (Brown, 1985; Avise *et al.*, 1987). Estas características lo hacen especialmente útil como herramienta molecular para develar la estructura genética de las poblaciones, su historia evolutiva y demográfica, y relaciones inter e intraespecíficas (Avise, 1998; Forster, 2004; Charruau *et al.*, 2011; Matte *et al.*, 2013; Gallo *et al.*, 2021), permitiendo su aplicación para la reconstrucción filogenética (Moore 1995). Debido a que no es biparental, tiene una mayor sensibilidad que los marcadores autosómicos en la identificación de procesos demográficos históricos, y la comparación de sus patrones evolutivos permite una reconstrucción más detallada de la historia de los organismos investigados (Moore, 1995).

1.7.1. Región Control del ADN mitocondrial

La Región Control (RC) mitocondrial, la única sección significativa no codificante, está ubicada en mamíferos entre los genes tRNA-Pro y tRNA-Phe (Jae-Heup *et al.*, 2001). En felinos abarca aproximadamente 1560 pb (Lopez *et al.*, 1996). Funcionalmente, las secuencias dentro de la RC regulan la transcripción y replicación del ADNmt. En la mayoría de las especies tiene una región conservada central (CCR) que está rodeada por regiones más variadas ricas en A / T (Jae-Heup *et al.*, 2001). 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).

La RC es la región de evolución más rápida de la molécula de ADNmt (Aquadro y Greenberg, 1983; Brown *et al.*, 1993; López *et al.*, 1997). Por lo tanto, es uno de los marcadores más utilizados en carnívoros y principalmente en felinos para estudios filogeográficos en la determinación de las relaciones evolutivas entre especies y/o subespecies estrechamente relacionadas (*Leopardus pardalis* y *L. wiedii* - Eizirik *et al.*, 1998; *Panthera onca* - Eizirik *et al.*, 2001; *Panthera pardus* - Uphyrkina *et al.*, 2001; *Lynx pardinus* - Johnson *et al.*, 2004; *Puma concolor* - Culver *et al.*, 2008; *Acinonyx jubatus* - Charruau *et al.*, 2011). Además, las partes de la RC que evolucionan más rápidamente han demostrado ser útiles para los análisis de alta resolución de la estructura genética poblacional (Stoneking *et al.*, 1991; Avise, 1994; Eizirik *et al.*, 1998, 2001; Charruau *et al.*, 2011) y para la identificación individual (Holland y Parsons, 1999).

1.8. Problemática de estudio

En Argentina hay escasa información acerca del puma en cuanto a la variabilidad genética de sus poblaciones, y es por ello que se plantea ampliar la investigación de estos estudios, lo que contribuirá al desarrollo de estrategias de conservación y manejo eficientes para preservar las comunidades ecológicas en las que habita esta 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 mitocondrial (Región Control) a partir del cual se espera obtener información demográfica y filogeográfica para las poblaciones de pumas del centro-sur de Argentina, y discutir estos resultados en un contexto de conservación.

2. HIPÓTESIS

- Dada la gran capacidad de dispersión y amplios tamaños de área de acción del *Puma concolor*, las poblaciones de pumas del centro-sur de Argentina presentan baja divergencia genética a nivel regional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar los patrones de variabilidad genética en poblaciones de pumas del centro-sur de Argentina.

3.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones de puma del centro-sur de Argentina mediante el marcador molecular Región Control.
2. Identificar las relaciones haplotípicas entre las poblaciones de *Puma concolor* del centro-sur de Argentina y analizarlas en un contexto filogeográfico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

El área de estudio abarca el centro-sur de Argentina comprendiendo el ecotono Monte-Patagonia y tres de las once provincias fitogeográficas: Pampeana, Monte y Patagónica, identificados por Oyarzabal *et al.* (2018).

4.2. Obtención de las muestras

El trabajo se desarrolló a partir de muestras de ADN y distintos tejidos (músculo, estómago, piel y pelos) pertenecientes a diferentes poblaciones de puma del centro y sur de Argentina, colectadas en las provincias de Buenos Aires (San Nicolás, n=2; Colón, n=1; General Pinto, n=1; Chacabuco, n=1; General Villegas, n=1; Villarino, n=5 y Carmen de Patagones, n=10), Santa Fe (Constitución, n=1), La Pampa (Loventué, n=2; Curacó, n=3 y Lihuel Calel, n=2), Neuquén (Collón Curá, n=14), Rio Negro (Pichi Mahuida, n=1; General Conesa, n=3; Adolfo Alsina, n=5; San Antonio, n=2; Pilcaniyeu, n=2; 25 de mayo, n=3 y Valcheta, n=2), Chubut (Biedma, n=5; Telsen, n=1; Cushamen, n=5; Futaleufú,

n=3; Mártires, n=4; Paso de Indios, n=2; Sarmiento, n=3 y Río Senguer, n=1) y Santa Cruz (Puerto Deseado, n=19 y Corpen Aike, n=5) (Figura 4). Dichas muestras fueron recuperadas de pumas atropellados en rutas, 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), el Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) en Bahía Blanca, Dirección de Flora y Fauna Silvestre de la provincia de Chubut, el Instituto de Ciencias de la Tierra y Ambientales de La Pampa (INCITAP) e Instituto Patagónico de Ciencias Sociales y Humanas (IPCSH – CENPAT). Para cada una de las 110 muestras se cuenta con información del año de colecta y georreferencia de la provincia, departamento y localidad de colecta (Tabla 1). Las muestras fueron depositadas en el banco de muestras del Centro de Bioinvestigaciones (CeBio, CITNOBA/CICBA) y conservadas en alcohol 96° en *freezer* (-20°C) para su posterior utilización.

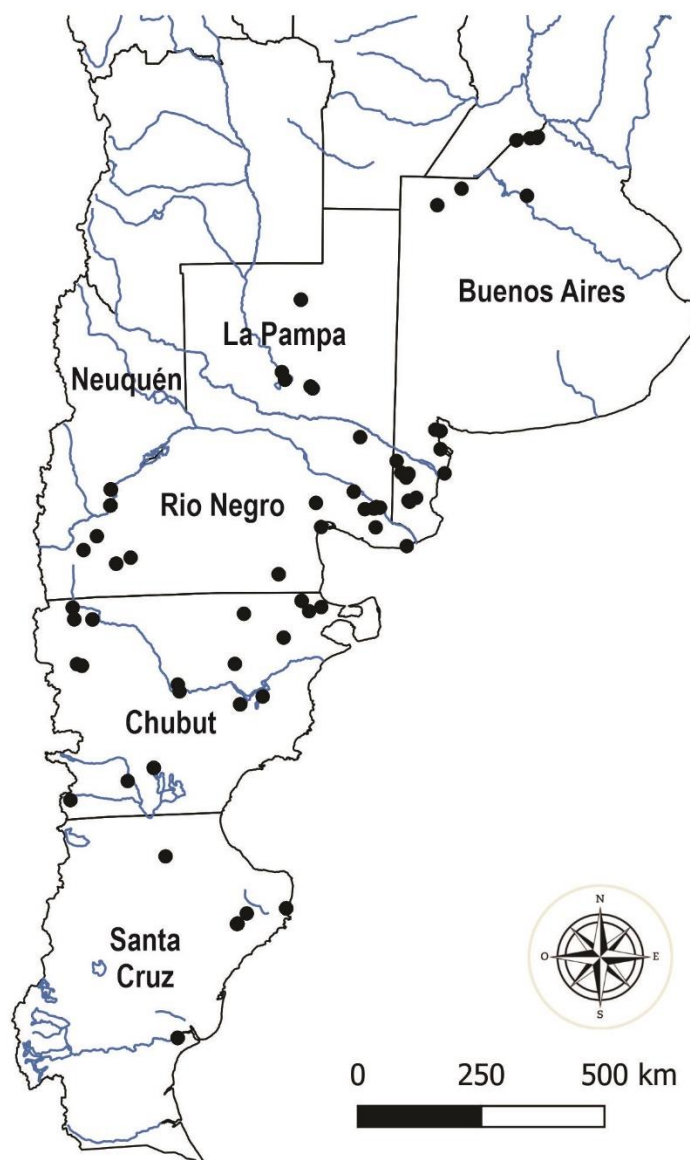


Figura 4. Distribución geográfica de las muestras de *Puma concolor* del centro-sur de Argentina utilizadas en este estudio. El detalle de las mismas se presenta en la Tabla 1.

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). Se asignaron abreviaturas para cada región geográfica (BA_N: Norte de Buenos Aires; BA_S: Sur de Buenos Aires; SF: Santa Fe; LP: La Pampa; N: Neuquén; RN_N: Norte de Río Negro; RN_S: Sur de Río Negro; Chu_N: Norte de Chubut; Chu_S: Sur de Chubut; SC: Santa Cruz).

Provincia	Departamento	Localidad	n	Latitud	Longitud
BA_N	San Nicolás	Estancia La Esperanza	1	-33.565906	-60.432556
		Campo Cristian Estrada (frente a La Esperanza)	1	-33.587084	-60.446169
	Colón	Pearson	1	-33.650088	-60.895567
	General Pinto	Germania	1	-34.575404	-62.050201
	Chacabuco	Chacabuco	1	-34.648804	-60.6026
	General Villegas	Santa Regina	1	-34.568755	-63.170951
BA_S	Villarino	Ombucta	1	-38.979052	-62.42995407
	Patagones	14km al Oeste de Stroender	1	-40.231208	-62.820421
	Villarino	Villarino	1	-39.329297	-62.28769655
	Villarino	Villarino	1	-39.765117	-62.17107597
	Villarino		1	-38.998492	-62.305437
	Patagones	5km al este del límite con la provincia de Río Negro	1	-39.573699	-63.31194033
		30km al oeste de Igarzabal	1	-39.783272	-63.193152
		20km al oeste de Igarzabal	1	-39.797211	-63.02080324
		20km al oeste de Igarzabal	1	-39.805064	-63.02530317
		20km al oeste de Villalonga	1	-39.859533	-63.07295315
20km al oeste de Villalonga		2	-39.868801	-63.07206262	
20km sur-oeste de Stroeder		2	-40.288579	-62.99736468	
	10km Norte Lago Sal del Algarrobo	1	-40.306857	-62.973616	
SF	Constitución	General Gelly	1	-33.5997222	-60.59777778
LP	Loventué	La Vigilancia	2	-36.66223679	-65.5843247
	Curacó	Desafío Pampeano	1	-37.9823748	-66.01689999
		Del Miro Ortiz	2	-38.12092072	-65.94329741
	Lihuel Calel	Dario	1	-38.24395103	-65.35302504
		La Tortuga	1	-38.27957199	-65.30161448
N	Collón Curá	Estancia Campanario	9	-40.0502778	-70.07777778
		Ancatrú	5	-40.3419444	-70.10333333
RN_N	Pichi Mahuida	Pichi Mahuida	1	-39.155	-64.183
	General Conesa	Colonia La Luisa	2	-40.149	-64.305
		General Conesa	1	-40.465	-64.036
	Adolfo Alsina	Estancia Melipal	1	-40.4219028	-63.76350556
		Guardia Mitre	1	-40.43	-63.674
		Primera Angostura	1	-40.45	-63.818
		Vicealmirante E. O'Connor	1	-40.792	-63.765
		La Lobería	1	-41.115	-63.004
	San Antonio	Lago Salinas del Gualicho	1	-40.365147	-65.204113
		Las Grutas	1	-40.804	-65.075

