

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL HURÓN MENOR (*Galictis cuja*) EN LA REGIÓN
PAMPEANA**

Trabajo Final de Grado
del alumno



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

Pergamino, 26/12/2023

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL HURÓN MENOR (*Galictis cuja*) EN LA REGIÓN
PAMPEANA**

Trabajo Final de Grado

del alumno

MARCOS FILIPPINI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Susana Pistorale
Evaluadora

Rodrigo Hernández del Pino
Evaluador

Andrés Lavore
Evaluador



Gabriela Paula Fernández
Directora



Diego Fabián Castillo
Co-Director

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

Pergamino, 26/12/2023

Agradecimientos

A Gabi y Diego, mis directores por el apoyo y la orientación que me brindaron en este trabajo, por estar siempre a disposición, por sus ganas de enseñar y su vocación.

A todo el equipo del CEBIO por abrirme sus puertas e integrarme como uno más. En especial a Mati, Vir, Charly y Diana, por sus enseñanzas, consejos y ayuda.

A los amigos que me dió la UNNOBA, Fede, Nico, Yami y Cata, por estar siempre, por las charlas, las risas y los momentos compartidos.

A Emi, excelente persona y amigo, por ponerse la 10, por trabajar a la par mía, enseñarme y preocuparse que todo vaya bien.

A mis amigos Nahuel, Alain, Justo y Juan, por todos los momentos vividos.

A mis hermanos, Nico y Agus, por su amor y apoyo incondicional.

A Valen, por estar siempre a mi lado.

A toda mi familia.

A mis padres, Graciela y Marcelo, por enseñarme a no rendirse nunca y que siempre hay que dar pelea. Por estar siempre para mí, en las buenas y en las malas, por su garra, su dedicación y amor. Valió la pena.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Familia Mustelidae	1
1.1.1. Subfamilia Ictonychinae	1
1.1.2. Género <i>Galictis</i>	1
1.1.3. <i>Galictis cuja</i>	2
1.2. Estudios filogeográficos	6
1.3. ADN mitocondrial como marcador molecular	6
1.4. Antecedentes	8
2. Hipótesis	9
3. Objetivos	9
3.1. Objetivo general	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. Materiales y métodos	10
4.1. Obtención de muestras	10
4.2. Actividades de laboratorio	13
4.2.1. Extracción de ADN	13
4.2.2. Obtención, amplificación y secuenciación	14
4.3. Análisis de secuencias	17
5. Resultados	19
5.1. Extracción de ADN	19
5.2. Estimaciones de variabilidad genética	19
5.3. Relaciones haplotípicas	20
5.4. Análisis filogenético	21

6. Discusión	22
7. Bibliografía	26
8. Resumen	37
9. Anexos	38

1. Introducción

1.1. Familia Mustelidae

Mustelidae es la familia más grande y diversa dentro del orden Carnívora, abarcando alrededor del 30% de la diversidad de las especies de carnívoros existentes (Sato 2012). Actualmente incluye 25 géneros recientes y aproximadamente 67 especies que se extienden por Eurasia, África, América, y también se encuentran en Nueva Zelanda luego de las introducciones mediadas por humanos a fines del siglo XIX (Sato 2012).

Se cree que los mustélidos surgieron hace aproximadamente 32,4 a 30,9 millones de años en Asia, durante el Oligoceno (Kollias 2015). La familia Mustelidae incluye ocho subfamilias, Mustelinae, Ictonychinae, Helictidinae, Guloninae, Melinae, Mellivorinae, Taxidiinae y Lutrinae (Sato *et al.* 2003, Yu *et al.* 2011, Nascimento 2014). En el curso de la evolución, los mustélidos han desarrollado numerosas adaptaciones comportamentales y morfológicas, mostrando una gran diversidad de estilos de vida, incluyendo especies acuáticas, semiacuáticas, semiarbóreas, semifosoriales y fosoriales (Larivière y Jennings 2009, Kollias 2015). A menudo ocupan regiones con ambientes altamente estacionales, tienen áreas de distribución relativamente grandes y densidades poblacionales más bajas que muchos otros carnívoros (Ferguson 2006).

1.1.1. Subfamilia Ictonychinae

Ictonychinae incluye especies con distribuciones repartidas en tres continentes: África (*Ictonyx libyca*, *I. striatus*, *Poecilogale albinucha*), Eurasia (*Vormela peregusna*) y Sudamérica (*Galictis cuja*, *G. vittata*, *Lyncodon patagonicus*). Las especies que componen esta subfamilia comparten una coloración aposemática del pelaje (generalmente patrones distintivos en blanco y negro) y glándulas odoríferas anales agrandadas que se utilizan en demostraciones de amenazas defensivas (Buesching 2017).

1.1.2. Género *Galictis*

Las especies pertenecientes al género *Galictis*: *G. cuja* (Molina 1782) y *G. vittata* (Schreber 1776), comúnmente llamados hurones, se distribuyen en la región Neotropical de América, desde la mitad sur de México, extendiéndose a través de Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay, hasta la Patagonia Chilena y Argentina (Yensen y

Tarifa 2003, Kasper *et al.* 2013). El tiempo de divergencia de las especies del género se ha estimado en 2,8 millones de años, durante la segunda y mayor ola de diversificación de mustélidos en el Plioceno (Koepfli *et al.* 2008, Sato *et al.* 2012). Los registros fósiles indican que el ancestro común de los hurones neotropicales probablemente se originó en América del Norte (Yensen y Tarifa, 2003), e ingresó a América del Sur luego de la emergencia completa del istmo de Panamá (Cione y Tonni 1995, Prevosti y Soibelzon 2012, Sato *et al.* 2012), el cual ofreció un puente terrestre para el intercambio de fauna entre América del Norte y América del Sur, un evento denominado el Gran Intercambio Biótico Americano (Woodburne 2010).

Debido a que son fenotípicamente similares, el tamaño es, en general, la característica más evidente que diferencia a ambas especies del género, siendo *G. cuja* de un tamaño menor que *G. vittata* (longitud total, 44,3 a 68,0 cm vs 60,0 a 76,0 cm), por lo que se denominan hurón menor y mayor respectivamente (Anderson 1997, Yensen y Tarifa 2003). Además, estas especies difieren en cuanto a la morfología de las cúspides del primer molar mandibular, en la coloración, longitud y densidad del pelaje, y con respecto a su distribución geográfica, aunque se han identificado posibles áreas de simpatría entre ambas (Bornholdt *et al.* 2013). En este sentido, *G. vittata* tiene un metacónido en el primer molar inferior, un pelaje más corto y menos denso, y su ocurrencia está restringida a la cuenca del Amazonas y a los bosques húmedos de América Central (Oliveira 2009, Bornholdt *et al.* 2013). Por su parte, *G. cuja* no presenta dicho metacónido, posee un pelaje más largo y denso y se puede encontrar en diferentes hábitats (sabanas, desiertos, bosques, llanuras aluviales y campos; Kasper *et al.* 2013, Pinto *et al.* 2022). Estudios moleculares, tanto con ADN mitocondrial como nuclear, apoyan la diferenciación del género en dos taxones (Bornholdt *et al.* 2013).

1.1.3. *Galictis cuja*

El hurón menor, *Galictis cuja* (Molina 1782), es un mustélido endémico de Sudamérica que se distribuye desde el sur de Perú, oeste de Bolivia, noreste y sureste de Brasil, a lo largo de la mayor parte de Paraguay y Uruguay, hasta el sur de la Patagonia en Argentina y Chile (Yensen y Tarifa 2003, Bornholdt *et al.* 2013, Figura 1). Se encuentra en diferentes hábitats, cómo por ejemplo, bosque tropical caducifolio seco, bosque húmedo, pastizales andinos, Chaco xérico, pastizales pampeanos y estepas. Estos ambientes poseen una gran variación de temperatura, precipitación y

altitud (Redford y Eisenberg 1992, Mares *et al.* 1996, Anderson 1997, Yensen y Tarifa 2003). En la actualidad, la distribución de esta especie se restringe principalmente a bajas altitudes, temperaturas anuales templadas y precipitaciones anuales de alrededor de 1.500 mm, aunque también se encontraron registros en áreas más secas, más húmedas, así como también en regiones más elevadas (Schiaffini 2022).

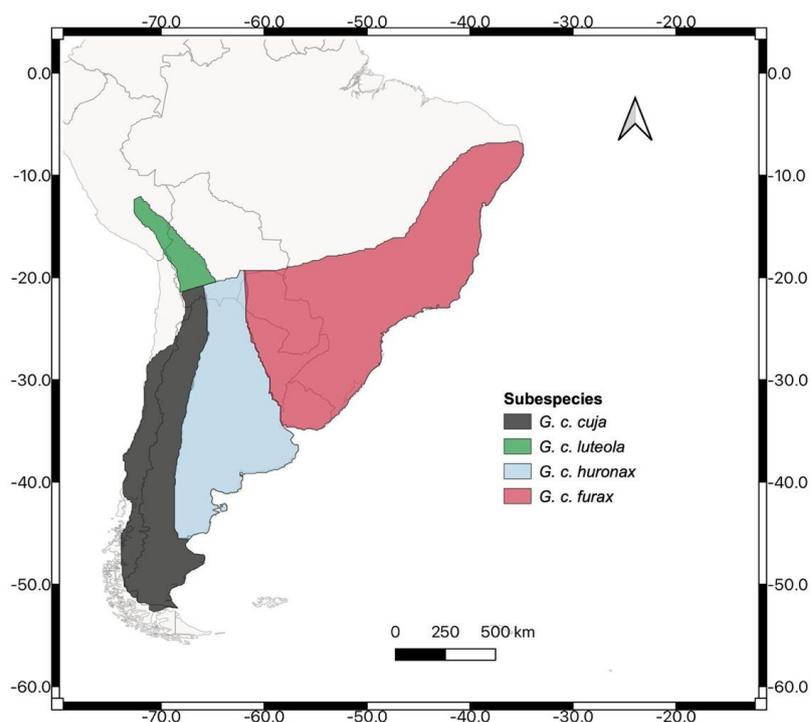


Figura 1. Distribución geográfica de *Galictis cuja* y sus subespecies.

G. cuja se caracteriza por poseer un cuerpo alargado y estrecho, con una longitud total que oscila entre 443 y 680 mm y un peso entre 1,2 y 1,8 kg. Tiene cuello y cola largos y patas cortas. La franja diagonal beige, va desde la frente hasta el hombro separando el dorso de color pardo grisáceo del vientre de color negro, dándole al animal un llamativo patrón pardo grisáceo y negro (Yensen y Tarifa 2003, Figura 2). Actualmente se describen cuatro subespecies del hurón menor definidas en base a criterios morfológicos: *G. c. cuja* (Molina 1782); *G. c. huronax* (Thomas 1921); *G. c. luteola* (Thomas 1907:163) y *G. c. furax* (Thomas 1907; en Cabrera 1958, Figura 1).



Figura 2. Ejemplar adulto de *Galictis cuja*.

