

TESIS DOCTORAL

**Estudios filogeográficos en
Dasypodidae (Mammalia,
Xenarthra) de Argentina:
Chaetophractus villosus y
Chaetophractus vellerosus como
modelos de análisis**

Lic. Sebastián Poljak

Director : Dra. Marta Lizarralde

Codirector: Lic. Alfredo Carlini

Universidad Nacional de La Plata

Marzo de 2009

ÍNDICE

CAPÍTULO I: Introducción

RESUMEN	1
1.1. Grupo de estudio: el orden, la familia, el género	
1.1.1. El orden Xenarthra	9
1.1.2. La familia Dasypodidae	12
1.1.3. El género <i>Chaetophractus</i>	13
1.1.3.1. El peludo <i>Chaetophractus villosus</i>	14
1.1.3.2. El pichi llorón <i>Chaetophractus vellerosus</i>	15
1.2. El ADN mitocondrial de mamíferos	
1.2.1. La Región Control como marcador molecular. Elementos estructurales en la secuencia	20
1.3. La filogeografía	
1.3.1. Definición y aplicaciones	24
1.3.2. Teoría de la Coalescencia	26
1.3.3. Análisis de Clados Anidados (<i>Nested Clade Analysis</i>) o NCA	28
1.4. Evolución geológica y paleoclimática del sur de Sudamérica durante los últimos 5 Ma.	
1.4.1. Los últimos 5 Ma	32
1.4.1.1. Plioceno	33
1.4.1.1.1. <i>El Plioceno en Argentina</i>	35
1.4.1.2. Pleistoceno	37
1.4.1.2.1. <i>Las glaciaciones pleistocenas en Patagonia</i>	41
1.4.1.3. Holoceno	43
1.4.1.3.1. <i>Temprano (11000 – 8000 años AP)</i>	44
1.4.1.3.2. <i>Medio (8000 – 4000 años AP)</i>	45
1.4.1.3.3. <i>Tardío (4000- actualidad)</i>	49

1.5. Objetivos e hipótesis de trabajo	52
--	----

APÉNDICE:

La población de <i>Chaetophractus villosus</i> introducida en Tierra del Fuego	55
Reseña de las introducciones en el archipiélago de Tierra del Fuego	56
Fisonomía y clima de la región	58
Aspectos ecológicos de <i>Chaetophractus villosus</i> en Tierra del Fuego	60
Consideraciones finales	66

CAPÍTULO II: Materiales y Métodos

2.1. Procedencia de los especímenes	69
2.2. Muestras, recolección y conservación	70
2.3. Extracción de ADN	73
2.3.1. A partir de muestras de tejido	
2.3.2. A partir de muestras de sangre	
2.4. Control de calidad y cuantificación del ADN extraído	77
2.5. Amplificación por PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	78
2.6. Secuenciación del fragmento de ADN de la Región Control	79
2.7. Análisis de las secuencias	82
2.7.1. Índices de diversidad molecular	82
2.7.2. Detección de procesos demográficos	82
2.7.2.1. Test de Tajima	83
2.7.2.2. Test de Fu	83
2.7.2.3. Distribución de las diferencias entre secuencias tomadas de a pares (<i>mismatch distribution</i>)	84
2.7.3. Red de haplotipos utilizando median-joinig	85
2.8. Análisis filogeográfico	86
2.9. Comparación estructural de las secuencias con las de otros Órdenes de mamíferos	88

APÉNDICE

I Soluciones	92
--------------	----

II Muestras	94
-------------	----

CAPÍTULO III: Resultados

3.1. <i>Chaetophractus villosus</i>	100
3.1.1. Muestreo	100
3.1.2. Variabilidad de las secuencias	103
3.1.3. Demografía y red de haplotipos median-joining (MJ)	105
3.1.3.1. Distribución de las diferencias entre secuencias	105
3.1.3.2. Tests de neutralidad	107
3.1.3.3. Red de haplotipos utilizando median-joining	107
3.1.4. Análisis filogeográfico	108
3.2. <i>Chaetophractus vellerosus</i>	114
3.2.1. Muestreo	114
3.2.2. Variabilidad de las secuencias	114
3.2.3. Demografía y red de haplotipos median-joining (MJ)	118
3.2.3.1. Distribución de las diferencias entre secuencias	118
3.2.3.2. Tests de neutralidad	118
3.2.3.3. Red de haplotipos utilizando median-joining	120
3.2.4. Análisis filogeográfico	120
3.3. Características estructurales de la Región Control de <i>Chaetophractus</i>. Comparación entre especies	123
3.3.1. Posición de las mutaciones y diferencias entre especies	123
3.3.2. Composición de los Dominios y elementos ETAS	125
ANEXO	
I Alineamientos de las secuencias de <i>Chaetophractus villosus</i>	130
II Alineamientos de las secuencias de	140
III Diferencias entre especies	144

CAPÍTULO IV: Discusión

4.1. Dinámica poblacional y filogeografía de <i>Chaetophractus villosus</i>	147
4.1.1. Filogeografía	148

4.1.2. Tests de neutralidad, distribución de las diferencias (<i>mismatch</i>) y red median-joining de haplotipos	155
4.1.2.1. Tests de neutralidad	156
4.1.2.2. Distribución de las diferencias (<i>mismatch</i>)	157
4.1.2.3. Red median-joining de haplotipos	159
4.2. Dinámica poblacional y filogeografía de <i>Chaetophractus vellerosus</i>	161
4.2.1. Filogeografía	162
4.2.2. Tests de neutralidad, distribución de las diferencias (<i>mismatch</i>) y red median-joining de haplotipos	165
4.2.2.1. Tests de neutralidad	165
4.2.2.2. Distribución de las diferencias (<i>mismatch</i>)	166
4.2.2.3. Red median-joining de haplotipos	167
4.2.3. Consideraciones paleobiogeográficas de la especie <i>Chaetophractus vellerosus</i>	167
4.3. Consideraciones paleobiogeográficas y filogenéticas del Género <i>Chaetophractus</i>	172
4.4. Características estructurales de la Región Control del género <i>Chaetophractus</i>. Comentarios finales	176
4.4.1. Dominio ETAS y elementos ETAS 1 y 2	178
4.4.2. Dominio Central	180

CAPÍTULO V: Conclusiones

5.1. <i>Chaetophractus villosus</i>	184
5.2. <i>Chaetophractus vellerosus</i>	185
5.3. Consideraciones finales sobre el registro fósil y paleobiogeografía de las especies estudiadas	187

CAPÍTULO VI: Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas	190
-----------------------------------	-----

RESUMEN

Los Xenarthra son uno de los grupos de mamíferos más peculiares y característicos de la Región Neotropical y han sido considerados representantes del stock inicial de mamíferos sudamericanos. Su evolución estuvo ligada a la historia geológica y paleoclimática de Sudamérica y aún existen muchos interrogantes en torno al origen y centros de dispersión de los linajes basales o ancestrales y su evolución.