RN_S	Pilcaniyeu	San Pedro	1	-40.888	-70.463
		Pichi Leufú	1	-41.126	-70.801
	25 de Mayo	Ingeniero Jacobacci	1	-41.306	-69.675
		25 de Mayo	2	-41.405	-70.03
	Valcheta	Arroyo de la Ventana	2	-41.667	-66.095
Chu_N	Biedma	El Porvenir	2	-42.15053973	-65.53288161
		Estancia la Colmena	1	-42.26222577	-65.05085778
			1	-42.33933566	-65.3488582
	Telsen	Telsen	1	-42.38333333	-66.95
		Sierra Chata	1	-42.8215907	-65.97390604
	Cushamen	El Maitén	1	-42.16007404	-71.14508598
		Leleque	2	-42.37333558	-71.1221829
		Fofo Cahuel	2	-42.39607507	-70.67681021
	Futaleufú	20km este de Trevelin	1	-43.19034296	-71.12485828
		30km este de Trevelin	2	-43.22455697	-71.00151374
	Mártires	Estancia La Jamaitru	1	-43.29458222	-67.18962814
		10Km sur del Dique Florentino Ameguíno	1	-43.89284436	-66.50129348
		20Km norte del Lago Gran Lago Salado	2	-44.03318891	-67.07251698
Chu_S	Paso de Indios	15Km noroeste de Los Altares	1	-43.64634409	-68.63000299
		10Km noroeste de Los Altares	1	-43.77208629	-68.59323315
	Río Senguer	Facundo	1	-45.36381606	-70.00423952
	Sarmiento	10Km norte de Lago Musters	3	-45.14618304	-69.31847976
SC	Deseado	El Porvenir	1	-46.763475	-69.10313333
		Puerto Deseado	6	-47.7513889	-65.90141667
		El Recuerdo	1	-47.84	-66.97
		Estancia El Águila	10	-48.025159	-67.2254
		Estancia El Águila	1	-48.03	-67.24
	Corpen Aike	Estancia La Suerte	5	-50.07	-68.97

4.3. Procedimientos de laboratorio

4.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de extracción con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook y Russel, 2006). Las muestras de ADN fueron rotuladas y almacenadas en un *freezer* a -20°C.

La eficiencia en la extracción se verificó estimando la calidad y cantidad de ADN mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% (1 gr de agarosa/100 ml de TBE) sometido a 100 volts durante 60 minutos. Se visualizó por exposición a luz ultravioleta con previa tinción en Bromuro de Etidio. En cada calle del gel se sembraron 3 µl de muestra junto a 3 µl de buffer de siembra *DNA gel-loading dye* con el fin de identificar el frente de corrida. El ADN se cuantificó a partir de una comparación de intensidad óptica entre la banda de nuestro aplicón y la de un marcador de peso molecular (concentración conocida) usando el software ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004).

4.3.2. Amplificación del marcador molecular mitocondrial Región Control

Para poder analizar las muestras de ADN obtenidas se amplificó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un fragmento génico correspondiente a la Región Control, de aproximadamente 400 pb. Los *primers* utilizados fueron: *Forward*: PDL3N (5'-GACCTCAACTGTCCAAAGG-3'; Culver *et al.*, 2008), y *reverse*: RCP_R (5'-GTCCTGTGACCATTGACTGA-3'; Mac Allister *et al.*, 2021).

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. Se agregó un control negativo para corroborar la ausencia de posibles contaminantes.

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.

4.3.3. Comprobación de la eficacia de la amplificación

Se realizó una electroforesis en agarosa para determinar la presencia, tamaño y concentración adecuados de los productos de la amplificación génica. Se utilizó un gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Se empleó 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).

Las muestras que presentaron 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.

4.3.4. Secuenciación de los fragmentos amplificados de ADNmt

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 Cyclor (Bioer Technology CO., LTD).

Una vez purificados, los productos de amplificación fueron secuenciados mediante el servicio de la compañía MacroGen (Corea del Sur, www.macrogen.com) a través del secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

4.4. Análisis de datos genéticos

4.4.1. Limpieza y alineamiento de las secuencias

Para los análisis de las secuencias del marcador Región Control de *Puma concolor* se utilizó el set completo de secuencias obtenidas en este estudio (n=110), las cuales inicialmente fueron corroboradas visualmente y corregidas usando el programa *BioEdit* (Hall, 2004). Luego se realizó un alineamiento múltiple a través del algoritmo ClustalW del programa *BioEdit* (Hall, 2004). Como *outgroups* se utilizaron secuencias de Región control pertenecientes al yaguareté (*Panthera onca*) y yaguarundí (*Herpailurus yagouaroundi*), tomadas de *GenBank* (AH009755.2 y JX901168.1, respectivamente).

4.4.2. Patrón filogeográfico

Para determinar el patrón filogeográfico de *Puma concolor* se describió la diversidad genética de las secuencias mitocondriales, la distribución geográfica de los haplotipos, se realizaron análisis filogenéticos y Análisis Bayesianos de Estructura Poblacional (BAPS).

4.4.2.1. Variabilidad genética y distribución haplotípica

Para analizar tanto la diversidad haplotípica como la nucleotídica, y el número de sitios polimórficos, se utilizó el programa DnaSP versión 6 (Rozas *et al.*, 2017).

Las relaciones haplotípicas fueron definidas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa PopART v1.7 (Leigh y Bryant, 2015).

La distribución geográfica de los haplotipos fue obtenida a través del software de Sistema de Información Geográfica QGIS 3.4.1 (Quantum Geographic Information System) (QGIS Development Team, 2020).

4.4.2.2. Abordaje filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron a partir del set completo de secuencias. Utilizando el criterio de Inferencia Bayesiana, con el paquete informático BEAST v1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012), se generó un árbol utilizando un modelo de reloj molecular relajado (*Relaxed Clock: Uncorrelated Lognormal*) y una tasa de ramificación utilizando un criterio de coalescencia (*Coalescent: Constant Size*). Previamente se estimó el modelo de sustitución de un nucleótido por otro y el modelo de heterogeneidad de sitios al que mejor ajusta nuestro set de datos, con el programa jModelTest versión 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012), obteniéndose el HKY+I (modelo Hasegawa-Kishino-Yano con sitios invariables). Con el programa Tracer v1.6 (Rambaut *et al.* 2014) se analizó de forma gráfica y estadística la salida de BEAST para verificar el rendimiento y la precisión. Los valores de tamaño de muestra efectivo ESS fueron superiores a 200, siendo este el límite utilizado para la confiabilidad de la calidad del muestreo de árboles que hace el análisis. Las corridas independientes fueron resumidas en TreeAnnotator v1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012), eligiendo la opción *Maximum Clade Credibility* (MCC). Los primeros 1.000 árboles fueron descartados y los restantes se utilizaron para visualizar el árbol en el software FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Utilizando el programa MEGA11, y el modelo evolutivo de HKY+I (Hasegawa *et al.*, 1985; Tamura *et al.*, 2021) se generó el árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML). 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 500 réplicas.

4.4.2.3. Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional (BAPS)

Se realizó un análisis bayesiano de la estructura poblacional con el *software* BAPS v6.0 (Corander y Tang, 2007; Corander *et al.*, 2008). Para ello se utilizó el modelo de agrupación con *loci* vinculados (*Clustering with linked loci*) y se determinó el número más probable de agrupamientos o *clusters* tomando valores de k comprendidos en un rango de 2 a 10 realizando 5 repeticiones para cada valor de k. Con el resultado obtenido se prosiguió con el análisis *Admixture based*

on *mixture clustering*, donde se definió un tamaño mínimo de cinco individuos por población. Para el número de iteraciones que se utilizan para estimar los coeficientes de mezcla para los individuos se utilizó un valor de 100, para el número de individuos de referencia de cada población un valor de 200 y para el número de iteraciones para estimar los coeficientes de mezcla de los individuos de referencia, un valor de 10.

5. RESULTADOS

5.1. Estimaciones de variabilidad genética

Para las secuencias analizadas del marcador mitocondrial Región Control (353 pb) de las 110 muestras pertenecientes a las poblaciones de puma del centro y sur de Argentina se obtuvieron 8 sitios polimórficos y 5 haplotipos diferentes (Tabla 2). La diversidad haplotípica estimada fue $H_d = 0,539 (\pm 0,00195)$ y la diversidad nucleotídica, $\pi = 0,00719 (\pm 0,0000005)$.

Tabla 2. Sitios variables encontrados para los haplotipos (hap) obtenidos para el fragmento génico (353 pb) de RC mitocondrial en muestras de *P. concolor* (n=110). Los códigos de cada región geográfica se corresponden con aquellos utilizados en la Tabla 1 (BA_N: Norte de Buenos Aires; BA_S: Sur de Buenos Aires; SF: Santa Fe; LP: La Pampa; N: Neuquén; RN_N: Norte de Río Negro; RN_S: Sur de Río Negro; Chu_N: Norte de Chubut; Chu_S: Sur de Chubut; SC: Santa Cruz).