Es considerada una especie típicamente carnívora y oportunista (Schmitt y Favretto 2021), la cual se alimenta básicamente de lo que es más probable encontrar en su hábitat (Jaksić 1989). Los elementos más frecuentes en su dieta son pequeños mamíferos, en menor proporción anfibios, reptiles, aves pequeñas y sus huevos (Diuk-Wasser y Cassini 1998, Delibes *et al.* 2003, Yensen y Tarifa 2003, Kraus y Rödel 2004). También se encuentran, con cierta frecuencia, mamíferos de mayor tamaño como armadillos, zorrinos, carpinchos y ungulados (incluidas las ovejas), lo que indica que la especie también consume carroña (Delibes *et al.* 2003, Zapata *et al.* 2005, Rocha-Mendes *et al.* 2010), o al igual que otras especies de mustélidos, como por ejemplo *Mustela erminea* y *M. nivalis*, podría ser capaz de capturar presas mucho mayores que su tamaño (King y Powell 2006). Además, existen registros de consumo de elementos vegetales en esta especie (Ebensperger *et al.* 1991, Pires 2018, Pasa *et al.* 2019). Debido al control que pueden ejercer los depredadores sobre las poblaciones de sus presas, estos tienen un rol fundamental en los ecosistemas donde habitan (Pace *et al.* 1999). En este sentido, el hurón constituye un eficiente controlador de las poblaciones de roedores, al punto que las fluctuaciones en las poblaciones de este mustélido podrían determinar cambios poblacionales de este grupo de presas (Aprile *et al.* 2019).

También actúa como un potencial controlador de especies invasoras como liebres (*Lepus europaeus*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*; Diuk-Wasser *et al.* 1998, Delibes *et al.* 2003, Zapata *et al.* 2005).

Se describe como una especie principalmente diurna con alguna actividad crepuscular y nocturna (Yensen y Tarifa 2003, Tellaeche *et al.* 2014). Un factor que podría explicar este patrón es evitar la competencia potencial con otros carnívoros simpátricos y minimizar el riesgo de depredación (Pires 2018). La especie presenta un marcado dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras (Migliorini *et al.* 2020). Suelen ser solitarios, aunque se cree que los miembros de la pareja cazan juntos mientras se crían los cachorros, por lo que podrían ser monógamos. Las camadas varían de 2 a 5 crías, los cachorros se desarrollan rápidamente y alcanzan el tamaño adulto en pocos meses (Yensen y Tarifa 2003). Se pueden avistar en pequeños grupos, generalmente compuestos por la pareja y cachorros de tamaño adulto (Yensen y Tarifa 2003).

En la actualidad, *G. cuja* está categorizado a nivel internacional como Preocupación Menor (Helgen y Schiaffini 2006). En Argentina, la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS) y la Sociedad Argentina para el Estudio de Mamíferos (SAREM), comparten esta categorización fundamentándose en la amplia distribución de la especie en el país (87% de la superficie continental; Aprile *et al.* 2019).

En la región central de nuestro país, donde se concentra la mayor densidad de la población humana, la transformación de los hábitats naturales es un fenómeno común, debido al avance de la frontera agrícola-ganadera (Brown *et al.* 2006). Dichas modificaciones pueden traducirse en pérdida de conectividad ecológica, entendida como la capacidad con la que cuenta el paisaje para permitir los desplazamientos de los animales para alimentarse, refugiarse, reproducirse o dispersarse (Taylor *et al.* 1993). Esto tiene consecuencias importantes en la diversidad genética de las poblaciones, ya que puede causar reducción de los tamaños poblacionales, aislamiento entre poblaciones y limitar la dispersión de los individuos (y sus genes), disminuyendo la variabilidad genética de las poblaciones locales e incrementando la diferenciación genética entre éstas (Hedrick 2005, Frankham *et al.* 2010). Es por esto, que la pérdida y la fragmentación de los hábitats, la persecución por parte del hombre (Loyola *et al.*

2008, Crooks *et al.* 2011), la depredación por parte de animales domésticos, así como también la transmisión de enfermedades (Kommers *et al.* 1999, Campos *et al.* 2007), y los atropellamientos (Coelho *et al.* 2008) constituyen potenciales amenazas para *G. cuja* en algunas porciones de su distribución. Asimismo, la falta de información genética para esta especie, hace que sea necesario el estudio tanto de su variabilidad como de los posibles patrones de estructuración de la misma.

1.2. Estudios filogeográficos

La palabra filogeografía es un término acuñado por John Avise y colaboradores (Avise *et al.* 1987). Esta disciplina tiene como objetivo comprender los procesos que subyacen a la distribución geográfica de la variación genética dentro y entre especies estrechamente relacionadas (Knowles 2009). Normalmente implica el uso de uno o más marcadores moleculares a través de los cuales pueden ser recuperadas las relaciones filogenéticas a nivel intraespecífico. El marcador molecular comúnmente utilizado en estudios filogeográficos en animales ha sido el ADN mitocondrial (ADNmt), ya que varias de sus características son particularmente adecuadas para examinar las distribuciones geográficas de linajes evolutivos (Arbogast y Kenagy 2001).

De esta manera los estudios filogeográficos proporcionan información detallada de la especie sobre cómo los eventos geológicos, el ambiente y los factores geográficos interactúan con los aspectos de la ecología y la historia natural de una especie para dar forma a su evolución. En un contexto comparativo, tales vínculos causales pueden revelar la forma en que comunidades enteras (o una parte de estas) están estructuradas por respuestas compartidas a un pasado común y/o por eventos históricos específicos que afectan a especies particulares (Knowles 2009).

1.3. ADN mitocondrial como marcador molecular

Uno de los marcadores moleculares más utilizados para el estudio de la variabilidad genética son los marcadores mitocondriales. Cada célula contiene múltiples copias de ADNmt (entre 10 y 2.500), por lo que su amplificación en muestras de baja cantidad y calidad resulta eficiente (González 2005). El ADNmt posee además una tasa de mutación mayor que la del genoma nuclear, principalmente porque no posee enzimas para la reparación en la replicación ni para daños del ADN (Castro *et al.* 1998). Finalmente, su herencia matrilineal y ausencia de recombinación génica, evita que se puedan llegar a desvirtuar las verdaderas genealogías de las secuencias (Lanteri y

1.4. Antecedentes

La mayoría de la literatura disponible sobre este mustélido incluye estudios sobre la ecología trófica en Argentina, Chile, Uruguay y Brasil (Ebensperger *et al.* 1991, Diuk-Wasser y Cassini 1998, Delibes *et al.* 2003, Kraus y Rödel 2004, Zapata *et al.* 2005, Sade *et al.* 2012, Kasper *et al.* 2015, Pires 2018, Pasa 2020, Schmitt y Favretto 2021), la selección de hábitat (Zúñiga *et al.* 2009), anatomía (Ercoli *et al.* 2012, 2016), su distribución (Mares *et al.* 1981, Redford y Einsenber 1992, Prevosti y Travaini 2005, Carrera *et al.* 2012, Bornholdt *et al.* 2013, Poo Muñoz 2014, Schiaffini 2017, Ferreira *et al.* 2022, Schiaffini 2022) y la ecomorfología (Zapata *et al.* 2008, Bornholdt *et al.* 2013, Schiaffini y Prevosti 2014, Migliorini *et al.* 2020). Solo un par de trabajos realizados en Brasil por Bornholdt (2012) y Bontempo *et al.* (2020), realizan un estudio genético de la especie.

Bornholdt (2012) caracterizó la diversidad genética para distintas poblaciones de *G. cuja* pertenecientes a Brasil y algunos individuos provenientes de Argentina, amplificando la totalidad del gen ND5. Este trabajo identificó una alta diversidad genética, resultando este gen muy informativo para estudios filogeográficos en la especie. El conjunto de secuencias (siete) obtenidas para Argentina fueron idénticas. Para las muestras de Brasil se observó la presencia de dos grupos principales, los cuales no presentaron una diferenciación geográfica clara. Por su parte, Bontempo *et al.* (2020) describieron el cariotipo y caracterizaron la diversidad genética de esta especie en la Floresta Atlántica del sureste de Brasil, amplificando la totalidad del gen *Citocromo b*. Este trabajo también identificó una alta diversidad haplotípica, con una moderada a baja diversidad nucleotídica concluyendo que la población estudiada se encuentra en expansión. Al igual que el estudio de Bornholdt (2012) describen una ausencia de estructuración genética para la especie.

El propósito del presente trabajo es llevar a cabo una primera caracterización de la variabilidad genética en poblaciones de *G. cuja* de la región Pampeana de Argentina, a partir del marcador molecular mitocondrial ND5 y compararla con la ya reportada para la especie.

2. Hipótesis

Dada a la intensa actividad antropogénica desarrollada en la región Pampeana, y la consecuente fragmentación y degradación de sus ambientes, se espera que los individuos muestreados en esta área muestren una baja variabilidad genética.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterizar la variabilidad genética del hurón menor (*Galictis cuja*) en la región Pampeana, mediante el uso de un marcador molecular mitocondrial.

3.2. Objetivos específicos

- Generar una base de datos de localización geográfica, así como de muestras y de ADN, para el hurón menor (*G. cuja*) de la región Pampeana.
- Caracterizar la variabilidad genética de los individuos de *G. cuja* incluidos en este estudio a partir del marcador mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5).
- Integrar y comparar los patrones de variabilidad genética obtenidos con los previamente publicados para la especie y los disponibles para otros mustélidos sudamericanos.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre la muestra estudiada y otras a lo largo de su distribución geográfica a partir del set de secuencias de ND5.

4. Materiales y métodos

4.1 Obtención de muestras

La Región Pampeana posee una gran extensión, en la que predomina la llanura, y presenta importantes variaciones espaciales y temporales en los regímenes de temperatura y precipitación (Brandizi 2015). Debido a las características del clima y el suelo, constituye una zona agrícola y ganadera por excelencia.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron colectadas durante recorridos oportunistas por rutas, caminos vecinales, visitas a establecimientos rurales, y captura viva en el período comprendido entre los años 1999 y 2023 en distintas localidades de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos. Se incluyeron cuatro muestras provenientes de la provincia de Río Negro colectadas en el límite con la provincia de Buenos Aires (Figura 4; Tabla 1).