La familia Dasypodidae es la más extensamente representada y reúne aproximadamente 20 especies de armadillos vivos, de las cuales 13 se encuentran presentes en Argentina incluyendo *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*.

La familia se distribuye desde el centro-sur de Estados Unidos de América hasta el Estrecho de Magallanes. En particular, el peludo lo hace desde el Gran Chaco de Bolivia y Paraguay hasta el norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego (donde fue introducido hace unos 25 años), lo que es una prueba de su plasticidad adaptativa. En ese sentido, no sería el clima un factor determinante para su distribución austral. El pichi llorón se distribuye desde el sudeste de Bolivia y noroeste de Paraguay hasta el centro de Argentina y no se extendería más al sur de las provincias de La Pampa y Buenos Aires. En esta última, presenta una distribución disyunta con una separación de unos 400 a 500 km, dado que ocupa el oeste de la provincia y hacia el Este, una franja costera sobre la Bahía Samborombón. Esta disyunción es atribuida a cambios climáticos hacia condiciones más húmedas durante fines del Pleistoceno y parte del Holoceno.

Los armadillos poseen temperatura corporal y tasa metabólica basal bajas en relación a su masa y por ello la temperatura ambiente tiene una gran

incidencia sobre su termorregulación y sus hábitos de vida. Los marcados períodos o pulsos de enfriamiento mundial y los cambios en el nivel del mar afectaron el sur del continente americano, especialmente las condiciones climáticas, geológicas y ecológicas de la zona central de nuestro país, la Región Pampeana y Patagonia, lo que tuvo gran incidencia en las biotas.

En este trabajo de tesis se profundizó en forma inédita sobre la historia filogeográfica particular de dos especies de la familia Dasypodidae: *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*, en función de la variabilidad genética de las poblaciones en relación al contexto geográfico en el que habitan actualmente lo que reveló aspectos demográficos y de distribución del pasado.

Para ello se analizaron secuencias parciales de la Región Control de ADN mitocondrial principalmente a través de un Análisis de Clados Anidados. Se utilizaron 76 peludos colectados en 20 localidades a lo largo de Argentina y un hincapié especial fue puesto en las colectas de muestras en Tierra del Fuego para determinar la relación de la población allí introducida con las continentales. Por otro lado, se utilizaron secuencias de 30 pichis llorones provenientes de 6 puntos del país y, en este caso, un mayor esfuerzo fue puesto en el muestreo del reducto costero disyunto de la Bahía Samborombón.

Se persiguió inferir si las poblaciones muestran señales de estructuración genética y si existieron procesos históricos o recurrentes que pudieran explicar dicha estructuración para cotejarlos con la información acerca de la evolución climática cuaternaria y explicar la distribución actual de las secuencias de ADNmt. Además, hallar las áreas de distribución ancestral mas probables de las especies y que relación

guardan éstas con el registro fósil, los patrones de expansión de las especies a lo largo de su distribución y posibles causas de la distribución disyunta de *Chaetophractus vellerosus* para cotejarlas con hipótesis previas.

Hipótesis de trabajo: “Los individuos de las especies *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* se dispersaron hasta su distribución actual de acuerdo con la expansión de las zonas semidesérticas a desérticas e independientemente de los gradientes de temperatura”.

Como conclusiones para destacar en el caso de *Chaetophractus villosus* puede mencionarse que la población presenta un patrón general de expansión contigua del rango de distribución, que el área pre-expansiva de la especie se localiza en el centro de Argentina y que ésta es la zona donde se distribuye el linaje posiblemente más antiguo. Asimismo, que la expansión del rango de distribución de la especie ocurrió hacia el Este y el Noroeste en la Región Pampeana y fuertemente hacia el Sur, ocupando toda la Patagonia y Tierra del Fuego recientemente (en este último caso introducida por el hombre). Que dichos procesos de expansión en la Región Pampeana y la Patagonia no parecen haber sido simultáneos y que ésta especie presenta baja vagilidad.

En el caso de *Chaetophractus vellerosus*, el análisis de clados anidados reveló que el haplotipo ancestral proviene de la

zona de Tucumán y por la gran variabilidad hallada entre los individuos de dicha zona, ella parece una potencial candidata a ser (o en todo caso formar parte) del área de origen de la especie. La población del pichi llorón parece mostrar una expansión del rango de distribución desde su área central, hacia la costa bonaerense. Al menos parecen haber habido dos eventos de expansión de la población de *Chaetophractus vellerosus* que llegaron hasta el Este de la provincia de Buenos Aires, una hace unos 0,8 Ma y otra mucho más reciente, que dio lugar a la población que actualmente habita la zona. Esta última expansión probablemente fue una colonización a larga distancia muy reciente mediante unos pocos individuos (lo que constituye un cuello de botella) y es posible que haya llegado por el norte de la provincia de Buenos Aires, durante un período más árido, a través de una franja de espinal que llega hasta la Bahía Samborombón.

El cambio climático del Pleistoceno tardío – Holoceno temprano probablemente retrajo la distribución de la especie hacia el interior del actual territorio argentino y según todo lo antedicho, el pichi llorón es una especie que tiene la capacidad de expandir y retraer su distribución, como lo demuestra el registro fósil y la nula variabilidad que actualmente presenta la población de la costa bonaerense.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. GRUPO DE ESTUDIO: EL ORDEN, LA FAMILIA, EL
GÉNERO

1.1.1. El orden Xenarthra

Los Xenarthra son uno de los grupos de mamíferos más peculiares y característicos de la Región Neotropical. Su evolución seguramente estuvo ligada a la historia geológica de Sudamérica y han sido considerados representantes del stock inicial de mamíferos en dicho continente (Patterson y Pascual, 1972). Los estudios paleontológicos sobre el orden datan de mediados del S. XVIII cuando G. Cuvier (1758) describió el primer mamífero fósil de América del Sur, al que denominó *Megatherium americanum*. Durante el S. XIX y primera mitad del S. XX, se desarrollan más intensamente con los trabajos que conforman gran parte de la obra de G. Burmeister, F. Ameghino, L. Kraglievich y R. Hoffstetter, entre otros.