Hap	Sitios polimórficos								Haplotipos por ubicación geográfica									n	
	65	66	77	103	109	110	113	144	BA_N	BA_S	SF	LP	N	RN_N	RN_S	Chu_N	Chu_S		SC
Hap_1	G	G	C	C	A	G	T	G	0	1	0	0	14	4	6	14	7	24	70
Hap_2	.	.	.	T	0	2	0	3	0	3	1	3	0	0	12
Hap_3	A	A	T	.	G	A	C	.	6	12	1	0	0	4	0	1	0	0	24
Hap_4	A	A	T	T	G	A	C	.	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
Hap_5	.	A	T	.	G	A	C	A	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
Total									6	15	1	7	14	11	7	18	7	24	110

5.2. Análisis filogenético

Se generaron los árboles filogenéticos utilizando las secuencias de los cinco haplotipos obtenidos de las 110 muestras analizadas para el fragmento génico de 353 pb del marcador mitocondrial Región control.

Se observó una congruencia entre los resultados obtenidos para el marcador mitocondrial RC mediante las dos metodologías estudiadas, Máxima verosimilitud (MV) e Inferencia bayesiana (IB), por lo que sólo se muestran los resultados a través de este último método (Figura 5).

En las reconstrucciones filogenéticas se puede observar la separación de dos grandes clados con el máximo valor de probabilidad posterior (1) (Figura 5). Los haplotipos 1 y 2 pertenecientes principalmente al sur de Argentina, representando a la Región patagónica, se agrupan en un clado (Clado I) separado de los haplotipos 3, 4 y 5 encontrados mayoritariamente en el centro de Argentina.

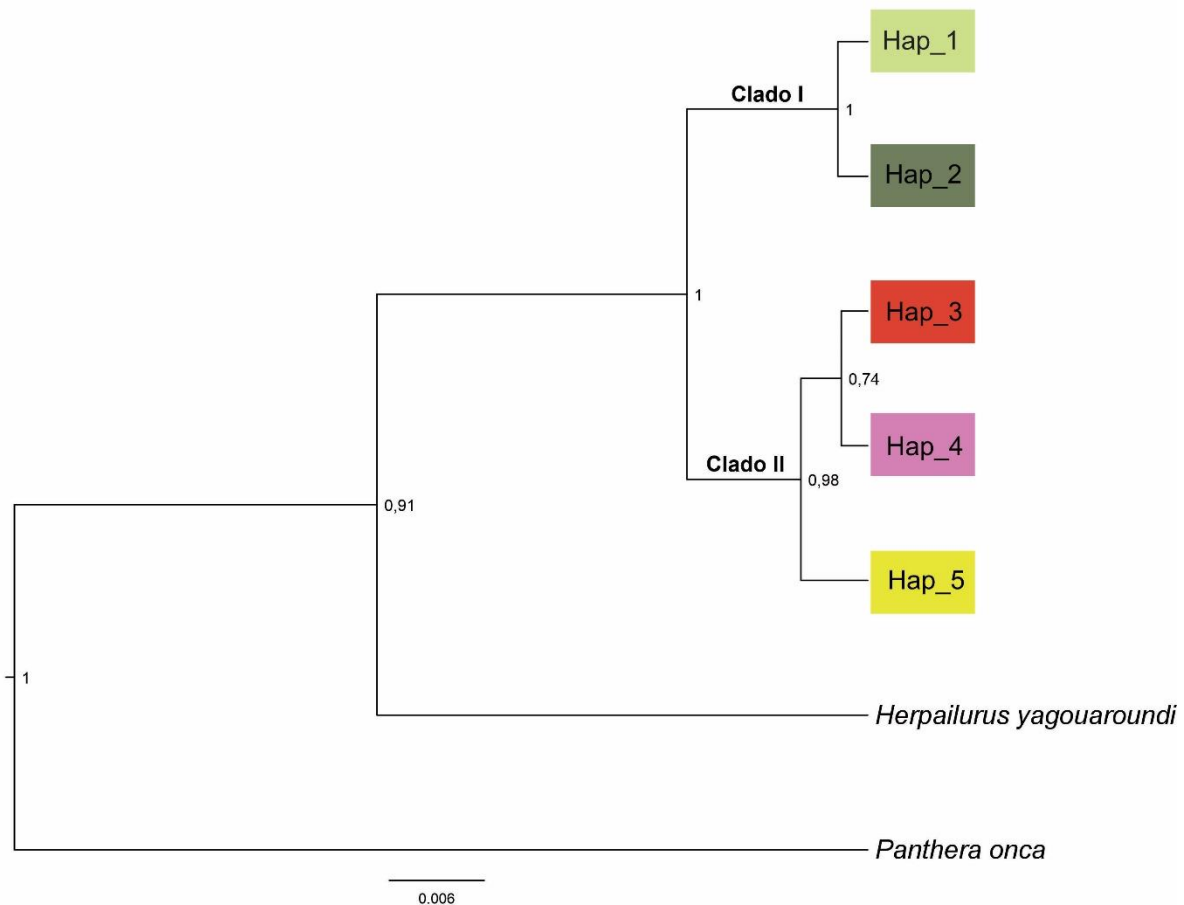


Figura 5. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de inferencia bayesiana a partir de los haplotipos obtenidos para el fragmento génico RC (353 pb) correspondientes a los individuos muestreados en las provincias del centro-sur de Argentina: Buenos Aires, sur de Santa Fe, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz, y los *outgroups* *Herpailurus yagouaroundi* y *Panthera onca*. Los números en los nodos indican la probabilidad posterior (se muestran solo valores > 0,5). Se identifican los dos clados obtenidos (Clado I y Clado II). Los nombres y diferentes colores de los nodos terminales designan a cada uno de los 5 haplotipos encontrados.

5.3. Relaciones haplotípicas

En las relaciones haplotípicas obtenidas para el set completo de haplotipos se distinguen dos grandes grupos (correspondientes a los clados recuperados por la filogenia bayesiana) separados por 5 pasos mutacionales, uno conformado por los haplotipos 1 y 2 (Hap_1 y Hap_2), y el otro conformado por los haplotipos 3, 4 y 5 (Hap_3, Hap_4 y Hap_5) (Figura 6).

Los haplotipos 1 y 2 representan principalmente a los haplotipos encontrados al sur de Argentina, en las provincias de Santa Cruz, Chubut, Río Negro, Neuquén, parte de La Pampa y sur de Buenos Aires.

Los haplotipos 3, 4 y 5 representan mayormente a los haplotipos observados en el centro de Argentina, en las provincias de Buenos Aires, sur de Santa Fe, parte de La Pampa y norte de Río Negro.

El haplotipo 1 se diferencia del haplotipo 2 en una única mutación puntual, al igual que el haplotipo 3 con el 4. El haplotipo 3 con el 5 se diferencian en dos pasos mutacionales y el haplotipo 4 con el 5 en tres pasos mutacionales. Además, se puede observar en estas conexiones con el haplotipo 5 que hay un haplotipo no encontrado o intermediario representado por un círculo negro.

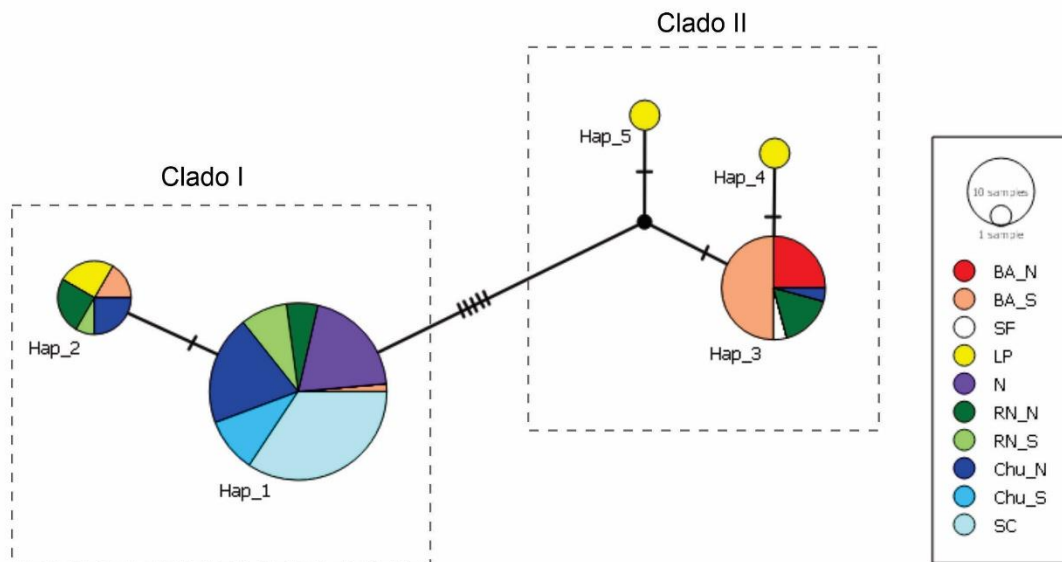


Figura 6. Relaciones haplotípicas obtenidas para las secuencias del fragmento génico RC (353 pb) de los individuos de las provincias del centro-sur de Argentina: Buenos Aires (BA_N y BA_S), sur de Santa Fe (SF), La Pampa (LP), Neuquén (N), Río Negro (RN_N y RN_S), Chubut (Chu_N y Chu_S) y Santa Cruz (SC). Se observan 5 haplotipos (Hap_1-5). 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. Se identifican los clados (I y II) obtenidos en la filogenia bayesiana.

5.4. Distribución geográfica de los haplotipos

La totalidad de las muestras analizadas en este trabajo corresponden a cinco haplotipos (Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4 y Hap_5), de los cuales ninguno ha sido reportado para el centro y sur de la Argentina hasta el momento (Figura 7).

Para las provincias de Neuquén y Santa Cruz se encontró un único haplotipo (Hap_1), registrado como el de mayor frecuencia para la Región patagónica. En la provincia de Chubut encontramos este mismo haplotipo junto con el haplotipo 2, ubicado más al norte de dicha provincia, y el haplotipo 3, presente solo en un individuo muestreado dentro de la provincia. En Río Negro se encontró mayoritariamente el haplotipo 1 y en menor frecuencia el haplotipo 2 y 3. En Buenos Aires se encontraron tres haplotipos, Hap_1, Hap_2 y Hap_3, siendo el Hap_3 el de mayor frecuencia. La única muestra proveniente de Santa Fe, presentó el haplotipo 3. En la provincia de La Pampa, pese al bajo número de individuos muestreados (7), se encontraron tres haplotipos, el haplotipo 2 y los haplotipos 4 y 5. Estos últimos dos no fueron registrados en las demás provincias muestreadas.