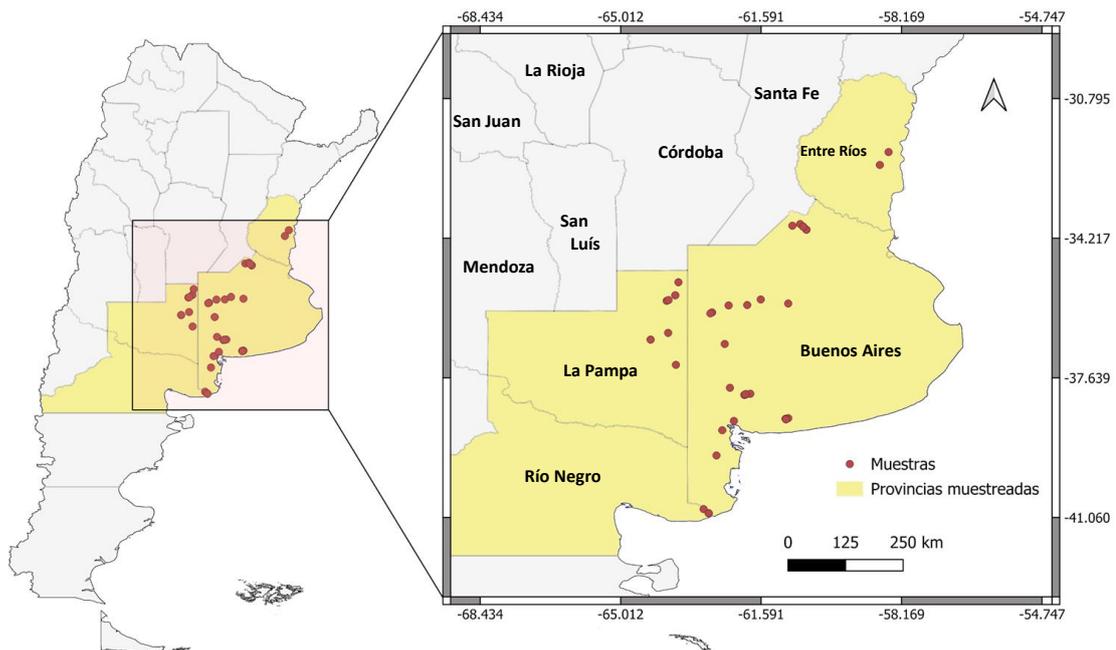


Figura 4. Distribución geográfica de las muestras de *Galictis cuja* colectadas en el estudio.

Tabla 1. Se indica para cada provincia muestreada el departamento, localidad, y coordenadas geográficas de los sitios de colecta, así como el número de identificación, origen de la muestra (atropellado/captura), tipo de muestra (músculo/cuero) y la fecha de colecta. ND= no disponible.

Provincia	Departamento	Localidad	Lat.	Long.	ID	Origen	Tejido	Fecha de colecta
	9 de Julio	RP 65	-35,81	-60,93	1	Atropellado	Cuero	nov-15
	Bahía Blanca	Bahía Blanca	-38,69	-62,25	2	Atropellado	Músculo	ND
	Carlos Casares	RP 50	-35,54	-61,51	3	Atropellado	Músculo	ND
	Cnel. Dorrego	Aparicio	-38,62	-60,92	4	Captura	Cuero	ene-06
	Cnel. Dorrego	José A. Guisasola	-38,65	-60,98	5	Captura	Cuero	jun-03
	Cnel. Dorrego	José A. Guisasola	-38,65	-60,98	6	Captura	Cuero	jul-04
	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,03	-61,96	7	Captura	Cuero	mar-02
	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,04	-61,97	8	Captura	Cuero	may-04
	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,04	-61,95	9	Captura	Cuero	ene-03
	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,02	-61,85	10	Captura	Cuero	jul-99
Buenos Aires	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,04	-61,97	11	Captura	Cuero	jul-01
	Tornquist	Parque Provincial Ernesto Tornquist	-38,64	-60,99	12	Captura	Cuero	abr-03
	Grl. Viamonte	RP 65, km 3	-36,05	-62,82	13	Atropellado	Músculo	ND
	Guaminí	RN 33	-36,80	-62,47	14	Atropellado	Músculo	jul-16
	Patagones	RN 3	-39,54	-62,67	15	Atropellado	Músculo	feb-13
	Pehuajó	RN 5, Guanaco	-35,71	-61,59	16	Atropellado	Músculo	ND
	Pehuajó	RN 5, Alagón	-35,85	-61,93	17	Atropellado	Músculo	ND
	Pergamino	Rancagua	-34,00	-60,48	18	Atropellado	Músculo	jul-17
	Pergamino	Rancagua	-34,00	-60,48	19	Atropellado	Músculo	ene-19
	Pergamino	Rancagua	-34,00	-60,48	20	Atropellado	Músculo	ago-19
	Pergamino	RP 32 y circunvalación Pergamino	-33,93	-60,56	21	Atropellado	Músculo	feb-21

	Pergamino	Mariano H. Alfonso	-33,91	-60,82	22	Atropellado	Músculo	ND
	Pergamino	RP 178	-33,87	-60,64	23	Atropellado	Músculo	ND
	Pergamino	Reducto fortificado	-33,93	-60,56	24	Atropellado	Músculo	feb-22
	Saavedra	RN 33	-37,88	-62,35	25	Atropellado	Músculo	ND
	Tornquist	RP 76	-38,05	-62,00	26	Atropellado	Músculo	dic-15
	Trenque Lauquen	RN 5, Km 412	-35,86	-62,38	27	Atropellado	Músculo	nov-19
	Trenque Lauquen	RN 5	-36,03	-62,78	28	Atropellado	Músculo	ND
	Villarino	Ombucta	-38,92	-62,53	29	Atropellado	Músculo	abr-09
Entre Ríos	Villaguay	Villa San Miguel Herrera, RP 39	-32,42	-58,69	30	Atropellado	Músculo	ene-21
	Villaguay	RP 130	-32,10	-58,48	31	Atropellado	Músculo	ene-21
La Pampa	Catriló	Uriburu, RN 5	-36,53	-63,85	32	Atropellado	Músculo	ND
	Chapaleufú	RP 1	-35,29	-63,60	33	Atropellado	Músculo	feb-21
	Guatraché	RP 1	-37,32	-63,66	34	Atropellado	Músculo	feb-21
	Maracó	Metileo, RP 102	-35,75	-63,89	35	Atropellado	Músculo	ene-21
	Maracó	RP 1	-35,61	-63,68	36	Atropellado	Músculo	ene-21
	Maracó	RP 1	-35,61	-63,68	37	Atropellado	Músculo	feb-21
	Maracó	RP 102	-35,73	-63,84	38	Atropellado	Músculo	mar-22
	Toay	RN 35	-36,70	-64,28	39	Atropellado	Músculo	abr-21
	Toay	RN 35	-36,70	-64,28	40	Atropellado	Músculo	oct-21
	Adolfo Alsina	Viedma	-40,85	-62,99	41	Atropellado	Cuero	ND
Rio Negro	Adolfo Alsina	RP 1	-40,95	-62,86	42	Atropellado	Músculo	may-22
	Adolfo Alsina	RP 1	-40,95	-62,86	43	Atropellado	Músculo	jun-22
	Adolfo Alsina	RP 1	-40,95	-62,86	44	Atropellado	Músculo	feb-23
	Adolfo Alsina	RP 1	-40,95	-62,86	45	Atropellado	Músculo	feb-23
	ND	ND	ND	ND	46	Atropellado	Músculo	ND

Para cada individuo hallado muerto (por atropellamiento en rutas) se colectó una porción de tejido de aproximadamente 2 a 3 cm de tamaño, la cual fue colocada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con alcohol 96% (Figura 5). En el caso de la captura viva (la

cual se realizó previa sedación química del animal con el objetivo de colocar radiocollares), se muestreó una pequeña porción del pabellón auricular, la cual fue almacenada bajo las condiciones previamente mencionadas. Una vez recuperado completamente de la anestesia, y habiendo cumplimentado todos los objetivos de la captura científica, el animal era liberado en el mismo sitio donde había sido capturado.



Figura 5. Colecta de muestras de *Galictis cuja*. Ejemplar atropellado (A), capturado (B).

Cada muestra fue clasificada según el tipo de tejido (músculo o cuero). Posteriormente, se registraron las coordenadas del sitio de colecta con un dispositivo de posicionamiento satelital (GPS, *Global Positioning System*) para luego volcarlas a un sistema de información geográfica (Qgis). Como resultado del muestreo se recolectaron 46 muestras, n=29 en la provincia de Buenos Aires, n=9 en La Pampa, n=2 en Entre Ríos y n=4 en Rio Negro (Figura 4, Tabla 1), las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

4.2. Actividades de laboratorio

4.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando en primera instancia el protocolo de extracción con NaCl (Sambrook y Russell 2006). Una vez que el ADN fue extraído se almacenó en un freezer a -20°C.

Para las muestras de las cuales no pudo extraerse ADN mediante el protocolo de NaCl (n=31), se realizó una segunda extracción utilizando el método de extracción con Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell 2006).

La eficiencia en la extracción se verificó utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, sometido a 110 voltios durante 50 minutos, y finalmente visualizado bajo luz ultravioleta. En cada calle del gel se sembraron 3 µl de muestra junto a 3 µl de buffer de siembra ADN del *loading dye* con el fin de identificar el frente de corrida. El ADN se cuantificó mediante fotografías de alta resolución de los geles obtenidos, a través del *software* GeneSys V1.4.6.0 (Syngene, India), para ser analizados posteriormente mediante una comparación de intensidad óptica entre la banda obtenida y el marcador de peso molecular utilizado de 100pb de precisión (Productos Bio-Lógicos), utilizando el *software* ImageJ (Abrámoff *et al.* 2004).

4.2.2. Obtención, amplificación y secuenciación

Se realizó la amplificación de un fragmento correspondiente al *locus* ND5, el cual consta de aproximadamente 750 pb, a partir de los *primers*: ND5-DF1 (5'-TTGGTGCAACTCCAAATAAAAGT-3') y *Reverse*: ND5-DR1 (5'-AGGAGTTGGGCCTTCTATGG-3', Trigo *et al.* 2008). Esta fue llevada a cabo utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl, conteniendo 10 µl de ADN (entre 25 y 100 ng); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada uno de los *primers*; 0,2 mM de dNTPs; buffer de reacción 1X; 0,5U de Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) y agua estéril ultrapura para llevar a volumen final.

Las condiciones de amplificación cargadas al termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer Technology CO., LTD) fueron las descritas por Bornholdt y colaboradores (2013), quienes realizaron diez ciclos de touchdown de 94 °C durante 45 segundos, 60–51°C durante 45 segundos (con una disminución en la temperatura de *annealing* de 1 °C por ciclo) y 72 °C durante 1,5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos y 72 °C por 1,5 minutos, y una extensión final de 72 °C por 3 minutos. Para todas las corridas de PCR se incluyeron tanto controles negativos como positivos, para descartar la existencia de contaminación y verificar la eficiencia de la reacción de PCR, respectivamente.

El resultado de la amplificación se visualizó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% m/v, teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Se recurrió a un marcador de peso molecular de 100pb de precisión (Productos Bio-Lógicos) para inferir el tamaño de los fragmentos amplificados. La concentración de ADN en cada caso se determinó mediante fotografías de alta resolución de los geles obtenidos, a través del *software* GeneSys V1.4.6.0 (Syngene, India), para ser analizados posteriormente mediante una comparación de intensidad óptica entre la banda obtenida y el marcador de peso molecular utilizado, mediante el *software* ImageJ (Abrámoff *et al.* 2004). Los productos de PCR con concentraciones menores a 25 ng fueron amplificados nuevamente con el fin de obtener la concentración mínima requerida para su posterior secuenciación.