Basicamente, se reconoce que el grupo posee una serie de características de orden anatómico y fisiológico interpretadas como muy primitivas para los mamíferos euterios, al punto que se los ha considerado como una cohorte aparte: los Paratheria (Thomas, 1887; Carlini *et al.*, 1994 y bibliografía allí citada). De esta supuesta configuración primitiva, ya destacada por Ameghino (1906, 1908), se especuló que la presencia de los xenarthros en el registro fósil sudamericano debió haber sido muy temprana. Sin embargo, hasta el momento, las exploraciones realizadas en unidades portadoras de mamíferos del Cretácico-Paleoceno temprano-medio no han revelado la presencia de xenarthros y sí se presentan como un

grupo diverso y bien representado sólo a partir del Eoceno para los Cingulata y del Oligoceno para los Phyllophaga (Carlini *et al.* 2002 a,b,c, 2004 ; Carlini y Scillato Yané, 2004).

En los últimos años las colecciones se han enriquecido notablemente, se han precisado los datos de procedencia geográfica y estratigráfica, se han formalizado las diagnósis de muchos taxones y se han realizado análisis filogenéticos que llevaron a un mejor entendimiento de estos mamíferos (e.g. Gaudín, 1995, 2003; Carlini y Scillato Yané, 2004). Sin embargo, aún existen muchos interrogantes en torno al origen y evolución de los principales linajes del grupo. Esta incógnita se extiende tanto a sus centros de dispersión, como a cuál o cuáles fueron los linajes basales o ancestrales (Carlini y Scillato Yané, 2004). Particularmente, estas cuestiones resultan importantes para determinar el origen y comprender la evolución de las formas vivientes.

En la actualidad, el orden es considerado en sí mismo uno de los cuatro grandes clados de mamíferos placentarios. Sin embargo su origen y relaciones con los restantes Eutheria siguen siendo objeto de un debate aún no resuelto tanto desde un punto de vista anatómico y paleontológico (Rose y Emry, 1993; Carlini y Scillato Yané, 1996; Gaudin, 1998, 2004) como también desde otro evolutivo y molecular (Murphy *et al.*, 2001; Kriegs *et al.*, 2006; Nikolaev *et al.*, 2007).

La monofilia del orden clásica y tempranamente reconocida (McKenna y Bell, 1997), ha sido apoyada por caracteres

morfológicos (Engelmann, 1985; Patterson *et al.*, 1989, 1992; Rose y Emry, 1993; Gaudin, 1999) y moleculares, así como sus relaciones internas (de Jong *et al.*, 1985; van Dijk *et al.*, 1999; Delsuc *et al.*, 2001). A pesar de ello, algunas de estas relaciones se encuentran aún en discusión.

Xenarthra está compuesto por unas treinta especies vivientes, clasificadas en dos subórdenes: 1. Cingulata, representado por la familia Dasypodidae (armadillos) y 2. Pilosa, que comprende a Vermilingua, representado por la familia Myrmecophagidae (osos hormigueros y meleros) y Folivora, representado por las familias Bradypodidae (perezosos de tres dedos) y Megalonychidae (perezosos de dos dedos). Sin duda, esta diversidad específica es escasa si se considera que se han descrito más de cuatrocientas especies en el Cenozoico argentino (Scillato-Yané, 1980; Scillato-Yané *et al.*, 1995; Carlini y Scillato-Yané, 1999).

Históricamente, Xenarthra es endémico de América del Sur y Central, excepto por la reciente dispersión de *Dasypus novemcinctus* en el sur de América del Norte luego de la emergencia del Istmo de Panamá entre los 3 y 2,5 Ma (Plioceno tardío y aún antes, en el Mioceno, aunque fue un episodio breve).

La distribución actual del orden abarca desde el centro-sur y sudeste de Estados Unidos hasta el extremo sur de Sudamérica (Wetzel, 1985), incluyendo la Isla Grande de Tierra del Fuego dónde fue introducido años atrás (Poljak *et al.*, 2007).

A base de la sincronización entre eventos planetarios y biológicos, Delsuc *et al.* (2004) han sugerido que los cambios globales jugaron un rol crucial en la modelación de la historia evolutiva de los xenarthros actuales. Particularmente aquellos eventos que tuvieron lugar en Sudamérica.

Los marcados períodos o pulsos de enfriamiento mundial afectaron al sur del continente americano, y se desarrollaron especialmente sobre la Cordillera de Los Andes y la actual Patagonia, en el sur de Argentina. Estos eventos afectaron al clima de todo el continente y especialmente las condiciones climáticas, geológicas y ecológicas de la zona central de nuestro país, la denominada Región Pampeana o Pampas, durante el Pleistoceno (Tonni *et al.*, 1999; Nabel *et al.*, 2000; Rabassa *et al.*, 2005).

1.1.2. La familia Dasypodidae

La sincronización entre eventos biológicos y planetarios sugiere que los cambios climáticos globales tuvieron un rol crucial en la modelación de la historia evolutiva de los Xenarthra vivientes. Según un reloj molecular aplicado por Delsuc *et al.* (2004), el punto de divergencia entre los Cingulata y Pilosa se ubicaría alrededor de los 65 Ma, durante fines del Cretácico, luego del aislamiento de Sudamérica de otras masas continentales (Patterson y Pascual, 1972). Esto ocurrió casi simultáneamente con una diversificación

general del orden alrededor del límite Cretácico-Terciario, siendo los dasipódidos el linaje más antiguo y diverso.

La familia Dasypodidae es la más extensamente representada y la que reúne a las aproximadamente 20 especies de armadillos vivientes, (Wetzel, 1985; Wilson y Reeder, 1993). De ellas, 13 especies se encuentran presentes en Argentina incluyendo a *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*. Los dasypódidos se distribuyen desde el centro-sur de Estados Unidos (*Dasypus novemcinctus*) hasta el Estrecho de Magallanes (*Zaedyus pichiy* y *Chaetophractus villosus*) (Azize Atalah, 1975; Wetzel, 1985; Wilson y Reeder, 1993).

Los armadillos poseen características fisiológicas que los distinguen de otros mamíferos, en particular su temperatura corporal y tasa metabólica basal bajas en relación a su masa (Mc Nab, 1979, 1980b, 1985). Por ello la temperatura ambiente tiene una gran incidencia sobre su termorregulación y sus hábitos de vida (Roig, 1969, 1971).