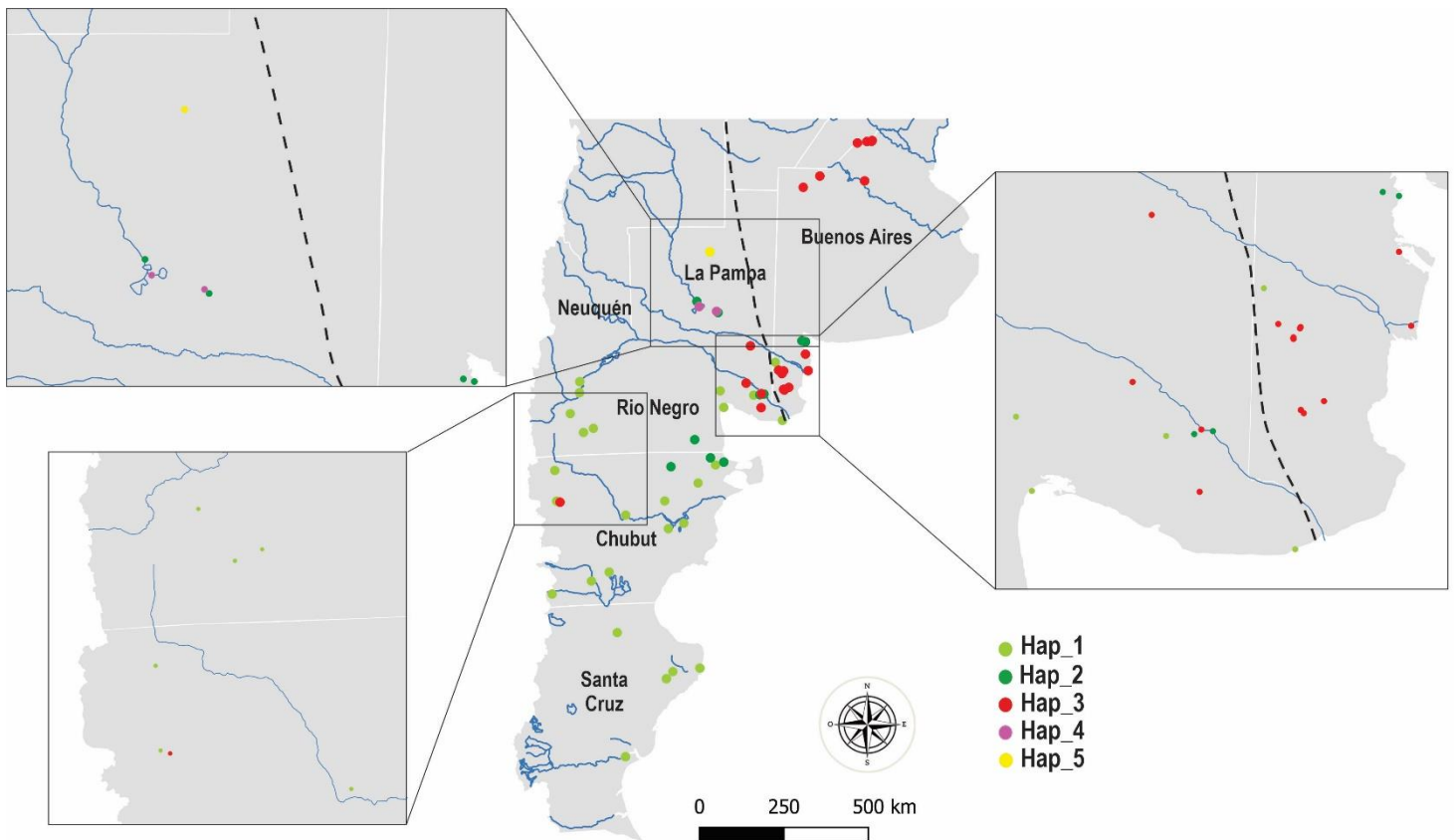


Figura 7. Distribución geográfica de los haplotipos para las secuencias del fragmento RC (353 pb) de los individuos muestreados en las provincias de Buenos Aires, sur de Santa Fe, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz. Los haplotipos se identifican con los mismos colores que en la Figura 5: haplotipo 1 (Hap_1) en verde claro, el haplotipo 2 (Hap_2) en verde oscuro, el haplotipo 3 (Hap_3) en rojo, el haplotipo 4 (Hap_4) en rosa y el haplotipo 5 (Hap_5) en amarillo. La línea discontinua color negro indica la separación de las subespecies *Puma concolor puma* (lado oeste) y *Puma concolor cabreræ* (lado este).

5.5. Análisis Bayesiano de Estructura Poblacional

Para el set completo de secuencias se realizó un primer análisis de agrupación *Clustering with linked loci* a partir de nueve grupos poblacionales definidos *a priori* de acuerdo a su ubicación geográfica (norte de Buenos Aires - incluida la única muestra de Santa Fe-, sur de Buenos Aires, La Pampa, Neuquén, norte de Río Negro, sur de Río Negro, norte de Chubut, sur de Chubut y Santa Cruz), el cual nos permitió identificar cuatro agrupamientos o *clusters* con el mayor valor de probabilidad (0,68).

Luego, refinando el análisis con ‘*Admixture based on mixture clustering*’, se obtuvieron tres agrupamientos o *clusters* (Figura 8 y Tabla 3) descartándose uno de los cuatro grupos anteriormente determinados por presentar una menor cantidad de secuencias (2) de las definidas como número mínimo (5). Estas dos secuencias corresponden al haplotipo 5 registrado en la provincia de La Pampa.

En la figura 8 se observa la distribución de los tres *clusters* genéticos en los nueve grupos geográficos predefinidos. Al *cluster* 1 (identificado en color verde claro) corresponden las secuencias pertenecientes al haplotipo 1, al *cluster* 2 (rojo) las pertenecientes a los haplotipos 3 y 4, y al *cluster* 3 (verde oscuro) las del haplotipo 2. Además, se muestran los dos individuos no asignados a ningún *cluster* en color amarillo. Esta agrupación realizada por el programa BAPS permite dar apoyo al Clado II obtenido en la filogenia bayesiana, agrupando en un mismo *cluster* genético (*cluster* 2) a las secuencias pertenecientes a los haplotipos 3 y 4. En relación al Clado I, este análisis no es informativo, indicando a los haplotipos 1 y 2 como dos *clusters* distintos (*clusters* 1 y 3, respectivamente) (Figura 9).

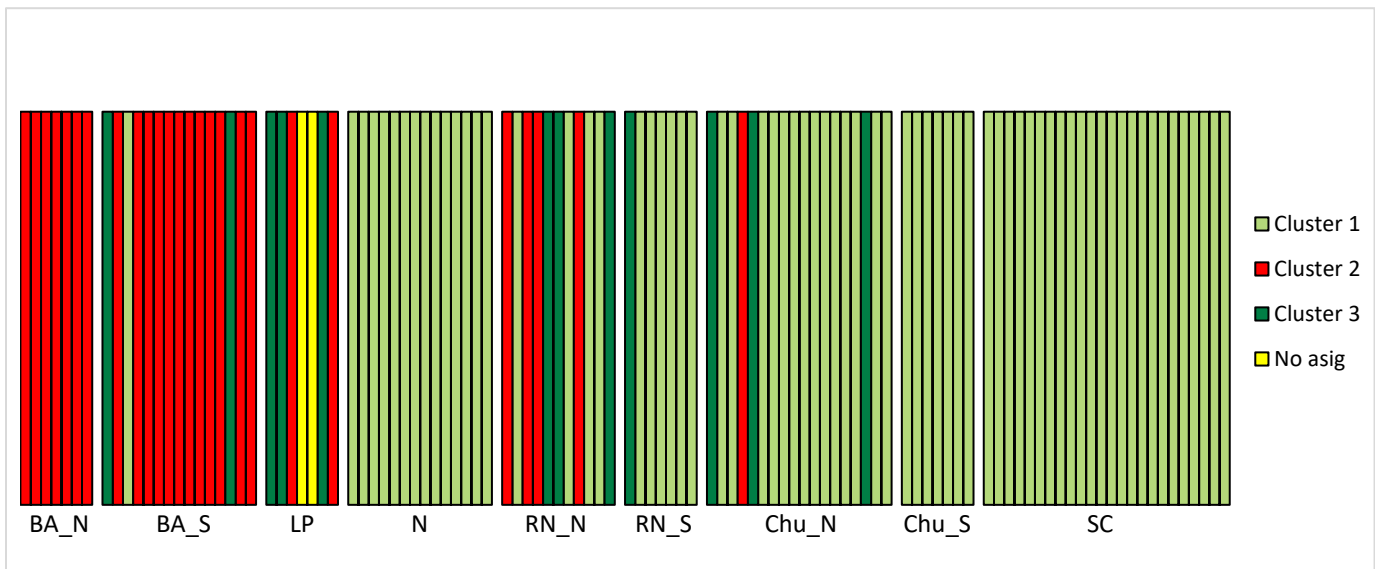


Figura 8. *Clusters* obtenidos mediante el análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS) para el fragmento génico RC (353 pb) de *P. concolor* correspondientes a los individuos muestreados en las provincias del centro-sur de Argentina (n=110). Las barras verticales representan cada una de las muestras. En el lado derecho del gráfico se muestran los colores asignados a cada *cluster* y de

los individuos no asignados a ningún *cluster*, y en la parte inferior del gráfico se muestran las ubicaciones geográficas predefinidas para el agrupamiento de los datos. El ID de dichos (9) grupos son: BA_N: Norte de Buenos Aires (incluida la única muestra de Santa Fe); BA_S: Sur de Buenos Aires; LP: La Pampa; N: Neuquén; RN_N: Norte de Río Negro; RN_S: Sur de Río Negro; Chu_N: Norte de Chubut; Chu_S: Sur de Chubut; SC: Santa Cruz.

Tabla 3. Clados y *clusters* a los que pertenecen los haplotipos (por región geográfica) obtenidos a partir del fragmento génico mitocondrial RC de *P. concolor*. Se indica el número de muestras en cada caso (n).