Siguiendo las condiciones descritas por Bornholdt y colaboradores (2013), al observar el producto de la amplificación, junto a las bandas de interés se destacó la presencia de otras inespecíficas (Figura 6).

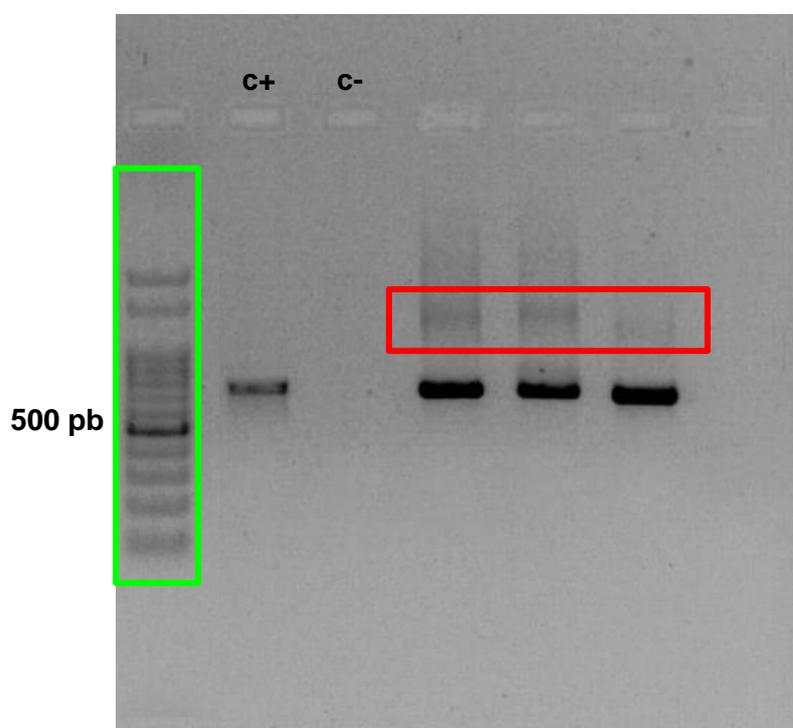


Figura 6. Resultado de la amplificación del marcador ND5 (condiciones extraídas de Bornholdt *et al.* 2013; visualizado en un gel de agarosa al 1%). En el recuadro verde se muestra el marcador de peso molecular y en rojo se identifica la presencia de una

banda inespecífica como producto de la amplificación del fragmento de interés. Además, se indican los controles positivo (C+) y negativo (N-).

Con el fin de eliminar dichas bandas, se disminuyó la concentración de ADN utilizado en la reacción y se modificaron las condiciones de amplificación, realizando diez ciclos de touchdown de 94°C durante 45 segundos, *annealing* de 62°C durante 45 segundos (con una disminución en la temperatura de *annealing* de 0,9 °C por ciclo) y extensión a 72 °C durante 1,5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, con una temperatura de *annealing* de 53 °C por 45 segundos y 72 °C por 1,5 minutos, y una extensión final de 72 °C por 3 minutos. Este nuevo protocolo permitió disminuir la presencia de bandas inespecíficas en el 100% de las muestras (Figura 7).

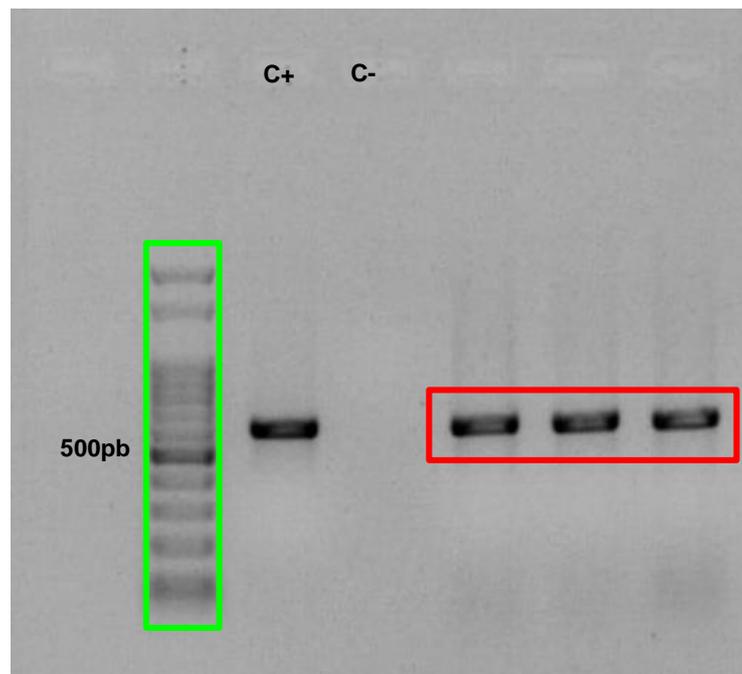


Figura 7. Resultado de la amplificación del marcador ND5 (condiciones modificadas de Bornholdt *et al.* 2013), visualizado en un gel de agarosa al 1%. En el recuadro verde se muestra el marcador de peso molecular y en rojo se identifican las bandas de interés, sin la presencia de bandas inespecíficas, además se indican los controles positivos (C+) y negativo (N-).

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

4.3. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y corregidas usando el programa *BioEdit* (Hall, 2004), obteniéndose fragmentos génicos de 640pb. Para los análisis posteriores se utilizaron dos grupos de datos, el primero (*set de datos 1*) formado por las secuencias obtenidas en este estudio junto con los haplotipos de ND5 de *G. cuja* disponible en *GenBank* (n=6), pertenecientes a 22 individuos de Brasil y 7 de Argentina descritos por Bornholdt (2012; Anexo 2). El segundo (*set de datos 2*), incluyó las secuencias obtenidas en el presente trabajo y las pertenecientes a los 7 individuos de Argentina generadas por Bornholdt (2012).

A partir del *set de datos 1* se realizó un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo ClustalX del programa *BioEdit* (Hall 2004). Luego se generaron árboles filogenéticos utilizando las metodologías de reconstrucción filogenética, método del vecino más cercano (*neighbour joining*, NJ) y máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML), empleando las opciones recomendadas por el programa MEGAX (Kumar *et al.* 2018). Como *outgroup* se utilizaron secuencias pertenecientes a *Neovison vison* e *Ictonyx libycus*. La determinación de los límites de confianza para la monofilia de cada nodo, se realizó a través de un análisis de *bootstrap* (Felsenstein 1985) con 1000 réplicas. Además, se generó un tercer árbol filogenético utilizando el método de inferencia bayesiana con el programa BEAST v1.10.4 (Drummond y Rambaut 2007). Se utilizó un árbol de especiación Yule y un reloj molecular estricto, la búsqueda se realizó con el modelo HKY inferido para todo el conjunto de datos mediante el programa jModelTest (Posada 2008), y se emplearon 10 millones de generaciones, tomando árboles cada 50 mil generaciones. Las corridas independientes fueron resumidas en TreeAnnotator 1.6.2 (Drummond y Rambaut 2007); los primeros mil árboles (el 10%) fueron descartados y los restantes se utilizaron para visualizar el árbol más probable en FigTree v1.4.4.

Las relaciones haplotípicas fueron determinadas mediante el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa POPART (Leigh y Bryant 2015) a partir del *set de datos 1*.

La variabilidad genética, a partir del *set de datos 2*, fue estimada mediante el número de sitios polimórficos, número de haplotipos índice de diversidad nucleotídica (Pi) y el índice de diversidad haplotípica (Hd) utilizando el programa DNASP5 (Librado y Rozas 2009). En tanto que para estimar la diversidad haplotípica de los individuos de Brasil se realizó el cálculo de manera manual siguiendo la fórmula de Nei (1987).

5. Resultados

5.1. Extracción de ADN

Del total de muestras colectadas (n=46) se extrajo ADN de manera exitosa de 21 de ellas (45,7%; Anexo 1). El método de extracción con sales fue exitoso para 15 muestras (32,6%). Al aplicarse el método de Fenol-Cloroformo con las muestras no exitosas se obtuvo ADN para n=6 muestras más (19,3% de suceso). No fue posible obtener ADN de muestras con una antigüedad mayor a 10 años. En cuanto al tipo de tejido, el éxito de extracción fue mayor para tejido muscular (músculo; 57,1% de suceso) que para tejido epitelial (cuero; 9,1% de suceso, Figura 8).

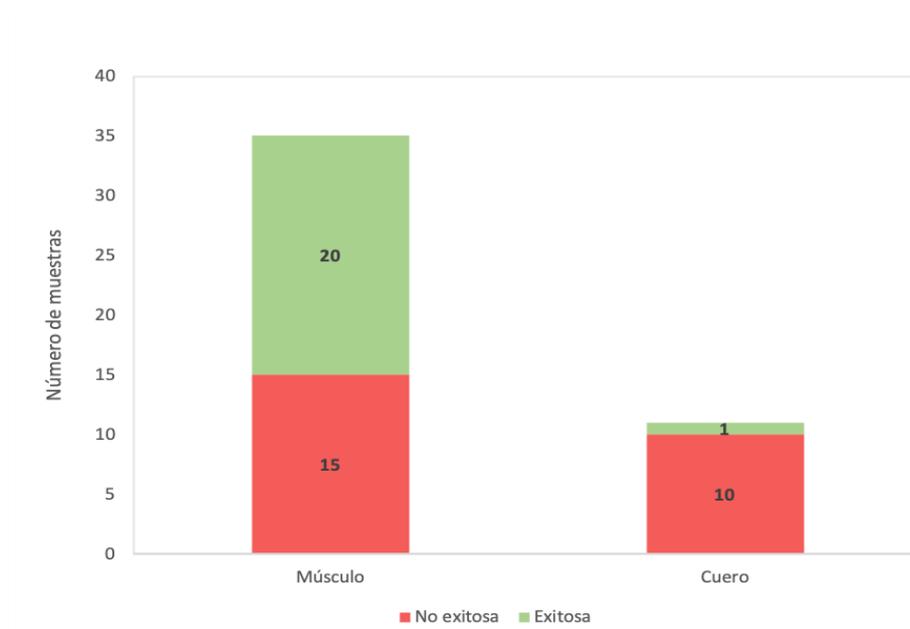


Figura 8. Éxito en la extracción de ADN de *Galictis cuja* considerando el tipo de tejido utilizado (músculo o cuero).

5.2. Estimaciones de variabilidad genética

Para las 21 secuencias de ND5 (640pb) de *G. cuja* obtenidas para la región pampeana, se observó un único sitio polimórfico y dos haplotipos: H1 (registrado previamente por Bornholdt *et al.* 2013) y H2 (Anexo 1). Cuando se incluyeron los datos obtenidos por Bornholdt (2012), se observó un total de 28 sitios variables y 19 haplotipos diferentes. En cuanto a la diversidad haplotípica, se observa una marcada diferencia entre Brasil y Argentina, siendo doce veces menor en Argentina (Tabla 2).

Tabla 2. Número de secuencias (N), de haplotipos (h), sitios polimórficos (SP), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi) de las diferentes poblaciones de *Galictis cuja*. ND= datos no disponibles.