1.1.3. El género *Chaetophractus*

Delsuc et al. (2004) a partir de un reloj molecular, propusieron que los armadillos pertenecientes al género *Chaetophractus* divergieron de los otros géneros hace unos 6 Ma. Sin embargo, su primer registro paleontológico consiste en placas asignadas a la especie *Chaetophractus villosus* (peludo), provenientes de un estrato

correspondiente a la Edad Mamífero Chapadmalalense (4 – 3,2 Ma., Plioceno tardío, Carlini y Scillato-Yané, 1996), sobre la costa atlántica de la Región Pampeana (Fig. 4), de la localidad de Chapadmalal (Buenos Aires).

1.1.3.1. El peludo *Chaetophractus villosus*.

El peludo es endémico del sur de Sudamérica y posee una de las distribuciones más amplias entre las 20 especies de armadillos actuales (Wetzel, 1982; Nowak, 1991; Redford y Eisenberg, 1992; Wilson y Reeder, 1993). Dicha distribución se extiende desde el Gran Chaco de Bolivia y Paraguay hasta el sur de la provincia de Santa Cruz en Argentina y en Chile hasta las provincias de Bío Bío y Magallanes (Wetzel, 1985; Tamayo, 1973; Azize Atallah, 1975; Wilson y Reeder, 1993). Recientemente se lo registró en el norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego, la región mas austral de ambos países (Figs.1 y 4), donde fue introducido hace unos 25 años (Poljak *et al.*, 2007).

La especie *Chaetophractus villosus*, habita una variedad de ambientes con climas y recursos alimenticios diversos. Tanto sus hábitos fosoriales, que le permiten afrontar fluctuaciones de temperatura ambiental (Mc Nab, 1979, 1985), como el poseer una dieta poco especializada (Redford, 1985), le confieren una notable capacidad adaptativa para habitar diferentes regiones, como

claramente lo demuestra su distribución. El hallazgo de esta especie en la Isla Grande de Tierra del Fuego, un ambiente de temperatura media anual mas baja (2 a 3 °C menos) que la de Santa Cruz (datos de la Estación Astronómica Río Grande, E.A.R.G, UNLP-CONICET), el sitio continental mas austral de su distribución, es una prueba de su plasticidad adaptativa. Deferrari *et al.* (2002) mencionan que aparentemente no sería el clima un factor determinante para la distribución austral de *Chaetophractus villosus* sino la barrera de agua que constituía el Estrecho de Magallanes, similar a lo que ocurre con la ausencia de la especie en Uruguay debido a la barrera representada por el estuario del Río de la Plata.

Sin duda, ésta es una especie versátil que se distribuye en un mosaico ambiental sumamente diverso y su hallazgo en el extremo insular austral de Sudamérica plantea interrogantes relacionados con su aislamiento geográfico y reproductivo y con las estrategias adaptativas en un ambiente modificado y en condiciones climáticas extremas (ver el APENDICE de este capítulo). Su extraordinaria tolerancia ambiental convierte a esta especie en un excelente modelo de trabajo para esclarecer aspectos filo y biogeográficos y vincularlos con los cambios climáticos ocurridos en los últimos 5 Ma.

1.1.3.2. El pichi llorón *Chaetophractus vellerosus*

El pichi se distribuye desde el sudeste de Bolivia y noroeste de Paraguay hasta el centro de Argentina. Actualmente su presencia se registra en las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, San Juan, La Rioja, Mendoza, San Luis, Córdoba, La Pampa y Buenos Aires.

En particular, Wetzel (1985) mencionó la presencia de *Chaetophractus vellerosus* en las provincias de Río Negro y Santa Cruz sobre la base de material de colección depositado en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Sin embargo, la procedencia patagónica de dicho material es dudosa dado que durante las últimas décadas no fue verificada la presencia de esta especie en dicha región tanto directa como indirectamente. Por otra parte, durante los viajes de campaña y muestreos vinculados a este trabajo de tesis como también a otros viajes de campo realizados por el Co-Director, no se verificó que *Chaetophractus vellerosus* habitara en Patagonia. Por ende, esta especie posee una distribución menor a la de *Chaetophractus villosus* en territorio argentino que no se extendería más al sur que las provincias de La Pampa y Buenos Aires.

El pichi llorón presenta una distribución disyunta, dado que ésta se encuentra dividida en lo que llamaremos su distribución general (es decir la extensión mayor continua) por un lado, que llega hasta el oeste de la provincia de Buenos Aires y por el otro,

una franja costera sobre la Bahía Samborombón también en dicha provincia, ubicada aproximadamente a unos 400 a 500 km al Este (Fig. 4), de preferencia sobre los cordones conchiles (Crespo, 1974; Carlini y Vizcaíno, 1987). Con la finalidad de explicar esta distribución disyunta, Carlini y Vizcaíno (1987) atribuyeron su origen al cambio hacia condiciones climáticas más húmedas ocurrido en la zona intermedia durante fines del Pleistoceno y parte del Holoceno.

El pichi llorón está mejor adaptado a la aridez por poseer túbulos colectores más largos (Greegor, 1975) y sería más eficiente al explotar zonas con climas más áridos y suelos con gran permeabilidad (Carlini y Vizcaíno, 1987).

Al igual que el peludo, el pichi llorón presenta un cambio estacional en su período de actividad entre el invierno y el verano, siendo diurno durante el primero y nocturno durante el segundo (Greegor, 1974, 1980b, 1985).

Estudios sobre su área del hogar (*home range*) señalan que el mismo abarca de 3,4 a 4,6 hectáreas en ambientes de dunas (Greegor, 1980b, 1985) y de 1 a 5,3 hectáreas en campos de aprovechamiento básicamente ganadero, ubicados en la zona de Pipinas, sobre la costa bonaerense (Glaz y Carlini, 1999). En general, *Chaetophractus vellerosus* tiene una dieta carnívora-omnívora (Redford, 1985) y presenta variaciones estacionales en la composición de su dieta de acuerdo a la disponibilidad de los diferentes ítems alimentarios (Soibelzon *et al.*, 2007).

A pesar que dentro de la familia Dasypodidae existen estudios filogenéticos moleculares a nivel genérico (Moller-Krull *et al.*, 2007 y referencias en ese trabajo), la historia evolutiva de esta especie no ha sido estudiada en mayor profundidad. En la actualidad, el fósil más antiguo adjudicado al pichi llorón, proviene de un estrato que aflora en el paraje Punta Hermengo, en la costa atlántica de la provincia de Buenos, datado entre 0,9 y 0,78 Ma.y que corresponde a la edad mamífero Ensenadense (2 a 0,5 Ma), Aires (Fig. 4) (Soibelzon *et al.*, 2006 y referencias allí citadas).