Haplotipo/ región	n	Clado	Cluster
<i>Hap1_N</i>	14	I	1
<i>Hap1_RN_N</i>	4	I	1
<i>Hap1_RN_S</i>	6	I	1
<i>Hap1_Chua_N</i>	14	I	1
<i>Hap1_Chua_S</i>	7	I	1
<i>Hap1_SC</i>	24	I	1
<i>Hap1_BA_S</i>	1	I	1
<i>Hap2_BA_S</i>	2	I	3
<i>Hap2_LP</i>	3	I	3
<i>Hap2_RN_N</i>	3	I	3
<i>Hap2_Chua_N</i>	3	I	3
<i>Hap2_RN_S</i>	1	I	3
<i>Hap3_BA_N</i>	6	II	2
<i>Hap3_SF</i>	1	II	2
<i>Hap3_BA_S</i>	12	II	2
<i>Hap3_RN_N</i>	4	II	2
<i>Hap3_Chua_N</i>	1	II	2
<i>Hap4_LP</i>	2	II	2
<i>Hap5_LP</i>	2	II	-

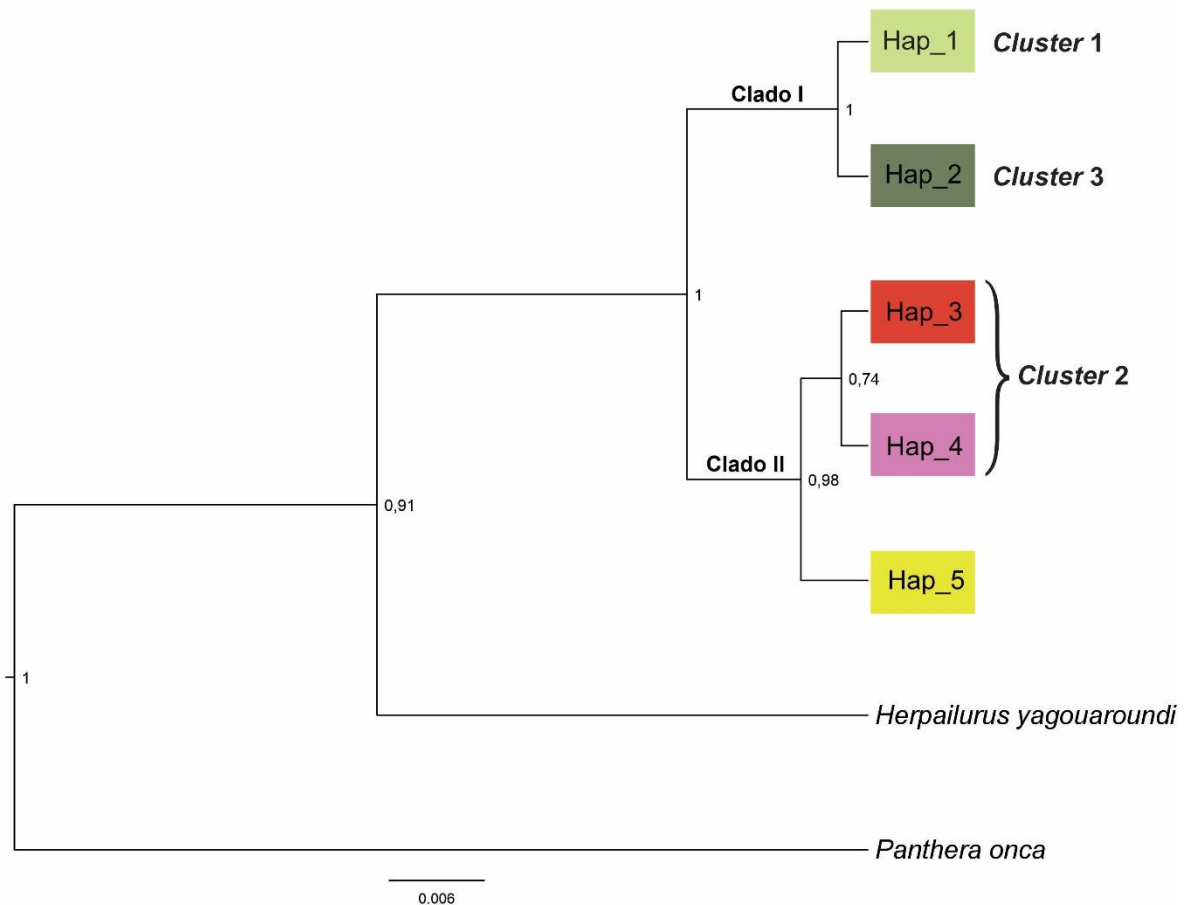


Figura 9. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de inferencia bayesiana a partir de los haplotipos obtenidos para el fragmento génico RC (353 pb) correspondientes a los individuos muestreados en las provincias del centro-sur de Argentina: Buenos Aires, sur de Santa Fe, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz, y los *outgroups* *Herpailurus yagouaroundi* y *Panthera onca*. Se identifican los clados (I y II), así como *clusters* genéticos (1-3) obtenidos a partir del programa BAPS.

6. DISCUSIÓN

El conjunto de datos de secuencias de RC analizado en este estudio permitió una comprensión más profunda con respecto a la diversidad genética de los pumas del centro y sur de Argentina, mediante la utilización de un set de muestras con mayor cobertura geográfica y de un marcador molecular que hasta el momento no había sido utilizado. Fueron ampliados los estudios realizados por Mac Allister (2019) acerca de la variabilidad genética en distintas poblaciones de

puma de la Patagonia argentina utilizando el marcador molecular mitocondrial ND5. En el presente trabajo se detectaron evidencias consistentes de agrupaciones de *P. concolor* del centro y sur de Argentina, identificando la presencia de tres *clusters* genéticos (Figura 8).

A pesar de que el fragmento de RC analizado (353 pb) fue menor que el estudiado por Mac Allister (2019) para ND5 (623 pb), se obtuvieron valores mayores para los índices de diversidad genética (Tabla 2), tal como era esperado de acuerdo a su mayor tasa de mutación (Aquadro y Greenberg, 1983; Brown *et al.*, 1993; López *et al.*, 1997). Esto permitió visualizar de manera más robusta los patrones de distribución de la variabilidad genética de la especie en la región geográfica estudiada.

De los cinco haplotipos encontrados, el Hap_1 fue el de mayor frecuencia para la Región de la Patagonia (Figura 7), al igual que el haplotipo ND_1 descrito por Mac Allister (2019) y el haplotipo H18 por Matte y colaboradores (2013), ambos identificados con ND5 para dicha región geográfica. En el sur de Buenos Aires y este de Río Negro se observaron 3 haplotipos, Hap_1, Hap_2 y Hap_3. El haplotipo Hap_3 se extiende hacia el norte, ya que se encontró además en el norte de la provincia de Buenos Aires, y el haplotipo Hap_2 se extiende hacia el sur encontrándose además en el norte de Chubut (Figura 7). Estudios realizados por Gallo y colaboradores (2020) indican que existe una dinámica fuente-sumidero entre diferentes provincias, producida por el hecho de que la remoción de individuos residentes mediante la caza proporciona un territorio disponible que puede ser ocupado por individuos juveniles de otras regiones. Esto podría demostrar que la presencia de individuos con haplotipo Hap_2 en el noreste de Chubut y los haplotipos Hap_2 y Hap_3 en el este de Río Negro, es causada por una inmigración de pumas desde la provincia de Buenos Aires, donde la caza no está legalizada (Gallo *et al.*, 2020). Por su parte, en la provincia de Chubut se observan los haplotipos Hap_1, Hap_2 y Hap_3, este último representado por un único individuo al oeste de la provincia, el cual no sigue la distribución esperada para dicho haplotipo, lo que podría deberse al bajo número de muestras (n = 8)

disponible para el noroeste de Chubut. Otra explicación sería el tráfico de pumas capturados en otros lugares y translocados a Chubut ya que, en esta provincia, al igual que en Río Negro y Santa Cruz, se permite su caza recompensando a los ganaderos/cazadores de acuerdo a un plan basado en la entrega de las pieles y/o cráneos de los individuos cazados.

En las provincias de Neuquén y Santa Cruz se encontró sólo el haplotipo 1 (Figura 7), siendo las provincias para las que se observa menor variabilidad genética. Esto se podría deber al bajo esfuerzo de muestreo en la primera provincia y en el caso de la segunda se podría explicar a través de la disminución de la variabilidad genética esperada en los extremos de la distribución de las especies (Hardie y Hutchings, 2010).

En la provincia de La Pampa, pese al bajo número de individuos muestreados ($n=7$), se encontraron tres haplotipos diferentes, los haplotipos Hap_2, Hap_4 y Hap_5 (Figura 7). Estos últimos dos no fueron registrados en las demás provincias muestreadas, lo que se podría deber al tráfico ilegal de pumas o simplemente al faltante de muestreo hacia el norte del país. En esta provincia, las poblaciones de puma sufrieron una gran presión de caza deportiva, y por más de diez años (aproximadamente hasta el 2007) se extrajeron individuos de las poblaciones sin control legal. A partir de ese año, la caza deportiva de puma fue prohibida a nivel provincial (Disposición N° 17/07 provincia de La Pampa) y nacional (Resolución N° 1.624/08 de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación) por falta de controles sobre los cotos de caza y por no contar con planes de manejo sobre las poblaciones de puma. En febrero de 2008 el gobierno de La Pampa autorizó nuevamente la caza de la especie en los cotos de la provincia, pero estableciendo que los pumas que se pueden cazar deben salir de “criaderos”. Teniendo en cuenta que en esa provincia existe un número reducido de esos establecimientos con respecto al gran número de cotos (por ejemplo, Chebez y Nigro informaron seis criaderos y alrededor de 125 cotos en 2010), se puede considerar que se recurre igualmente a la captura “en negro” de pumas por puesteros y cazadores improvisados que los venden por sumas

variables para abastecer a la gran cantidad de cotos (de caza mayor y menor) en la provincia. De esta manera, se realiza un tráfico ilegal de pumas tanto intraprovincial como interprovincial para la denominada caza garantizada (Chebez y Nigro, 2010; De Lucca, 2015; Zanón-Martínez *et al.*, 2017).

Para poner a prueba la hipótesis del tráfico ilegal de pumas o que, alternativamente, los haplotipos Hap_4 y Hap_5 provengan de poblaciones del norte de Argentina, es necesario un mayor esfuerzo de muestreo tanto en la región de estudio, como en el norte del país, y la utilización de marcadores genéticos adicionales, de mayor resolución (ej. SNPs).