Origen del set de datos	Población	N	h	SP	Hd	Pi
Presente estudio	Argentina	21	2	1	0,095	0,00015
Presente estudio + Bornholdt (2012)	Argentina	28	2	1	0,072	0,00011
Bornholdt (2012)	Brasil	64	17	27	0,885	ND
Este estudio + Bornholdt (2012)	Brasil + Argentina	92	19	28	0,852	ND

5.3. Relaciones haplotípicas

El haplotipo H4, el central de la red, conecta con los haplotipos H1, H3 y H6 por un único paso mutacional, mientras que con los haplotipos H5 y H7 conecta por dos mutaciones (Figura 8B). El haplotipo H2 se encontró en la localidad de Maracó, La Pampa (Figura 8A), y se conecta con H1 por una única mutación puntual (Figura 8B). No se detectaron haplotipos compartidos entre ambos países (Figura 8A).

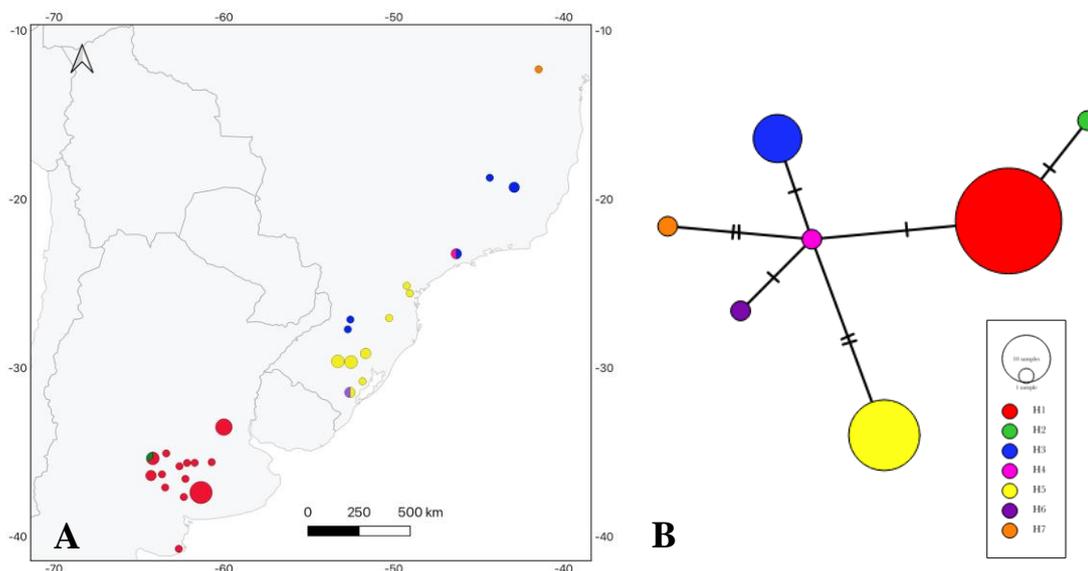


Figura 8. Distribución geográfica de los haplotipos (A) y red haplotípica (B), obtenidos para el fragmento del gen ND5 de *Galictis cuja*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de haplotipos (en A y B) y las barras colocadas en las líneas de conexión (en A) indican el número de diferencias nucleotídicas entre haplotipos.

5.4. Análisis filogenético

Los árboles obtenidos a partir de las metodologías de máxima verosimilitud (Anexo 3), método del vecino más cercano (Anexo 4), e inferencia bayesiana, para el fragmento de 640pb del gen ND5, fueron congruentes entre sí. Por lo tanto, se presenta únicamente la filogenia obtenida a partir de inferencia bayesiana (Figura 10).

Las secuencias analizadas convergen en los haplotipos H1 y H2, los cuales se agrupan en el clado correspondiente a *Galictis Cuja* con el máximo valor de probabilidad posterior (1).

Como era de esperar las reconstrucciones filogenéticas muestran a *G. vittata* como especie más cercana a *G. cuja* (valor de probabilidad posterior 1) y a *Neovison vison* y *Ictonyx libycus* por fuera del género *Galictis* (con un valor de probabilidad posterior de 1). Por otra parte, no se verifica una estructuración de *G. cuja* entre las poblaciones de Brasil y Argentina.

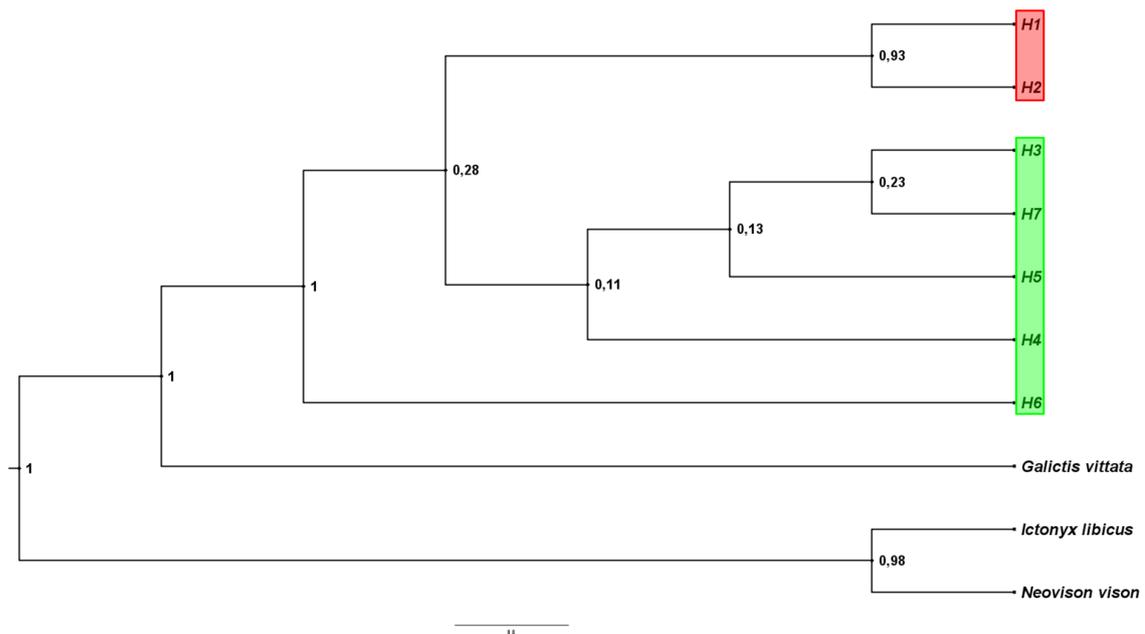


Figura 10. Árbol filogenético resultante del análisis de inferencia bayesiana a partir de los haplotipos de *Galictis cuja* obtenidos con el marcador ND5. Los números en los nodos indican la probabilidad posterior. En rojo se indica el clado que agrupa haplotipos de Argentina y en verde el que reúne los de Brasil. Como grupos externos se utilizaron secuencias de *Galictis vittata*, *Ictonyx libycus* y *Neovison vison* (Anexo 4).

6. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos brindan una primera aproximación de la variabilidad genética de *G. cuja* en la región pampeana, estimada a partir del marcador mitocondrial ND5.

En relación a la parte metodológica, se obtuvo un bajo éxito en la extracción del ADN, el cual podría ser atribuido a diversos factores. Uno de ellos puede ser el tipo de tejido utilizado como fuente de ADN, ya que el éxito en la extracción a partir de muestras de cuero fue notoriamente más bajo que en las de músculo. Sin embargo, esta observación puede verse sesgada por al menos un par de factores: la antigüedad de las muestras y el nivel de degradación de las mismas. Del total de muestras colectadas, las de cuero fueron las más antiguas (una alta proporción fueron conservadas por un periodo mayor a 10 años) por lo cual el bajo porcentaje de éxito puede no deberse al tipo de tejido utilizado, sino más bien al nivel de degradación de las moléculas de ADN relacionada con la edad y la forma de almacenamiento de las muestras (Michaud y Foran 2011, Twort *et al.* 2021). Apoya esta hipótesis, el estudio realizado por Wandeler y colaboradores (2007) donde las muestras de cuero han sido citadas como buena fuente de ADN para este tipo de estudios. Otro factor que pudo haber condicionado el éxito de extracción es el estado de los animales atropellados, ya que los procesos de degradación del ADN *post mortem* (descomposición hidrolítica y oxidativa), la exposición a condiciones ambientales (como la radiación ultravioleta, altas temperaturas y humedad) y en algunos casos alta circulación de vehículos sobre los cadáveres, comprometen la calidad del material analizado (Pääbo *et al.* 2004, Klippel *et al.* 2015, Amarilla-Stevens *et al.* 2023, Coba-Males *et al.* 2023). Aún con las limitaciones previamente mencionadas, el muestreo oportunista de animales atropellados representa una valiosa fuente de muestras de tejido para el estudio molecular de *G. cuja*, especie que tiende a ser esquiva y rara en algunas porciones de su distribución (Yensen y Tarifa 2003, Poo-Muñoz *et al.* 2014). Por lo tanto, a pesar del relativamente bajo porcentaje de extracción obtenido, dicho método de muestreo se aconseja para el hurón menor, ya que es un método simple, de costo relativamente bajo, de bajo riesgo e impacto y evita el trabajo y la inversión que requiere la logística para la obtención de muestras de animales vivos por medio de capturas (Nardelli *et al.* 2011, Coba-Males *et al.* 2023).

Con respecto al proceso de amplificación del fragmento del gen ND5, la aparición de una banda inespecífica (de unos 1000pb), pudo deberse a la presencia de pseudogenes mitocondriales en el genoma nuclear (NUMTs, por sus siglas en inglés). Dichos genes resultan de la translocación de secuencias del genoma mitocondrial en el genoma nuclear (Bensasson *et al.* 2001). Este fenómeno ha sido reportado en *Pteronura brasiliensis* y *Galictis vittata*, donde se encontraron bandas inespecíficas de gran tamaño asociadas a la región control del ADNmt (*D-Loop*; Correal 2003). Al igual que en el presente trabajo, dicha inespecificidad se redujo aumentando la temperatura de la PCR y disminuyendo la concentración de ADN utilizado.

El análisis filogenético realizado a partir de las muestras obtenidas en este trabajo junto con las secuencias de Brasil disponibles en la base de datos de GenBank, no permitió determinar la existencia de clados divergentes entre ambos países. Esto concuerda con lo encontrado por Bornholdt (2012) y Bontempo *et al.* (2020), quienes no pudieron identificar un quiebre filogeográfico definido.