Por lo expuesto, en este trabajo de tesis se profundiza en forma inédita sobre la historia particular de esta especie en relación al contexto paleoclimático y geográfico en el que habita actualmente.

1.2. EL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt) DE MAMÍFEROS

1.2.1. La Región Control como marcador molecular. Elementos estructurales en la secuencia.

El ADNmt animal se hereda por línea materna (Hutchinson, 1974) lo que significa que los haplotipos mitocondriales deberían ser compartidos por todos los individuos dentro de un linaje materno, sólo en unas pocas especies se ha detectado su transmisión a través del espermatozoides (Anderson *et al.*, 1995). El ADNmt es una molécula circular que carece de histonas asociadas, lo que favorece su alta tasa de mutación y justifica su utilización a escala microevolutiva. El ADNmt de los vertebrados contiene normalmente 37 genes y una Región Control (RC) no codificante que contiene los elementos regulatorios de la replicación y transcripción del genoma mitocondrial (Saccone *et al.*, 1987; Sbisà *et al.*, 1997). La tasa de mutación general de esta región es la más elevada de toda la molécula (Avise, 2004).

La RC de los mamíferos tiene una longitud que varía entre 880 y 1400 pares de bases (pb), debido a la presencia de un número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTRs) generadas por recombinación intra o inter-molecular (Rand y Harrison, 1989) o lo que mejor se conoce como “resbalamiento de cadena” durante la replicación (Levinson y Gutman, 1987). En particular, esta región

está dividida en tres dominios: ETAS (Extended Termination Associated Sequences), Dominio Central (DC) y CSB (Conserved Sequence Blocks) (Saccone *et al.*, 1987; Sbisà *et al.*, 1997). Los dominios ETAS y CSB poseen tasas de mutación altas por lo que se los denomina regiones hipervariables y han sido extensamente utilizados en estudios de genética de poblaciones y filogeografía como los reportados por Confalonieri *et al.* (1998), Matson y Baker (2001), Reyes *et al.* (2003), Ducroz *et al.* (2005), Moraes-Barros *et al.* (2006), Scataglini *et al.* (2006), Alberti *et al.* (2008) por mencionar unos pocos.

El DC es conservado y ha sido probadamente útil en estudios entre taxa más divergentes (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1987, 1991; Douzery y Randi, 1997; Sbisà *et al.*, 1997; Larissa *et al.*, 2002).

La RC, por su escasa longitud, por presentar tasas evolutivas diferenciales en sus dominios y por la disponibilidad de secuencias de gran cantidad de especies, representa un excelente modelo para el estudio de las relaciones evolutivas. Esta herramienta puede así aplicarse en diferentes niveles de divergencia entre los mamíferos y su análisis permitió el estudio sistemático molecular de regiones regulatorias ortólogas entre diferentes especies (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1987, 1991; Sbisà *et al.*, 1997).

En los mamíferos, los dominios hipervariables ETAS y CSB incluyen en su secuencia segmentos conservados (ETAS 1, ETAS

2, CSB 1, CSB 2 y CSB 3) capaces de formar estructuras en forma de hoja de trébol, que resultan típicas de los ARN de transferencia. Sin embargo, si bien las funciones de estos elementos están básicamente vinculadas al control de la replicación del ADNmt y la transcripción de sus genes, aun no han sido totalmente esclarecidas (Brown *et al.*, 1986; Saccone *et al.*, 1987, 1991; Sbisà *et al.*, 1997).

La información disponible actualmente sobre evolución molecular de armadillos es variada y hace referencia a secuencias teloméricas repetitivas (TTAGGG)_n (Lizarralde *et al.*, 2005), genes mitocondriales como ND1, 12sRNA, 16sRNA (Cao *et al.*, 1998; Delsuc *et al.*, 2001), o nucleares como VWF, ADRA2B, BRCA1 (Delsuc *et al.*, 2001, 2002) y también a retroposones (Möller-Krull *et al.*, 2007), estudios que indudablemente han contribuido a clarificar las relaciones intra-ordinales de los Xenarthra.

En este trabajo de tesis doctoral, se utiliza la secuencia de la RC como herramienta para llevar adelante el estudio filogeográfico del género *Chetophractus* en Argentina y paralelamente, describir de forma somera la estructura de dicha región.

1.3. LA FILOGEOGRAFÍA

1.3.1. Definición y aplicaciones

La filogeografía, término acuñado originalmente por Avise *et al* (1987), se define como “el estudio de los procesos históricos que dan cuenta de la distribución geográfica contemporánea de los individuos de una especie o de especies cercanamente emparentadas a través del análisis de sus genealogías génicas” (Avise, 2004). Definida de esta forma, la filogeografía, es una disciplina que integra conceptos y metodologías como los que provienen de la genética molecular, de poblaciones, sistemática filogenética, demografía, paleontología y etología (Avise 1994, 2000).

La filogeografía se encuentra enmarcada por la Teoría de la Coalescencia y su explosivo desarrollo ante la posibilidad de identificar secuencias de ADN ancestrales constituye una nueva interpretación conceptual y empírica de los procesos microevolutivos en la naturaleza, focalizados explícitamente en la historia de la especie. En otras palabras, la consideración del pasado biogeográfico diferencia a esta disciplina de la genética de poblaciones, la cual basa su análisis en las medidas de similitud genética (Roderick, 1996).

Por ende, el análisis de las genealogías génicas aplicado al estudio de la evolución a nivel poblacional, permite así obtener conclusiones acerca de procesos históricos o recurrentes que

causaron la distribución particular de la variabilidad observada como por ejemplo secuencias de colonización, diversificación y extinción de linajes en áreas determinadas.

De acuerdo a lo expresado, el estudio de los patrones de variación genética y la construcción de árboles de genes enmarcados en la geografía, han contribuido al entendimiento de la estructura de las poblaciones y la divergencia de las especies. Mediante este análisis se puede inferir el origen geográfico de una especie, es decir aquellas áreas de distribución original con gran diversidad genética, y establecer las posibles rutas de colonización y centros secundarios de dispersión (Lanteri y Confalonieri, 2003).