En el caso de Buenos Aires, en trabajos previos (ej. Chimento y De Lucca, 2014) se informa de un aumento en el registro de pumas en el norte de la provincia, donde su población desde mediados del siglo pasado se consideraba extinta o severamente reducida (Cabrera, 1961; Currier, 1983; Canevari y Fernández Balboa, 2003; Caso *et al.*, 2008). En concordancia con esto, en el presente trabajo se obtuvieron muestras provenientes del norte de Buenos Aires, lo que podría deberse a una recolonización de la zona por parte de la especie debido a su gran resiliencia, siendo capaz de subsistir en ambientes modificados por el hombre (Nowell y Jackson, 1996; Beck *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2009). Esta reocupación 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, utilizando como medio de dispersión distintos cursos de agua (ríos, arroyos). Esta población serrana se habría “refundado” a partir de pumas procedentes de la provincia de La Pampa (Dickson y Beier, 2007; LaRue y Nielsen, 2008; De Lucca, 2010; Thompons y Jenks, 2010). Otra posibilidad es que provengan de poblaciones de provincias del norte del país, para esto, como ya se ha mencionado, es necesario intensificar el muestreo y utilizar marcadores con mayor poder de resolución que permitan poner a prueba estas hipótesis, lo que facilitará la identificación de las problemáticas de conservación y de manejo a enfrentar.

En el área de estudio del presente trabajo, que comprende a las provincias del centro-sur de Argentina, se determinaron tres *clusters* o agrupamientos genéticos (Figura 8 y Figura 9), en comparación de los cuatro definidos por Gallo (2020) en 19 provincias de Argentina utilizando 25 *loci* microsatélites. A pesar de que estos últimos marcadores moleculares son mucho más variables que los históricos mitocondriales, el número de *clusters* obtenido fue similar. En el presente estudio el *cluster* 1 (Hap_1) está representado por individuos de Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz, y concuerda mayormente con los *clusters* 3 y 4 de Gallo (2020); el *cluster* 2 (Hap_3 y Hap_4) y el *cluster* 3 (Hap_2) formados por individuos de Buenos Aires, La Pampa, Río Negro y Chubut, coinciden mayormente con el *cluster* 1 de Gallo (2020).

La distribución geográfica que presentan los clados (Clado I y II) coincide con el patrón de distribución de las subespecies *P. concolor puma* y *P. concolor cabreræ* identificadas por Culver *et al.* (2000). Aunque, en su estudio, Culver *et al.* (2000) plantean la hipótesis de la división de subespecies por una restricción de la dispersión y del flujo génico hacia el sur debida a la presencia del Río Negro, lo que es observado parcialmente en el presente trabajo ya que individuos de ambos lados del río presentan el mismo haplotipo y fueron asignados al mismo *cluster* genético, en concordancia con los resultados de Gallo (2020).

En su conjunto los resultados obtenidos apoyan la hipótesis planteada: las poblaciones de pumas del centro-sur de Argentina presentan baja divergencia genética a nivel regional. A pesar de que se evaluó una gran extensión del territorio argentino, se encontró poca variabilidad genética en comparación con la reportada para otras especies de felinos con menores áreas de distribución. Tal es el caso de las poblaciones de gato montés (*Leopardus geoffroyi*) de la región Pampeana, para las que se observó una alta variabilidad genética a partir de un marcador molecular menos variable como es el gen mitocondrial ND5 (Pinardi, 2022).

El conocimiento generado en el presente trabajo, constituye una importante herramienta de base para el diseño de estrategias de conservación y manejo

eficientes, principalmente para aquellas poblaciones sometidas a algún tipo de amenaza a su conservación.

7. CONCLUSIONES

La utilización de un marcador molecular más variable como es la Región Control mitocondrial, permitió caracterizar mejor los patrones de distribución geográfica de la variabilidad genética en poblaciones de *Puma concolor* del centro y sur de Argentina.

Se observó una baja variabilidad genética a nivel regional, en consistencia con la hipótesis de trabajo planteada.

En la provincia de La Pampa se observaron haplotipos únicos, los cuales podrían ser evidencia de un movimiento ilegal de pumas y/o el efecto de una dinámica de fuente-sumidero poblacional que favorecería el ingreso de nuevos haplotipos.

Se identificaron dos grandes grupos (Clado I y Clado II) que coinciden parcialmente con los rangos geográficos reportados para las dos subespecies de puma (*P. concolor puma* y *P. concolor cabreræ*) en el extremo sur de su distribución.

Los resultados obtenidos y analizados en este trabajo son el principio para resolver problemáticas taxonómicas y de conservación de esta especie, para lo cual deberán incluirse nuevas poblaciones de puma de la Argentina y marcadores más variables que servirán para el diseño de estrategias de conservación y manejo eficientes.

8. BIBLIOGRAFÍA

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

Allen M. L., Elbroch L. M., Wilmers C. C., Wittmer H. U. 2015. The comparative effects of large carnivores on the acquisition of carrion by scavengers. *The American Naturalist*, 185(6): 822-833.

Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806): 457-465.

Anderson A. E., Bowden D. C., Kattner D. C. 1992. The puma on Uncompahgre plateau, Colorado (pp. 116). Colorado Division of Wildlife, Colorado, EEUU.

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., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C. A., Saunders N. C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 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. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

Banfield A. W. 1974. *The Mammals of Canada*. University Toronto Press, pp. 438.

Beck T., Beecham J., Beier P., Hofstra T., Hornocker M., Lindzey F., Logan K., Pierce B., Ross I., Shaw H., Sparrowe R., Torres S. 2005. *Cougar Management Guidelines Working Group*. Washington, pp. 137.

Beier P. 1995. Dispersal of juvenile cougars in fragmented habitat. *Journal of Wildlife Management*, 59: 228-237.

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.

Best L. B., Bergin T. M., Freemark K. E. 2001. Influence of landscape composition on bird use of rowcrop fields. *Journal of Wildlife Management*, 65(3): 442-449.

Bolgeri M. J. y Novaro A. J. 2015. Variación espacial en la depredación por puma (*Puma concolor*) sobre guanacos (*Lama guanicoe*) en la Payunia, Mendoza, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 22(2): 255-264.

Bonnot G., Muzzachiodi N., Perez C. F., Udrizar Sauthier W., Udrizar Sauthier D. 2011. Nuevos registros de *Puma concolor* para la provincia de Entre Ríos. *Natura Neotropicalis*, 42(1-2): 65-69.

Borón V. y Payán E. 2016. Percepción del jaguar en un paisaje dominado por humanos en el Magdalena Medio, Colombia (pp. 269-282). En: *Conflictos humanos-felinos América Latina* (489 pp.). Eds. Castaño-Urbe C., Lasso C. A., Hoogesteijn R., Díaz-Pulido A., Payán, E. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Colombia.

Branch L. C., Pessino M., Villareal D. 1996. Response of pumas to a population decline of the plains vizcacha. *Journal of Mammalogy*, 77: 1132-1140.

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*, 76(4): 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*). *Molecular Biology and Evolution*, 10: 326-341.

Cabrera A. y Yepes J. 1940. Mamíferos Sudamericanos vida, costumbres y descripción (pp. 370). *Historia Natural Ediar*, Compañía Argentina de Editores, Buenos Aires, Argentina.

Cabrera, A. 1961. Los felidos vivientes de la República Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, 6: 161-247.

Canevari, M. y Fernández Balboa, C. 2003. 100 Mamíferos argentinos. Editorial Albatros.

Caragiulo A., Dias-Freedman I., Clark J. A., Rabinowitz S., Amato G. 2013. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas (*Puma concolor*). *Mitochondrial DNA* 25: 304-312.

Carmarán A. 2013. Estudio exploratorio del *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) en el Parque Nacional Pre Delta y zona de influencia, Provincia de Entre Ríos, Argentina. *Biológica*, 16: 83-95.

Caruso N., Luengos Vidal E., Lucherini M., Guerisoli M., Martínez S., Casanave E. B. 2017. Carnívoros en el Sudoeste de la provincia de Buenos Aires: ecología y conflictos con los ganaderos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43: 165–175.

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.

Castilho C. S. 2010. Genética e conservação do leão-baio (*Puma concolor*) no sul do Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

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

Charruau P., Fernandes C., Orozco-Terwengel P., Peters J., Hunter L., Ziaie H., Jourabchian A., Jowkar H., Schaller G., Ostrowski S. Verccammen P., Grange T., Schlötterer C., Kotze A., Geigl E. M., Walzer C., Burger P. A. 2011. Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. *Molecular ecology*, 20(4): 706-724.

Chebez J. C. 2009. Otros que se van. Fauna argentina amenazada. Editorial Albatros, Buenos Aires, pp. 552.

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. pp. 21.

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)*, 4(2): 13-51.

Chimento N. R. y Dondas P. A. 2017. First Record of *Puma concolor* (Mammalia, Felidae) in the Early-Middle Pleistocene of South America. *Springer. Journal of Mammalian Evolution*, 25(3): 381-389.

Clavijo A. y Ramírez G. F. 2009. Taxonomía, distribución y estado de conservación de los felinos suramericanos: revisión monográfica. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural, 13(2): 43-60.

Corander J. y Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205(1): 19-31.

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.

Crooks K. R., Burdett C. L., Theobald D. M., Rondinini C., Boitani L. 2011. Global patterns of fragmentation and connectivity of mammalian carnivore habitat. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1578): 2642-2651.

Culver M., Johnson W. E., Pecon-Slattery J., O'Brien S. J. 2000. Genomic ancestry of the American Puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity*, 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*, pp. 200.

De Angelo C., Paviolo A., Di Bitetti M. 2011. Differential impact of landscape transformation on pumas (*Puma concolor*) and jaguars (*Panthera onca*) in the Upper Paraná Atlantic Forest. *Diversity and Distributions*, 17(3): 422-436.

De Angelo C., Llanos R., Guerisoli, M. M., Varela, D., Valenzuela A. E. J., Pía M. V., Monteverde M., Reppucci J. I., Lucherini M., D'Agostino R., Bolgeri M. J., Quiroga V. A. 2019. *Puma concolor*. 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>.

De Azevedo F. C. C. y Murray D. L. 2007. Evaluation of potential factors predisposing livestock to predation by jaguars. *Journal of Wildlife Management*, 71(7): 2379-2386.