Bornholdt (2012) utilizando los marcadores mitocondriales, región control y ND5, reportó un nivel moderado de diversidad nucleotídica y una diversidad haplotípica alta en comparación con otros mustélidos sudamericanos, además los análisis de inferencia bayesiana le permitieron identificar dos clados, un grupo cuyo origen fue la región sur de Brasil y otro grupo que abarcaba individuos del sur, así como del centro y sureste de Brasil y Argentina. Conclusiones similares fueron alcanzadas por Bontempo *et al.* (2020) en el sureste de Brasil, quienes mediante el uso del marcador mitocondrial *Citocromo b*, encontraron individuos con una diversidad nucleotídica baja y una diversidad haplotípica alta, sin estructuración poblacional. Lo que muestra que aún con el uso de distintos marcadores, los resultados obtenidos para la especie fueron similares en ambos estudios. En contraste, los individuos muestreados en el presente trabajo exhibieron una baja diversidad tanto nucleotídica como haplotípica, para el marcador ND5 configurando un patrón mucho más simple, dominado por un haplotipo común (H1), a partir del cual ha surgido (mediante un único paso mutacional) el nuevo haplotipo identificado (H2), en la localidad de Maracó, La Pampa.

La red haplotípica obtenida, reveló un patrón interesante de relaciones, con un haplotipo central que pertenece al sur de Brasil, con todos los haplotipos del sudeste

de Brasil y el principal haplotipo de Argentina diferenciándose entre sí por un único paso mutacional. La estructura característica, en forma de estrella, podría indicar una expansión poblacional reciente de la especie. Esto sustenta lo reportado en publicaciones previas de la especie, en las cuales se sugiere una mayor antigüedad para los linajes del sur de Brasil, una expansión poblacional en linajes del sudeste brasileño, y un origen reciente para los linajes argentinos (Bornholdt 2012, Bontempo *et al.* 2020). Debido a la baja variabilidad presente en Argentina y dado que se ha documentado con anterioridad de una baja diversidad del ADNmt en carnívoros que presentan una rápida expansión, como por ejemplo en el chacal dorado (*Canis aureus*; Fabbri *et al.* 2014), la garduña (*Martes foina*; Vergara *et al.* 2015) y el zorro colorado (*Lycalopex culpaeus*; Tchaicka *et al.* 2016), se podría pensar en un origen reciente para estos linajes de haplotipos, seguido de una rápida expansión.

El hecho de que tanto Brasil como Argentina no compartan haplotipos podría constituir un indicio de la ausencia de flujo genético matrilineal histórico entre estas regiones. Si se tiene en cuenta la actual clasificación y distribución de subespecies de *G. cuja*, los haplotipos H1 y H2 pertenecerían a *G. c. huronax* y los haplotipos de Brasil (H3 a H7) a *G. c. furax*. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario un muestreo más exhaustivo en el Noreste de Argentina e idealmente incluir otros marcadores moleculares mitocondriales.

Si comparamos la diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (P_i) encontrada en otros mustélidos sudamericanos, tales como el lobito de río (*Lontra longicaudis*; $H_d=0,819$, $P_i=0,0039/0,0067$; Trinca *et al.* 2007), el chungungo (*Lontra felina*; $H_d=0,93$, $P_i=0,005$; Vianna *et al.* 2010), el huillín (*Lontra provocax*; $H_d=0,44/0,71$, $P_i=0,13/0,16$; Centrón *et al.* 2008), y la tayra (*Eira barbara*; $H_d=0,972$, $P_i=0,0661$; Ruíz-García *et al.* 2013), vemos que la diversidad de *G. cuja* en el área de estudio es muy baja. Por lo que la historia evolutiva de *G. cuja* en la región parece ser un caso diferente a lo observado en otras especies de la familia.

El ADN mitocondrial ha demostrado ser una poderosa herramienta para estudios genealógicos y evolutivos de poblaciones animales, aunque posee ciertas limitaciones, que podrían simplificar las relaciones evolutivas o subestimar la diversidad genética (Zhang y Hewitt, 2003). Tal como menciona Moritz (1994), ante la falta de cualquier

relación teórica o empírica entre la diversidad y la aptitud del ADNmt y la falta de evidencia de una fuerte correlación entre la diversidad del ADNmt y la diversidad en el genoma nuclear, el uso de este tipo de marcador, tiene una aplicación relativamente débil en determinar la pérdida de variabilidad genómica y si esta se traduce a una reducción de la aptitud individual.

Sin embargo, resulta llamativa la baja variabilidad hallada para la región de estudio, la cual no puede atribuirse a una propiedad intrínseca del marcador dados los valores alcanzados en los muestreos realizados en Brasil. Por esta razón, con la información disponible, no podemos descartar la hipótesis planteada de que la baja diversidad genética de *G. cuja* está siendo afectada por la acción del hombre en la región. Es sabido que la pérdida y la fragmentación del hábitat, conllevan procesos como la deriva génica que pueden causar pérdidas de variabilidad genética en las poblaciones (Gurrutxaga y Lozano Valencia 2006), sin embargo, estos procesos no determinan por sí solos la estructura genética de la población, sino que también van a depender de los rasgos biológicos específicos de cada especie (Wereszczuk *et al.* 2017). También, como se mencionó con anterioridad, esta baja diversidad genética puede ser el resultado de una expansión reciente de la especie.

La adición de marcadores mitocondriales y la ampliación del área de muestreo, podrían complementar los resultados obtenidos en este estudio para así dilucidar los procesos históricos y evolutivos, que actúan o han actuado, durante la expansión y diversificación de la especie. A su vez la adición de marcadores nucleares hipervariables constituirá un insumo de gran importancia para determinar la estructura y dinámica de la población y poder cuantificar adecuadamente el efecto de la actividad antrópica sobre la especie.

7. Bibliografía

Abrámoff, MD; Magalhães, PJ; Ram, SJ. 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics International* 11(7):36-41.

Amarilla-Stevens, HN; Stevens, RD; Phillips, CD; Bradley, RD. 2023. Temporal rate of postmortem DNA degradation in archived tissue samples: evidence from liver and muscle. *Journal of Mammalogy* 104(1):194-202.

Anderson, S. 1997 Mammals of Bolivia: taxonomy and distribution. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 231:1-652.

Aprile, G; Cirignoli, S; Varela, D; Lucherini, M; D'Agostino, R; Schiaffini, MI; Reppucci, JI; Ercoli, MD. 2019. *Galictis cuja* (en línea). En: SAyDS–SAREM (eds.) Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Argentina, SAyDS y SAREM. Consultado 29 abr. 2021. Disponible en <http://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/galictis-cuja>.

Arbogast, BS; Kenagy, GJ. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28(7): 819-825.

Avise, JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1):3-15.

Avise, JC; Arnold, J; Ball, RM; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, JE; Reeb, CA; Saunders, NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*. 18(1):489-522.

Bandelt, HJ; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37-48.

Bensasson, D; Zhang, DX; Hartl, DL; Hewitt, GM. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 16(6):314-321.

Bontempo, J; Bueno, C; D'Andrea, PS; Bonvicino, CR. 2020. Genetic diversity and chromosome complement of *Galictis cuja* (Molina, 1782) (Carnivora: Mustelidae)

with comments about its role as parasite hosts. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais* 15(3):717-726.

Bornholdt, R. 2012. Revisão do gênero *Galictis* (Mammalia, Carnivora, Mustelidae) utilizando métodos morfológicos e moleculares. Tesis de doctorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Bornholdt, R; Helgen, K; Koepfli, KP; Oliveira, L; Lucherini, M; Eizirik, E. 2013. Taxonomic revision of the genus *Galictis* (Carnivora: Mustelidae): species delimitation, morphological diagnosis, and refined mapping of geographical distribution. *Zoological Journal of the Linnean Society* 167(3):449-472.

Brandizi, LD. 2013. Los recursos hídricos en la región pampeana: la predictibilidad climática de la lluvia y de la disponibilidad hidrológica. Tesis de posgrado. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Brown, WM. 1985. The mitochondrial genome of animals. En: MacIntyre, RJ. (ed.), *Molecular Evolutionary Biology*. Cornell University Press, New York, USA.

Brown, A; Martinez Ortiz, U; Acerbo, M; Corcuera, J. 2006. La Situación Ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre.

Brown, WM; Prager, EM; Wang, A; Wilson, AC. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18(4):225-239.

Buesching, CD; Stankowich, T. 2017. Communication amongst the musteloids: signs, signals, and cues. En: David W. Macdonald, DW; Newman, C; Harrington, LA. (Eds.), *Biology and Conservation of Musteloids*. Wildlife Conservation Research Unit, Department of Zoology, University of Oxford, U.K.

Cabrera, A. 1958. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* 4(1):1-307.

Campos, CB; Esteves, CF; Ferraz, KMPMB; Crawshaw Junior, PG; Verdade, LM. 2007. Diet of free-ranging cats and dogs in a suburban and rural environment, south-eastern Brazil. *Journal of Zoology* 273(1):14-20.

Carrera, M; Nabte, MJ; Udrizar-Sauthier, DE. 2012. Distribución geográfica, historia natural y conservación del hurón menor *Galictis cuja* (Carnivora: Mustelidae) en la Patagonia central, Argentina. *Revista mexicana de biodiversidad* 83(4):1252-1257.

Castro, JA; Picornell, A; Ramon, M. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International Microbiology* 1(4):327-332.

Cavero, T; Rabasco, C; Molero, A; Blázquez, A; Hernández, E; Martín, MA; Praga, M. 2015. ¿Cuándo debe sospechar un nefrólogo una enfermedad mitocondrial? 35(1), 6-17. Madrid, ESP, Nefrología. Consultado 23 de nov. 2023.

Centrón, D; Ramirez, B; Fasola, L; Macdonald, DW; Chehébar, C; Schiavini, A; Cassini, MH. 2008. Diversity of mtDNA in southern river otter (*Lontra provocax*) from Argentinean Patagonia. *Journal of Heredity* 99(2):198-201.

Cione, AL; Tonni, EP. 1995. Chronostratigraphy and “Land-Mammal Ages” in the cenozoic of southern South America: principles, practices, and the “Uquian” problem. *Journal of Paleontology* 69:135-159.

Coba-Males, MA; Medrano-Vizcaíno, P; Enríquez, S; Brito-Zapata, D; Martín-Solano, S; Ocaña-Mayorga, S; Carrillo-Bilbao, GA; Narváez, W; Salas, JA; Arrivillaga-Henríquez, J; González-Suárez, M; Poveda, A. 2023. From roads to biobanks: Roadkill animals as a valuable source of genetic data. *Plos one*, 18(12), e0290836.

Coelho, IP; Kindel, A; Coelho, AVP. 2008. Roadkills of vertebrate species on two highways through the Atlantic Forest Biosphere Reserve, southern Brazil. *European Journal of Wildlife Research* 54(4):689-699.

Correal, MF. 2003. Establecimiento de las relaciones filogenéticas de la nutria gigante de río; *Pteronura Brasiliensis*, la taira; *Eira Barbara*, y el hurón; *Galictis Vittata* y otros mamíferos basados en la secuencia parcial del gen 12S rRNA y la región control D-Loop del DNA mitocondrial. Tesis de grado. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

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

Delibes, M; Travaini, A; Zapata, SC; Palomares, F. 2003. Alien mammals and the trophic position of the lesser grison (*Galictis cuja*) in Argentinean Patagonia. *Canadian Journal of Zoology* 81(1):157-162.