El crecimiento de los análisis filogeográficos fue explosivo y abarca a la mayoría de los grupos animales incluido el *Homo sapiens* (Avice, 1998, 2000). Cabe destacar estudios sobre lugar de origen y vías de dispersión de plagas agrícolas o especies que han colonizado archipiélagos volcánicos (Roderick y Gillespie, 1998, Confalonieri *et al.*, 2000), de estructuración poblacional (Osentoski y Lamb, 1995), de tipos de especiación que explican la co-ocurrencia de morfotipos diferentes (Bernatchez y Dodson, 1990), de reconocimiento de poblaciones en riesgo de extinción (Avice, 1989, 1996; Moritz, 1994 a, b) y los estudios de filogeografía comparada, que permiten ponderar la influencia de la dispersión y la vicarianza en la evolución de especies co-distribuidas (Bermingham *et al.*, 1997; Cunningham y Collins, 1998).

1.3.2. Teoría de la Coalescencia

A lo largo de las sucesivas generaciones en una población de tamaño constante y en forma permanente surgen nuevos alelos por mutación, mientras que otros, asumiendo su neutralidad, se pierden por deriva genética. De esta manera, todos los alelos de un gen en una determinada generación derivan de un único alelo ancestral o dicho de otra forma, “coalescen” hacia uno único.

La coalescencia es básicamente un modelo de separación de linajes y deriva génica que se retrotrae en el tiempo, hasta un ancestro común (Harding, 1996). El “tiempo de coalescencia” puede verse afectado por diversos procesos que operan a nivel poblacional, como por ejemplo fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, existencia de selección natural o variaciones en el flujo génico.

La Teoría de la Coalescencia enunciada por Kingman (1982) y luego refinada por Hudson (1990), provee un marco conceptual para el estudio de los procesos que influyeron históricamente sobre las poblaciones y que dieron lugar a la distribución actual de su variabilidad genética. Contempla el tratamiento matemático y estadístico formal de las genealogías génicas, dentro y entre especies próximas (Felsenstein, 1971; Griffiths, 1980). Se aparta de la teoría de genética de poblaciones tradicional, pues se basa en la teoría neutralista (Kimura y Ohta, 1969; Kimura, 1980). Considera

que las mutaciones neutras se acumulan a lo largo de las ramas de los árboles (o filogramas) que representan las genealogías génicas.

La formulación de la coalescencia para herencias matrilineales fue desarrollada por Avise *et al.* (1988) a partir de una planteada por Tajima (1983) para árboles de genes nucleares bajo selección neutral. Las genealogías matrilineales serían análogas a las genealogías patrilineales que se obtienen a partir de genes del cromosoma Y de los mamíferos o a la herencia de los apellidos en la mayoría de las sociedades humanas. Las formulaciones mencionadas permiten calcular las probabilidades para los tiempos de coalescencia de pares de linajes y de conjuntos de linajes. Asimismo, dado que en el proceso de coalescencia influyen de un modo determinante factores demográficos poblacionales y la dinámica de los procesos de extinción y recolonización, se han analizado distintos modelos de estructura metapoblacional (Griffiths y Tavaré, 1997).

Las metodologías tradicionales de la genética de poblaciones no consideran los factores históricos cuando estiman el flujo génico intra e interpoblacional. Los estudios filogeográficos, en cambio, permiten identificar patrones que señalan la existencia de barreras antiguas al flujo génico (Roderick, 1996; Avise, 2000) y tienen en cuenta el flujo génico histórico y la fragmentación poblacional en un contexto filogenético. Por ejemplo, cuando se interrumpe el flujo génico entre dos poblaciones, éstas comenzarán a diferenciarse genéticamente hasta que todos los alelos de cada población lleguen

a tener un ancestro común más cercano entre sí, que con los alelos de la otra población. A este estado se lo denomina 'monofilia recíproca' y ocurre luego que los alelos han transitado por estados previos de parafiletismo y polifiletismo (Avice, 2000). Por lo tanto, si se hacen inferencias sobre el pasado histórico de las poblaciones cuando éstas todavía no alcanzaron el estado de monofilia, es posible hallar todavía variación alélica ancestral, que puede ser interpretada erróneamente como debida a flujo génico interpoblacional (Schaal y Olsen, 2000).

1.3.3. Análisis de Clados Anidados (*Nested Clade Analysis*) o NCA.

Inicialmente en la filogeografía, las inferencias biológicas de la dinámica de las poblaciones surgían de la superposición visual de las genealogías génicas sobre la geografía. Los investigadores concluyeron que este método podía resultar peligroso por no incluir evaluaciones de la significación estadística ni del muestreo de las localidades para distinguir entre las causas potenciales de la asociación entre la genealogía y la geografía (Templeton 1998). Así es como Templeton *et al.* (1995) adaptaron una metodología de análisis de la varianza "anidado" que denominaron Análisis de Clados Anidados (Nested Clade Analysis – NCA). El punto de partida es un árbol de haplotipos mitocondriales y el NCA es una

herramienta que permite estudiar separadamente, la estructura poblacional de su historia. A través del mismo, es posible tener una medida estadística objetiva que ponga a prueba la hipótesis nula de no asociación geográfica entre la variabilidad genética y geográfica e interpretar los patrones estadísticamente significativos con criterios que incluyan una evaluación del muestreo.

Los estudios filogeográficos se enfocan principalmente en una especie, es decir en la relación entre individuos, y abordan el análisis a través de marcadores de herencia uniparental lo cuál evita una reticulación de dichas relaciones que imposibilitaría la clara identificación de la correspondencia entre un linaje y su distribución en el tiempo y el espacio. En las poblaciones naturales los haplotipos generalmente existen como un grupo de copias y cuando una de ellas muta a otro haplotipo nuevo, es poco probable que las demás lo hagan o se extingan simultáneamente. De esta forma, los haplotipos ancestrales coexisten con los más jóvenes y ambos pueden ser muestreados. Entonces, es posible que un solo haplotipo dé origen a muchos haplotipos descendientes diferentes por lo que se producen multifurcaciones en las relaciones, las cuales son representadas mediante el uso de redes que permiten incorporar predicciones al análisis filogeográfico en base a la teoría de la coalescencia.

Algunas de estas predicciones son las siguientes: (ver Watterson, 1985; Donnelly y Tavaré 1986; Excoffier y Langaney, 1989)

- 1) Los alelos mas antiguos tienen una mayor frecuencia de aparición en las localidades y se ubican en una posición interior en la red por lo que tendrán mas de una conexión mutacional. Los haplotipos jóvenes por el contrario, se ubicaran en una posición periférica o terminal.
- 2) Los haplotipos más antiguos generalmente estarán más ampliamente distribuidos porque tuvieron más tiempo para hacerlo.
- 3) Los haplotipos raros se unirán con mayor probabilidad a haplotipos comunes que a otros raros.
- 4) Los haplotipos raros se conectarán con otros haplotipos de su misma población antes que con haplotipos de poblaciones diferentes.