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

De Lucca E. R. 2011. Presencia del puma (*Puma concolor*) y su conflicto con el hombre en el partido de Patagones, Buenos Aires, Argentina. *Nótulas Faunísticas*, segunda serie, 67: 1-13.

De Lucca E. R. 2015. Puma guerrero de la naturaleza. *Revista Biomas* 4, pp. 9.

Di Blanco Y. E., Cirignoli S., Cano P. D., Ball H. A., Solís G., Di Bitetti M. S., Heinonen S. 2008. Nuevos registros de puma (*Puma concolor*) en la Provincia de Corrientes: recolonización, expansión o vacío de información? Trabajo presentado en XII Jornadas Argentinas de Mastozoología, Villa Giardino (Cba), Argentina.

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. *The Journal of Zoology*, 280: 33-40.

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

Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8): 1969-1973.

Eizirik E., Bonatto S. L., Johnson W. E., Crawshaw P. G., Jr, Vié J. C., Brousset D. M., O'Brien S. J., Salzano F. M. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, felidae). *Journal of molecular evolution*, 47(5): 613-624.

Eizirik E., Kim J. H., Menotti-Raymond M., Crawshaw P. G. Jr., O'Brien S. J., Johnson W. E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular ecology*, 10(1): 65-79.

Eizirik E. 2012. A molecular view on the evolutionary history and biogeography of Neotropical carnivores (Mammalia, Carnivora). In: Patterson BD and Costa LP (eds) *Bones, Clones, and Biomes: An Extended History of Recent Neotropical Mammals*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 123-142.

Elbroch L. M., Quigley H. B., Caragiulo A. 2015. Spatial associations in a solitary predator: using genetic tools and GPS technology to assess cougar social organization in the Southern Yellowstone Ecosystem. *Acta Ethologica*, 18(2): 127-136.

Elbroch L. M., Levy M., Lubell M., Quigley H., Caragiulo A. 2017. Adaptive social strategies in a solitary carnivore. *Science Advances*, 3(10): e1701218.

Emmons L. H. 1987. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20: 271-283.

Estes J. A. 1996. Carnivores and ecosystem management. *Wildlife Society Bulletin*, 24: 390-396.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1): 487-515.

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: 331–338.

Fontana C. S., Bencke G. A., Reis R. E. 2003. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 523-525.

Ford A. T., Goheen J. R., Otieno T. O., Bidner L., Isbell L. A., Palmer T. M., Ward D., Woodroffe R. y Pringle R. M. 2014. Large carnivores make savanna tree communities less thorny. *Science*, 346(6207): 346-349.

Forster P. 2004. Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359: 255-264.

Gallo O. 2020. Ecología y genética de paisaje del puma (*Puma concolor*) en Argentina: análisis de estructura genética y conectividad. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Gallo O., Castillo D. F., Godinho R., Casanave E. B. 2020. Genetic diversity, population structure, and immigration, in a partially hunted puma population of south-central Argentina. *Journal of Mammalogy*, 101(3): 766-778.

Gallo O., Castillo D. F., Godinho R., Mac Allister M. E., Fernández G. P., Failla M., Casanave E. B. 2021. Molecular data revealed a structured puma (*Puma concolor*) population in northern Patagonia, Argentina. *Mammalian Biology*, 101: 653-663.

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

Gibbs J. P. 2001. Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. *Biological Conservation*, 100(1): 15-20.

Gonyea W. y Ashworth R. 1975. The form and function of retractile claws in the Felidae and other representative carnivores. *Journal of Morphology*, 145(2): 229-238.

Gonyea W. J. 1976. Behavioral implications of saber-toothed felid morphology. *Paleobiology*, 2(4): 332-342.

González E. M., Martínez-Lanfranco J. A., Juri E., Rodales A. L., Botto G., Soutullo A. 2013. Mamíferos, pp. 175-207, en: Soutullo A., Clavijo C., Martínez-Lanfranco J. A. (eds.). *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo, pp. 222.

Grigione M. M., Beier P., Hopkins R. A., Neal D., Padley W. D., Schonewald C. M., Johnson M. L. 2002. Ecological and allometric determinants of home-range size for mountain lions (*Puma concolor*). *Animal Conservation*, 5(4): 317-324.

Guerisoli M., Luengos Vidal E., Franchini M., Caruso N., Casanave E. B., Lucherini M. 2017. Characterization of puma-livestock conflicts in rangelands of central Argentina. *Royal Society Open Science* 4: 170852.

Guerisoli M. M. 2018. *Ecología del puma (Puma concolor) en el Espinal: un acercamiento enfocado en el efecto de los factores antrópicos*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

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

Hardie D. C. y Hutchings J. A. 2010. Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environmental Reviews* 18: 1-20.

Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.

Hayward M. W., Henschel P., O'Brien J., Hofmeyr M., Balme G., Kerley G. I. H. 2006. Prey preferences of the leopard (*Panthera pardus*). *Journal of Zoology*, 270(2): 298-313.

Head M. J. 2021. Review of the Early-Middle Pleistocene boundary and Marine Isotope Stage 19. *Progress in earth and planetary science*, 8(1): 50.

Hickerson M. J., Carstens B. C., Cavender-Bares J., Crandall K. A., Graham C. H., Johnson J. B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 291-301.

Holland M. M. y Parsons T. J. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review*, 11: 22-50.

Inskip C. y Zimmermann A. 2009. Human-felid conflict: a review of patterns and priorities worldwide. *Oryx*, 43(01): 18-34.

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

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

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., Modi W. S., Stephens J. C., O'Brien S. J. 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae. *Molecular Biology and Evolution*, 12(4): 690-707.

Jetz W., Carbone C., Fulford J., Brown J. H. 2004. The scaling of animal space use. *Science*, 306(5694): 266-268.

Johnson W. E. y O'Brien S. J. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution*, 44(1): S89-S116.

Johnson W. E., Godoy J. A., Palomares F., Delibes M., Fernandes M., Revilla E., O'Brien S. J. 2004. Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *The Journal of heredity*, 95(1): 19-28.

Kabir M., Ghoddousi A., Awan M. S., Awan M. N. 2014. Assessment of human-leopard conflict in Machiara National Park, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *European Journal of Wildlife Research*, 60(2): 291-296.

Kissling D. W., Fernández N., Paruelo J. M. 2009. Spatial risk assessment of livestock exposure to pumas in Patagonia, Argentina. *Ecography*, 32(5): 807-817.

Kolowski J. M. y Holekamp K. E. 2006. Spatial, temporal, and physical characteristics of livestock depredations by large carnivores along a Kenyan reserve border. *Biological Conservation*, 128(4): 529-541.

Kurtén B. 1973. Geographic Variation in Size in the Puma (*Felis concolor*). *Societas Scientiarum Fennica, Commentationes Biologicae*, 63: 1-8.

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.

Laundré J. W. y Loxterman J. 2007. Impact of edge habitat on summer home range size in female pumas. *The American Midland Naturalist*, 157(1): 221-229.

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.

LaRue M. A. y Nielsen C. K. 2011. Modelling potential habitat for cougars in midwestern North America. *Ecological Modelling*, 222: 897-900.

LaRue M. L., Nielsen C. K., Dowling M., Miller K., Wilson B., Shaw H., Anderson C.R. Jr. 2012. Cougars are recolonizing the Midwest: Analysis of cougar confirmations during 1990-2008. *Journal of Wildlife Management*, 76: 1364-1369.

Leigh J. W. y Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110-1116.

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*, 58(4): 619-624.

Llanos R. 2017. Identificación y cuantificación de conflictos entre la fauna silvestre y la actividad productiva en Patagonia: el puma (*Puma concolor*) y la ganadería ovina en la provincia del Chubut. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Llanos R. P., Andrade A., Travaini, A. 2020. Puma and livestock in central Patagonia (Argentina): from ranchers' perceptions to predator management. *Human Dimensions of Wildlife*, 25: 1-16.

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

Logan K. A. y Sweanor L. L. 2010. Behavior and social organization of a solitary carnivore. In *Cougar: ecology and conservation*, edited by Maurice Hornocker and Sharon Negri. University of Chicago Press, Chicago: 105-117.

Lopez J., Cevario S., O'Brien S. J. 1996. Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (*Numt*) in the nuclear genome. *Genomics*, 33: 229-46.

López 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. *Molecular biology and evolution*, 14(3): 277-286.

López-González C. A. y González Romero, A. 1998. A synthesis of current literature and knowledge about the ecology of the puma (*Puma concolor linnaeus*). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 75: 171-190.

Luengos Vidal E., Guerisoli M., Caruso N., Casanave E., Lucherini M. 2016. Conflictos con el puma en el sur del Espinal argentino (pp. 363-375). En: *Conflictos humanos-felinos América Latina* (pp. 490). Eds. Castaño-Urbe C., Lasso C. A., Hoogesteijn R., Díaz-Pulido A., Payán E. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexy von Humboldt, Colombia.

Mac Allister M. E. 2019. Caracterización genética del puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) en la Patagonia, a través de marcadores moleculares mitocondriales (ND5 y región control). Trabajo final de grado, Licenciatura en Genética, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA).

Mac Allister M. E., Figueroa C. E., Acosta D. B., Merino M. L., Tunez J. I., Travaini A., Fernández G. P. 2021. Phylogeography of *Puma concolor* in Argentine Patagonia: tools for its management and conservation. 100th Annual Meeting of the American Society of Mammalogists.

Machado A. B. M., Fonseca G. A. B., Machado R. B., Aguiar L. M. S., Lins L. V. (eds.). 1998. Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna

de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Minas Gerais, pp. 129-132.

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

Matte E. M. 2012. Filogeografía de *Puma concolor* (Carnivora, Felidae) na américa do sul. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

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). *Genetics and Molecular Biology*, 36(4): 586-97.

Mazzolli M., Graipel M. E., Dunstone N. 2002. Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biological Conservation*, 105(1): 43-51.

McClinton P. L., McClinton S. M., Guzman G. J. 2000. Utilization of fish as a food item by a mountain lion (*Puma concolor*) in the Chihuahuan Desert. *Texas Journal of Science*, 52(3): 261-263.

Michalski F., Boulhosa R. L. P., Faria A., Peres C. A. 2006. Human-wildlife conflicts in a fragmented Amazonian forest landscape: determinants of large felid depredation on livestock. *Animal Conservation*, 9(2): 179-188.