Diuk-Wasser, MA; Cassini, MH. 1998. A study on the diet of minor grisons and a preliminary analysis of their role in the control of rabbits in Patagonia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 33(1):3-6.

Drummond, AJ; Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7(1):1-8.

Ebensperger, LA; Mella, JE; Simonetti, JA. 1991. Trophic-niche relationships among *Galictis cuja*, *Dusicyon culpaeus*, and *Tyto alba* in central Chile. *Journal of Mammalogy* 72(4):820-823.

Ercoli, MD; Echarri, S; Busker, F; Álvarez, A; Morales, MM; Turazzini, GF. 2012. The functional and phylogenetic implications of the myology of the lumbar region, tail, and hind limbs of the lesser grison (*Galictis cuja*). *Journal of Mammalian Evolution* 20(4):309-336.

Ercoli, MD; Álvarez, A; Busker, F; Morales, MM; Julik, E; Smith, HF; Adrian, B; Barton, M; Bhagavatula, K; Poole, M. 2016. Myology of the head, neck, and thoracic region of the lesser grison (*Galictis cuja*) in comparison with the red panda (*Ailurus fulgens*) and other carnivorans: phylogenetic and functional implications. *Journal of Mammalian Evolution* 24(3):289-322.

Fabbri, E; Caniglia, R; Galov, A; Arbanasić, H; Lapini, L; Bošković, I; Florijančić, T; Vlasseva, A; Ahmed, A; Mirchev, RL; Randi, E. 2014. Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). *Conservation genetics* 15: 187-199.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-791.

Ferguson, SW; Higdon, J; Larivière, S. 2006. Does seasonality explain the evolution and maintenance of delayed implantation in the family Mustelidae (Mammalia: Carnivora). *Oikos*. 114(2):249-256.

Ferreira, JLP; Rodrigues, NLA; Silva, CMA; Uchôa, JS; dos Santos, FGP; de Andrade, EB. 2022. Primeiro registro documentado do furão-pequeno *Galictis cuja* (Molina, 1782) no estado do Piauí, Nordeste do Brasil. *Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza*. 6(3).

Frankham R; Ballou JD; Briscoe DA. 2010. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Gurrutxaga San Vicente, M; Lozano Valencia, PJ. 2006. Efectos de la fragmentación de hábitats y pérdida de conectividad ecológica dentro de la dinámica territorial. *Polígonos*. 16:36-54.

González, S. 2005. Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. *Agrociencia* 9(1):545-550.

Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0. 0 (en línea). Consultado 29 may. 2021. website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

Hatefi, Y; Galante, YM; Stiggall, DL; Ragan, CI. 1979. Proteins, polypeptides, prosthetic groups, and enzymic properties of complexes I, II, III, IV, and V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. In *Methods in Enzymology*. Academic Press 53(56):577-602.

Hedrick, PW. 2005. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Learning, Sudbury, USA.

Helgen, K; Schiaffini, M. 2016. *Galictis cuja*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016.

Jaksić, FM. 1989. Opportunism vs selectivity among carnivorous predators that eat mammalian prey: a statistical test of hypotheses. *Oikos* 427-430.

Kasper, CB; Bornholdt, R; Pontes, ARM; de Mello, B; Leuchtenberger, C. 2013. Avaliação do risco de extinção do furão *Galictis cuja* (Molina, 1782) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3(1):203-210.

King, CM; Powell, RA. 2006. The natural history of weasels and stoats: ecology, behavior, and management. Oxford University Press, Oxford, UK.

Klippel, AH; Oliveira, PV; Britto, KB; Freire, BF; Moreno, MR; Dos Santos, AR; Banhos, A; Paneto, GG. 2015. Using DNA barcodes to identify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. *Plos one*. 10(8).

Knowles, LL. 2009. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40(1):593-612.

Koepfli, KP; Deere, K; Slater, GJ; Begg, C; Begg, K; Grassman, L; Lucherini, M; Veron, G; Wayne, RK. 2008. Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Biology* 6(10).

Kollias, GV; Fernandez-Moran, J. 2015. Mustelidae. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* 8:476-91.

Kommers, GD; Ilha, MRDS; Barros, CSLD. 1999. Diocofimose em cães: 16 casos. *Ciência Rural*. 29(3):517-522.

Kraus, C; Rödel, HG. 2004. Where have all the cavies gone? Causes and consequences of predation by the minor grison on a wild cavy population. *Oikos*. 105(3):489-500.

Kumar, S; Stecher, G; Li, M; Knyaz, C; Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547.

Lanteri, A; Confalonieri, VA. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Morrone, JJ; Llorente Bousquets, J. (Eds.), Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. UNAM, Distrito Federal, Mexico.

Larivière, S; Jennings AP. 2009. Familia Mustelidae (comadreja y parientes). En: Wilson, DE; Mittermeier, RA (Eds.), Manual de los Mamíferos del Mundo. Lynx Ediciones, Barcelona, España.

Librado, P; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451-1452.

Leigh, JW; Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110–1116.

Loyola, RD; De Oliveira, G; Diniz-Filho, JAF; Lewinsohn, TM. 2008. Conservation of Neotropical carnivores under different prioritization scenarios: mapping species traits to minimize conservation conflicts. *Diversity and Distributions* 14(6):949-960.

Mares, M; Bárquez, R; Braun, J; Ojeda, R. 1996. Observations on the mammals of Tucuman province, Argentina: systematics, distribution, and ecology of the Didelphimorphia, Xenarthra, Ceiroptera, Primates, Carnivora, Perissodactyla, Artiodactyla, and Lagomorpha. *Annals of Carnegie Museum* 65(2):89-152.

Mares, MA; Willig, MR; Streilein, KE; Lacher Junior, TE. 1981. The mammals of Northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Annals of Carnegie Museum of Natural History* 50:81-137.

Michaud, CL; Foran, DR. 2011. Simplified field preservation of tissues for subsequent DNA analyses. *Journal of forensic sciences* 56(4):846-852.

Migliorini, RP; Fornel, R; Kasper, CB. 2020. Geographic variation in the skull morphology of the lesser grison (*Galictis cuja*: Carnivora, Mustelidae) from two Brazilian ecoregions. *PeerJ* 8.

Molbert, N; Ghanavi, HR; Johansson, T; Mostadius, M; Hansson, MC. 2023. An evaluation of DNA extraction methods on historical and roadkill mammalian specimen. *Scientific Reports* 13(1).

Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3(4):401-411.

Nardelli, M; Túnez, J; Centrón, D; Cassini, M. 2011. Non-invasive sampling techniques applied to the genetic study of mammals. *Interciencia* 36(6).

Nascimento, FOD. 2014. On the correct name for some subfamilies of Mustelidae (Mammalia, Carnivora). *Papéis Avulsos de Zoologia* 54:307-313.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.

Oliveira, TD. 2009. Notes on the distribution, status, and research priorities of little-known small carnivores in Brazil. *Small Carnivore Conservation*. 41:22-24.

Pääbo, S; Poinar, H; Serre, D; Jaenicke-Després, V; Hebler, J; Rohland, N; Kuch, M; Krause, J; Vigilant, L; Hofreiter, M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*. 38:645-679.

Pace, ML; Cole, JJ; Carpenter, SR; Kitchell, JF. 1999. Cascadas tróficas reveladas en diversos ecosistemas. *Tendencias en Ecología y Evolución* 14(12):483-488.

Pasa, JB; Hegel, CGZ; Zanella, N. 2020. What are you eating? Stomach contents of roadkilled mammals of northern Rio Grande do Sul. *Oecologia Australis* 24(3):704-713.

Pinto, FA; Bager, A; Cerqueira, R; Milagres, A; Morais, B; Silva, P; Castro, E; Medici, E; Desbiez, A; Tortato, F; Concione, H. 2022. Diagnóstico do atropelamento de mamíferos silvestres em estradas na bacia do alto Paraguai. *Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais* 16(3):441-458.

Pires, NC. 2018. Dieta e padrão de atividade do furão-pequeno *Galictis cuja* (Carnivora: Mustelidae). Tesis de Licenciatura, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Poo-Muñoz, DA; Escobar, LE; Peterson, AT; Astorga, F; Organ, JF; Medina-Vogel, G. 2014. *Galictis cuja* (Mammalia): an update of current knowledge and geographic distribution. *Iheringia*. 341-346 p. (Série Zoologia, v. 104).

Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253-1256.

Prevosti, FJ; Soibelzon, LH. 2012. Evolution of the South American carnivores (Mammalia, Carnivora): a paleontological perspective. En: Patterson, BD; Costa, LP (Eds), Bones, clones, and biomes: an extended history of recent Neotropical mammals. The University of Chicago Press, Chicago, USA.

Prevosti, FJ; Travaini, A. 2005. New records of *Galictis cuja* (Molina, 1782) (Carnivora, Mustelidae) in Southern Patagonia. *Mammalian Biology* 70(5):317-320.

Redford, KH; Eisenberg, JF. 1992. Mammals of the Neotropics the southern cone: Chile, Argentina, Uruguay and Paraguay. The University of Chicago Press, Chicago and London.

Rocha-Mendes, F; Mikich, SB; Quadros, J; Pedro, WA. 2010. Feeding ecology of carnivores (Mammalia, Carnivora) in Atlantic forest remnants, southern Brazil. *Biota Neotropica* 10:21-30.

Ruiz-García, M; Lichilín-Ortiz, N; Jaramillo, MF; Ruíz-García, M; Shostell, JM. 2013. Molecular phylogenetics of two Neotropical carnivores, *Potos flavus* (Procyonidae) and *Eira barbara* (Mustelidae): No clear existence of putative morphological subspecies. En: Ruiz-García, M; Shostell, JM (Eds.), Molecular population genetics, evolutionary biology, and biological conservation of Neotropical carnivores. Nova Science Publishers Inc., New York, USA.

Sade, S; Rau, JR; Orellana, JI. 2012. Dieta del quique (*Galictis cuja* Molina 1782) en un remanente de bosque valdiviano fragmentado del sur de Chile. *Gayana, Concepción* 76(2):112-116.

Sambrook, J; Russell, DW. 2006. Rapid isolation of yeast DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006 (1).

Sato, JJ; Hosoda, T; Wolsan, M; Tsuchiya, K; Yamamoto, M; Suzuki, H. 2003. Phylogenetic relationships and divergence times among mustelids (Mammalia: Carnivora) based on nucleotide sequences of the nuclear interphotoreceptor retinoid binding protein and mitochondrial cytochrome b genes. *Zoological Science* 20(2):243-264.

Sato, JJ; Wolsan, M; Prevosti, FJ; D'Elía, G; Begg, C; Begg, K; Hosoda, T; Campbell, KL; Suzuki, H. 2012. Evolutionary and biogeographic history of weasel-like carnivorans (Musteloidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63(3):745-757.

Schiaffini, MI. 2017. Niche overlap and shared distributional patterns between two South American small carnivorans: *Galictis cuja* and *Lyncodon patagonicus* (Carnivora: Mustelidae). *Mammalia* 81(5):455-463.