Una vez obtenida la red de haplotipos, esta se convierte en una serie de conjuntos (clados), dentro de otros conjuntos (anidamiento), siguiendo las reglas de Templeton *et al.* (1987) y Templeton y Sing (1993), como se puede observar en la Figs. 3 y 6. Luego, el diseño de clados anidados es sometido a una prueba estadística de asociación geográfica que consiste en un análisis de contingencia permutacional en el que las variables son los clados dentro de cada nido versus las localidades de muestreo (coordenadas geográficas), cuya hipótesis nula es la no existencia de asociación entre las variantes genéticas y geográficas.

**1.4 EVOLUCIÓN GEOLÓGICA Y PALEOCLIMÁTICA DEL
SUR DE SUDAMÉRICA DURANTE LOS ÚLTIMOS 5 Ma.**

1.4.1. Los últimos 5 millones de años (Ma).

Delsuc *et al.* (2004) basados en la sincronización existente entre los eventos planetarios y biológicos, han sugerido que los cambios globales jugaron un rol crucial modelando la historia evolutiva de los Xenarthra vivientes, en particular aquellos cambios que ocurrieron en Sudamérica.

Los períodos glaciarios planetarios afectaron fuertemente al sur de dicho continente, desarrollándose especialmente sobre la Cordillera de Los Andes y la actual Patagonia en el sur de Argentina y Chile. Estos eventos afectaron al clima de toda la región y especialmente las condiciones climáticas, geológicas y ecológicas de la zona central de Argentina, la Región Pampeana o Pampas, durante el Pleistoceno (Tonni *et al.*, 1999; Nabel *et al.*, 2000; Rabassa *et al.*, 2005).

El planeta Tierra sufrió profundos cambios climáticos durante el Cenozóico, especialmente a partir del Mioceno. Estos hechos se relacionan con varias causas, como cambios de parámetros astronómicos del planeta (excentricidad de su órbita y oblicuidad de su eje), modificaciones en la composición de la atmósfera y movimiento de las placas tectónicas (Rabassa *et al.*, 2005) entre otras que por supuesto, afectaron también a las regiones más australes de Sudamérica (Ruddiman *et al.*, 1986; Opdyke *et al.*, 1995).

1.4.1.1. Plioceno

Cuando las grandes intrusiones marinas que formaron el “Mar Paranense” y el “Mar Amazónico” durante el Mioceno (Pascual *et al.*, 1996) se retiraron, dieron lugar al desarrollo de extensas praderas que se extendieron desde el norte de Patagonia hacia el norte, a lo largo del resto de Sudamérica (Fig.1). La formación de estos nuevos ambientes además tuvo relación con el elevamiento de los Andes durante la Fase Quechua (14 - 10 Ma) (Yrigoyen, 1979). Estas praderas alcanzaron su plenitud durante el Plioceno (5.32 - 1.81 Ma), lo que se ha denominado “*The Age of Southern Plains*” o la Edad de las Planicies del Sur (Pascual y Bondesio, 1982; Pascual *et al.*, 1996; Ortiz-Jaureguizar, 1998). Durante la misma fase diastrófica, el ascenso progresivo de la Cordillera de los Andes en su porción más austral, fue conformando una barrera para los vientos húmedos y lluvias provenientes del Pacífico, dando lugar al comienzo de la diferenciación de las actuales subregiones biogeográficas Subantártica y Patagonia (Pascual *et al.*, 1996).

La reducción de las extensas planicies mencionadas está correlacionada con una nueva fase diastrófica de los Andes, la Fase Diaguita (Yrigoyen, 1979), durante la cuál se elevó la Cordillera Central de Argentina y Chile, los sistemas orográficos de la Puna y las Sierras Pampeanas ubicados hacia el este y la Región Mesopotámica (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006). Esto tuvo gran incidencia ecológica, generando ambientes extremadamente xéricos

durante el Plioceno tardío debido al impedimento del paso de lluvias y vientos húmedos a los valles ubicados entre la Cordillera Central y las Sierras Pampeanas y a la gran elevación de la Puna (Pascual *et al.*, 1996; Alberdi *et al.*, 1997; Kleinert y Strecker, 2001). Estas características de aridez persisten aún hoy en ambas regiones.

La formación del Istmo de Panamá durante el Plioceno tardío (3 a 2,5 Ma) (Webb, 1985; Graham, 1992; Coates, 2003), detuvo la circulación marina entre los océanos Pacífico y Atlántico y facilitó la formación de la masa de hielo ártica (Shackleton *et al.*, 1984; Coates, 2003). Según la aparición en el registro fósil de especies migrantes en ambas Américas (Pascual *et al.*, 1985) y estudios geológicos en el Caribe (Coates y Obando, 1996) el proceso de formación del istmo fue gradual. Los primeros inmigrantes llegaron a Sudamérica durante la Edad de las Planicies del Sur (Mioceno tardío - Plioceno tardío) cuando predominaban los ambientes con estacionalidad en las lluvias, similares a la actual provincia fitogeográfica del Chaco (según Cabrera y Willink, 1980) pero algo más cálidos.

Al mismo tiempo la Corriente Circumpolar Antártica se estableció definitivamente y en Patagonia, las glaciaciones más grandes se registraron alrededor de los 2,3 Ma (Mörner y Sylwan, 1989) y sus consecuencias fueron climas más fríos que los del Mioceno tardío, con estacionalidad más marcada y mayor subdivisión de ambientes (Pascual *et al.*, 1996; Potts, 1996). Stuessy *et al.* (1996) y Dowsett *et al.* (1999) proponen que bajo estas condiciones generales, el sur de

Sudamérica estaba dominado por praderas, estepas y arbustales, con pequeños parches de bosques húmedos restringidos a la costa de Brasil, bosque montano en el centro norte de Argentina, Paraguay y este de Bolivia y bosque templado en el sudoeste de Patagonia. Webb (1978) y Pascual *et al.* (1996) proponen la presencia de bosques en galería siguiendo el curso de los ríos principalmente del noreste de Sudamérica. La hipótesis del dominio de las praderas como bioma principal está apoyada además por el dominio de especies pastadoras entre los mamíferos fósiles del Plioceno temprano (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006).

1.4.1.1.1. El Plioceno en Argentina

El Plioceno en Argentina se encuentra dividido en tres edades principales.