Miller B., Dugelby B., Foreman D., del Rio C. M., Noss R., Phillips M., Reading R., Soule M. E., Terborgh J., Willcox L. 2001. The importance of large carnivores to healthy ecosystems. *Endangered Species Update*, 18(5): 202-210.

Monroy-Vilchis O., Rodríguez-Soto C., Zarco-González M., Urios V. 2009. Cougar and jaguar habitat use and activity patterns in central Mexico. *Animal Biology*, 59(2): 145-157.

Moore W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49(4): 718-726.

Muñoz-Pedreros A. y Yáñez Valenzuela J. (Eds.). 2009. Mamíferos de Chile, pp. 565. CEA ediciones, Valdivia, Chile.

Murphy T. y Macdonald D. W. 2010. Pumas and people: lessons in the landscape of tolerance from a widely distributed felid (pp. 431-451). En: *The biology and conservation of wild felids* (pp. 784). Eds. Macdonald, D., y Loveridge, A. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.

Murphy K. y Ruth T. K. 2010. Diet and prey selection of a perfect predator, pp. 118-137. En: *Cougar: ecology and conservation*, pp. 305. Eds. Hornocker M. y Negri S. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, EEUU.

Muzzachiodi N. 2012. Nuevo registro de puma (*Puma concolor*) en la provincia de Entre Ríos, Argentina. *Nótulas Faunísticas*, segunda serie, 100: 1-4.

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.

Noss R. F., Quigley H. B., Hornocker M. G., Merrill T., Paquet P. C. 1996. Conservation biology and carnivore conservation in the Rocky Mountains. *Conservation Biology*, 10: 949-963.

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., Funes M. C., Jiménez J. E. 2004. Patagonia foxes. Selection of introduced prey and conservation of culpeo and chilla foxes in Patagonia. En: Macdonald D. W., Sillero-Zubiri C. (Eds.). *The Biology and Conservation of Wild Canids*. University Press Oxford. Oxford, RU. pp. 243-254.

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 J. C., Redford K. H., Steneck R. S., Berger J. (Eds.) Large Carnivores and the Conservation of Biodiversity. Island Press. Washington, DC, EEUU. pp. 268-288.

Nowak R. M. 1999. Walker's Mammals of the World. Vol. 2. 6th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 818-820.

Nowell K. y Jackson P. 1996. Status survey and conservation action plan: Wild Cats. IUCN/World Conservation Union, Gland, Switzerland, pp. 382.

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

Ochoa A., Onorato D. P., Fitak R. R., Roelke-Parker M. E., Culver M. 2017. Evolutionary and functional mitogenomics of the Florida panther. *Journal of Heredity*, 108: 449-455.

Ochoa A., Onorato D. P., Fitak R. R., Roelke-Parker M. E., Culver M. 2019. *De novo* assembly and annotation from parental and F₁ puma genomes of the Florida panther genetic restoration program. *G3 (Bethesda)*, 9(11): 3531-3536.

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. *Ecología en Bolivia*, 39: 75-83.

Parera A. 2000. Los mamíferos de la Argentina y la región austral de Sudamérica (pp. 452). El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.

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

Paviolo A., Cruz P., Iezzi M. E., Martínez Pardo J., Varela D., Angelo C., Benito S., Vanderhoeven E., Palacio L., Quiroga V., Arrabal J., Costa S., Di Bitetti

M. 2018. Barriers, corridors or suitable habitat? Effect of monoculture tree plantations on the habitat use and prey availability for jaguars and pumas in the Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management*. 430: 576-586.

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

Perovic P. 2002. Ecología de la comunidad de félidos en las selvas nubladas del Noroeste Argentino. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, pp. 146.

Perovic P. G. y 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, pp. 359.

Peters F. B., Mazim F. D., Favarini M. O., Soares S. B. G., de Oliveira T. G. 2016. Caça preventiva ou retaliativa de felinos por humanos no extremo sul do Brasil (pp. 311-326). En: Conflictos humanos-felinos América Latina (pp. 489). Eds. Castaño-Urbe C., Lasso C. A., Hoogesteijn R., Díaz-Pulido A., Payán E. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Colombia.

Pia M. 2013. Evaluación del conflicto entre los carnívoros tope y productores ganaderos colindantes al Parque Nacional Quebrada del Condorito, Sierras Grandes de Córdoba, Argentina. *Nótulas Faunísticas*, 117: 1-10.

Pierce B. M., Bleich V. C., Wehausen J. D., Bowyer R. T. 1999. Migratory patterns of mountain lions: implications for social regulation and conservation. *Journal of Mammalogy*, 80: 986-992.

Pierce B. M., Bleich V. C., Bowyer R. T. 2000. Social organization of mountain lions: does a land-tenure system regulate population size? *Ecology*, 81(6): 1533-1543.

Pinardi E. 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, Licenciatura en Genética, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA).

Polisar J., Maxit I., Scognamillo D., Farrell L., M. Sunquist E., Eisenberg J. F. 2003. Jaguars, pumas, their prey base, and cattle ranching: ecological interpretations of a management problem. *Biological Conservation*, 109: 297-310.

QGIS Development Team. 2020. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>

Quigley H. B. y Crawshaw P. G. Jr. 1992. The conservation plans for the jaguar *Panthera onca* in the Pantanal region of Brazil. *Biological Conservation* 61: 149-157.

Quiroga V. A., Noss A. J., Paviolo A., Boaglio G. I., Di Bitetti M. S. 2016. Puma density, habitat use and conflict with humans in the Argentine Chaco. *Journal for Nature Conservation* 31: 9-15

Ramadori D. 2008. Informe sobre proyecto de ley Monumento Natural Puma, Dirección de Fauna Silvestre.

Rambaut A., Suchard M. A., Xie D., Drummond A. J. 2014. Tracer v1.6. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rau J y Jiménez J. E. 2002. Diet of puma (*Puma concolor*, Carnivora: Felidae) in coastal and Andean ranges of southern Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 37: 201-205.

Redford K. H. y Eisenberg J. F. 1992. Mammals of the Neotropics. Vol. 2. The Southern Cone. University of Chicago Press, Chicago, pp. 460.

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

Ripple W. J., Estes J. A., Beschta R. L., Wilmers C. C., Ritchie E. G., Hebblewhite M., Berger J., Elmhagen B., Letnic M., Nelson M. P., Schmitz O. J., Smith D. W., Wallach A. D., Wirsing A. J. 2014. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* 343: 151-164.

Rominger E. M., Whitlaw H. A., Weybright D. L., Dunn W. C., Ballard W. B. 2004. The influence of mountain lion predation on bighorn sheep translocations. *Journal of Wildlife Management*, 68(4): 993-999.

Rosas-Rosas O. C., Bender L. C., Valdez, R. 2008. Jaguar and puma predation on cattle calves in northeastern Sonora, Mexico. *Rangeland Ecology & Management*, 61(5): 554-560.

Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S., Sánchez-Gracia A., 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (12): 3299-3302.

Russel K. R. 1980. Mountain Lion. In: Schmidt, J. L. e Gilbert, D. L. *Big Game of North América, Ecology and Management*. Wildlife Management Institute, Stackpole Books, USA, 207-225.

Sambrook J. y Russell D. W. 2006. Rapid isolation of yeast DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1): 631-632.

Sarasola J. H., Zanón-Martínez J. I., Costán A. S., Ripple W. J. 2016. Hypercarnivorous apex predator could provide ecosystem services by dispersing seeds. *Scientific Reports*, 6: 19647.

Silva F. 1984. *Mamíferos silvestres - Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

Soler L. y Cáceres F. 2009. Breve análisis sobre la presencia del puma (*Puma concolor*) en la Provincia de Corrientes. *Biologica*, 10: 67-69.

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. *American Journal of Human Genetics*, 48: 370-382.

Stoner D. C., Wolfe M. L., Mecham C., Mecham M. B., Durham S. L., Choate D. M. 2013. Dispersal behaviour of a polygynous carnivore: do cougars *Puma concolor* follow source-sink predictions? *Wildlife Biology*, 19(3): 289-301.

Sunquist M. y Sunquist F. 2002. Wild cats of the world. University of Chicago Press. Chicago, USA, pp. 452.

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

Sweaner L. L., Logan K. A., Bauer J. W., Millsap B., Boyce, W. M. 2008. Puma and human spatial and temporal use of a popular California State Park. *Journal of Wildlife Management*, 72(5): 1076-1084.

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

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Taylor M. E. 1989. Locomotor adaptations by carnivores, pp. 382-409. En: *Carnivore behavior, ecology, and evolution*, pp. 620. Ed. Gittleman J. L. Springer, New York, New York, EEUU.

Terborgh J., Lopez L., Nuñez P., Rao M., Shahabuddin G., Orihuela G., Riveros M., Ascanio R., Adler G. H., Lambert T. D., Balbas L. 2001. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science*, 294: 1923-1926.

Thompson D. J., Fecske D. M., Jenks, J. A., Jarding A. R. 2009. Food habits of recolonizing cougars in the Dakotas: prey obtained from prairie and agricultural habitats. *American Midland Naturalist*, 161: 69-75.

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.

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. *Mastozoología Neotropical*, 7(2): 117-129.

Treves A. y Karanth K. U. 2003. Human-carnivore conflict and perspectives on carnivore management world wide. *Conservation Biology*, 17(6): 1491-1499.

Uphyrkina O., Johnson W. E., Quigley H., Miquelle D., Marker L., Bush M., O'Brien S. J. 2001. Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. *Molecular ecology*, 10(11): 2617-2633.

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.

Wallace D.C., 1986. Mitochondrial genes and disease. *Hospital Practice*, 21: 77-92.

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 Cenozoic 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.

Woodburne M. O. 2010. The great american biotic interchange: Dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. *Journal of Mammalian Evolution* 17: 245-264.

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.

Zanón-Martínez J. I., Kelly M. J., Mesa-Cruz J. B., Sarasola J. H., Dehart C., Travaini A. 2016. Density and activity patterns of pumas in hunted and non-hunted areas in central Argentina. *Wildlife Research* 43: 449–460.

Zanón-Martínez J. I., Travaini A., Iranzo Sanz E., Kloster D. Y. 2017. El puma en La Pampa. Universidad Nacional de La Pampa. *Contexto Universitario*, 11(49): 12-13.

Zarco-González M. M., Monroy-Vilchis O., Alaníz J. 2013. Spatial model of livestock predation by jaguar and puma in Mexico: conservation planning. *Biological Conservation*, 159: 80-87.