Schiaffini, MI. 2022. Distribution patterns of South American mustelids (Carnivora: Mustelidae). *Journal of Mammalogy* 103(4):900-919.

Schiaffini, MI; Prevosti, FJ. 2014. Trophic segregation of small carnivorans (Carnivora: Mustelidae and Mephitidae) from the southern cone of South America. *Journal of Mammalian Evolution* 21:407-416.

Schmitt, A; Favretto, MA. 2021. Registro de frugivoria em furão-pequeno (*Galictis cuja*) no Brasil: Frugivoria por *Galictis cuja*. *Revista Acta Ambiental Catarinense*. 18(1):129-133.

Tchaicka, L; Freitas, TRO; Bager, A; Vidal, SL; Lucherini, M; Iriarte, A; Novaro, A; Geffen, E; Garcez, FS; Johnson, WE; Wayne, RK; Eizirik, E. 2016. Molecular assessment of the phylogeny and biogeography of a recently diversified endemic group of South American canids (Mammalia: Carnivora: Canidae). *Genetics and Molecular Biology* 39(3):442-451.

Taylor, PD; Fahrig, L; Henein, K; Merriam, G. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68:571-572.

Tellaache, CG; Reppucci, JI; Vidal, EML; Lucherini, M. 2014. New data on the distribution and natural history of the lesser grison (*Galictis cuja*), hog-nosed skunk (*Conepatus chinga*), and culpeo (*Lycalopex culpaeus*) in northwestern Argentina. *Mammalia* 78(2):261-266.

Trigo, TC; Freitas, TRO; Kunzler, G; Cardoso, L; Silva, JCR; Johnson, W E; O'Brien, SJ; Bonatto, SL; Eizirik, E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology* 17(19):4317-4333.

Trinca, CS; Waldemarin, HF; Eizirik, E. 2007. Diversidad genética de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis* Olfers, 1818) en el sur y sureste de Brasil. *Revista Brasileña de Biología* 67:813-818.

Twort, VG; Minet, J; Wheat, CW; Wahlberg, N. 2021. Museomics of a rare taxon: placing Whalleyanidae in the Lepidoptera Tree of Life. *Systematic Entomology* 46(4):926-937.

Yu, L; Peng, D; Liu, J; Luan, P; Liang, L; Lee, C; Lee, M; Ryder, OA; Zhang, Y. 2011. On the phylogeny of Mustelidae subfamilies: analysis of seventeen nuclear non-coding loci and mitochondrial complete genomes. *BMC Evolutionary Biology* 11:1-16.

Valqui, J; Hartl, GB; Zachos, FE. 2010. El análisis genético no invasivo revela altos niveles de variabilidad del ADNmt en la nutria marina sudamericana (*Lontra felina*), en peligro de extinción. *Genética de la Conservación* 11:2067-2072.

Vergara, M; Basto, MP; Madeira, MJ; Gomez-Moliner, BJ; Santos-Reis, M; Fernandes, C; Ruiz-Gonzalez, A. 2015. Inferring population genetic structure in widely and continuously distributed carnivores: the stone marten (*Martes foina*) as a case study. *PloS one*. 10(7).

Wandeler, P; Hoeck, PEA; Keller, L. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 22:634–642

Wereszczuk, A; Leblois, R; Zalewski, A. 2017. Genetic diversity and structure related to expansion history and habitat isolation: stone marten populating rural–urban habitats. *BMC Ecology* 17:1-16.

Woodburne, MO. 2010. The Great American Biotic Interchange: dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. *Journal of Mammalian Evolution* 17:245-264.

Wozencraft WC. 2005. Order Carnivora. En: Wilson, DE; Reeder, DM. (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, Vol. 1. John Hopkins University Press, Baltimore, USA.

Yensen, E; Tarifa, T. 2003. *Galictis cuja*. *Mammalian Species* (728):1-8.

Zapata, SC; Travaini, A; Delibes, M; Martínez-Peck, R. 2005. Annual food habits of the lesser grison (*Galictis cuja*) at the southern limit of its range. *Mammalia* 69(1):85-88.

Zapata, SC; Travaini, A; Delibes, M; Martínez-Peck, R. 2008. Identificación de morfogramas como aproximación al estudio de reparto de recursos en ensambles de carnívoros terrestres. *Mastozoología Neotropical* 15(1):85-101.

Zhang, DX; Hewitt, GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12(3):563-584.

Zúñiga, A; Muñoz-Pedreras, A; Fierro, A. 2009. Uso de hábitat de cuatro carnívoros terrestres en el sur de Chile. *Gayana* 73:200-210.

8. Resumen

El hurón menor, *Galictis cuja* (Molina 1782), es un mustélido endémico de Sudamérica, que se distribuye desde el sur de Perú hasta el sur de la Patagonia en Argentina y Chile, abarcando una amplia variedad de hábitats. En la actualidad, *G. cuja* está categorizado a nivel nacional como “Preocupación Menor”, debido a la amplia distribución de la especie en el país. Sin embargo, en la región central de nuestro país donde se concentra la mayor densidad de la población humana, la persecución por parte del hombre y la pérdida y fragmentación de los hábitats, podrían estar afectando su estado de conservación.

En el presente trabajo se realizó una primera caracterización de la variabilidad genética del hurón menor en la Región Pampeana y se compararon los resultados obtenidos con los previamente publicados para la especie, mediante el uso del marcador mitocondrial ND5.

A partir del análisis de 46 muestras de tejido provenientes de animales atropellados o capturados (con fines científicos) se obtuvo un total de 21 secuencias de 640pb de longitud, identificándose un sitio polimórfico y dos haplotipos (uno no registrado previamente en la bibliografía). Los análisis mostraron una baja variabilidad genética de *G. cuja* en la región de estudio, en comparación a la encontrada en Brasil. Dichos resultados podrían atribuirse tanto a la fuerte presión antrópica presente en la región, y/o al origen reciente de dichas poblaciones en nuestro país.

Con el fin de profundizar estas hipótesis, se propone llevar a cabo nuevos estudios filogenéticos, incluyendo una mayor cantidad de muestras que amplíen el área de estudio y marcadores adicionales. Finalmente, el uso de marcadores moleculares hipervariables, además de complementar los resultados obtenidos permitirán dilucidar la variabilidad y la estructura genética de la especie a una escala geográfica más fina.

9. Anexos

Anexo 1. La tabla muestra el número de identificación de las muestras y la variante haplotípica encontrada. *Extracción de ADN no exitosa.

ID	Haplotipo
1	H1
2	*
3	H1
4	*
5	*
6	*
7	*
8	*
9	*
10	*
11	*
12	*
13	H1
14	H1
15	*
16	*
17	H1
18	H1
19	H1

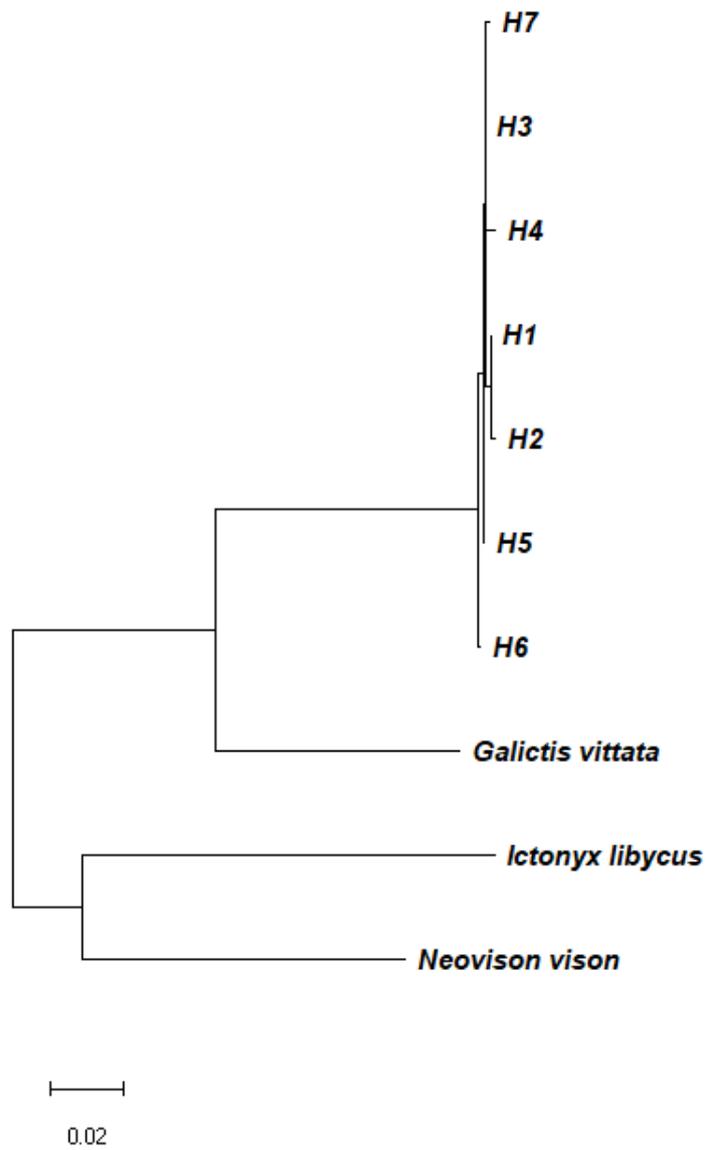
20	H1
21	*
22	*
23	*
24	H1
25	H1
26	H1
27	H1
28	*
29	*
30	*
31	*
32	H1
33	H1
34	H1
35	H2
36	H1
37	H1
38	*
39	H1
40	H1
41	*
42	H1

43	*
44	*
45	*
46	*

Anexo 2. Secuencias de *Galictis cuja* extraídas de GenBank. Se muestran ID de la mismas, variante del haplotipo asignada en el presente trabajo, localidad, país, y coordenadas geográficas de los sitios de colecta.

ID GenBank	Variante haplotípica	País	Localidad	Latitud	Longitud
JX570686.1	H1	Argentina	Tornquist	-38,05	-62,01
JX570690.1	H3	Brasil	Curvelo	-18,95	-44,56
JX570689.1	H4	Brasil	Conchas	-23,02	-48,07
JX570688.1	H5	Brasil	Curitiba	-25,42	-49,25
JX570687.1	H6	Brasil	Pelotas	-31,77	-52,32
JX570691.1	H7	Brasil	Morro do Chapéu	-11,41	-41,28

Anexo 4. Árbol filogenético resultante del análisis del vecino más cercano a partir de los haplotipos de *Galictis cuja* obtenidos con el marcador ND5 y los disponibles en la base de datos GenBank. Como grupos externos se utilizaron secuencias de *Galictis vittata*, *Ictonyx ilbicus* y *Neovison vison*.



Anexo 4. En la tabla se indica la especie y el ID de GenBank de las secuencias utilizadas como *outgroup* en los análisis filogenéticos.

Especie	ID GenBank
<i>Galictis vittata</i>	JX570694.1
<i>Ictonyx ilbicus</i>	ON584176.1
<i>Neovison vison</i>	KM488625.1