- La edad "Montehermorense" comprende un lapso intermedio entre el Mioceno tardío y el Plioceno temprano. Tiene una antigüedad entre 6 y 4 millones de años y los depósitos sedimentarios en la que se encuentra representada afloran a unos 15 kilómetros al sur de la localidad de Pehuen-co, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- La edad "Chapadmalalense" es tal vez la más importante del Plioceno por la abundancia de restos fósiles y evidencias ambientales. Tiene entre 4 y 3,2 millones de años y corresponden a sedimentos aflorantes en el litoral marítimo pampeano, ubicados

entre la ciudad de Mar del Plata y Miramar, Provincia de Buenos Aires.

- Recientemente se incluyó la edad "Marplatense", la cual se encuentra dividida en tres sub-edades (Sanandresense, Vorohuense y Barrancalobense) que tienen una antigüedad aproximada de 3,2 a 1,9 millones de años, ubicadas principalmente al sur de la ciudad de Mar del Plata.

Desde el final del Plioceno comenzó el "Gran Intercambio Biótico Americano", fenómeno que afectó al 80 % de las especies endémicas y autóctonas del sur sudamericano. Se produjo un evidente desplazamiento de distintos grupos de vertebrados hacia condiciones más favorables existentes al norte de Patagonia. Existió un gradiente decreciente de humedad en dirección al oeste y, como ya se mencionó, se desarrollaron las llanuras con extensas praderas bajo un clima templado - cálido y húmedo. Posteriormente, al elevarse las Sierras Pampeanas se produjo una "sombra de lluvias" al este, lo que favoreció la desertización de las áreas sub-andinas. Este periodo coincide con un deterioro en el clima, con un enfriamiento a nivel global, glaciaciones, un aumento en el gradiente térmico latitudinal, y un descenso en el nivel del mar, lo que provocó un cambio en la biodiversidad (<http://www.grupopaleo.com.ar/miramarprehistorica> y referencias allí citadas).

1.4.1.2. Pleistoceno

Los cambios climáticos durante el Pleistoceno (1.81– 0.01 Ma) se desarrollaron con una mayor amplitud y frecuencia que los pliocénicos. Los registros geológicos y bióticos del Terciario muestran largos períodos de uniformidad en las condiciones ambientales, esporádicamente interrumpidos por períodos geológicos cortos pero muy disruptivos, que causaron cambios drásticos en la composición taxonómica y ecológica de las biotas a través de procesos como cladogénesis, extinción y migración.

Por otro lado, los cambios climáticos más frecuentes y paulatinos durante el Cuaternario tuvieron efectos de carácter más bien corológico, expandiendo o contrayendo el área de distribución de los taxa, comunidades y biomas (Ortiz-Jaureguizar, 1986; Pascual y Ortiz-Jaureguizar, 1990; Pascual *et al.*, 1996).

Específicamente, las glaciaciones durante el Pleistoceno en Sudamérica fueron fundamentales en la modelación de los biomas, en función del avance y retirada de los glaciares y la correlación de esta dinámica con los cambios en el nivel del mar, climáticos y por supuesto ambientales. Esto causó la retracción y expansión en alternancia de sabanas y estepas áridas y bosques tropicales y subtropicales más húmedos (Marshall y Cifelli, 1990).

Durante los períodos interglaciarios con un concomitante aumento de la humedad, mientras los bosques se expandieron los ambientes abiertos como las sabanas y estepas se fragmentaron



Fig. 1.1: Ingresiones marinas en Sudamérica que formaron los mares Amazónico y Paranense durante el Mioceno (extraído y modificado de Ortiz Jaureguizar y Cladera 2006).

reduciendo sus áreas de distribución, volviendo a interconectarse durante los períodos de avance glaciario más secos y fríos (Kalin - Arroyo *et al.*, 1988). El patrón cíclico evidenciado por los avances y retrocesos glaciarios dio como resultado el provincialismo que caracterizó a las biotas sudamericanas desde el Pleistoceno temprano hasta hoy (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006).

El escenario dinámico fue favorable por momentos para algunos organismos como así también fue la causa del aumento de la tasa de extinción de otros (Marshall y Cifelli, 1990). Un ejemplo de ello lo fue el desarrollo de una sabana a modo de corredor norte-sur a lo largo del este de los Andes, que se extendió desde el sur del actual territorio argentino hasta las praderas de Colombia, llegando incluso hasta el sudeste de América del Norte a través del Istmo de Panamá, actuando como una gran vía de dispersión de plantas y animales (Webb, 1978; Marshall, 1985).

Un segundo corredor caracterizado por ambientes más cerrados y más húmedos se extendió a lo largo del este de Sudamérica, incluyendo algunas áreas costeras, también fue utilizado como vía de dispersión (Sánchez *et al.*, 2004).

Otro factor que afectó profundamente la situación de los biomas sudamericanos durante el Pleistoceno temprano fue el arribo masivo a través del Istmo de Panamá, de especies provenientes de América del Norte durante lo que se ha denominado el Gran Intercambio Biótico Americano (Pascual, 1970; Marshall y Cifelli, 1990; Pascual y Ortiz-Jaureguizar, 1990; Pascual *et al.*, 1996). Durante este período,

la composición de la fauna sudamericana fue más variable regionalmente que en períodos anteriores debido a la heterogeneidad de hábitats y altitud (Marshall y Sempere, 1993).

Los pastadores dominaron durante el Pleistoceno temprano en el sur de Sudamérica, seguidos por pastadores-ramoneadores y carnívoros, mientras que las especies netamente ramoneadoras eran poco diversas. (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006). Las praderas y estepas estaban bien extendidas (Tonni *et al.*, 1992; Pascual *et al.*, 1996) y las formaciones arbóreas se encontraban restringidos al curso de los ríos en áreas del centro y oeste pero sobre todo en la Mesopotamia argentina (Carlini *et al.*, 2004). Esta composición faunística y florística se mantuvo hasta el Plioceno tardío, con una pequeña disminución de la diversidad de pastadores.

El registro fósil del Pleistoceno temprano de la región pampeana evidencia un clima árido a semi-árido con lapsos de condiciones algo más húmedas (Tonni y Fidalgo, 1982; Tonni *et al.*, 1992; Tonni y Cione, 1995). Desde el centro norte de Argentina hasta el sudeste de Bolivia, las condiciones climáticas fueron similares, con temperaturas en aumento desde el sur hacia el norte (Carlini *et al.*, 2004; Zurita *et al.*, 2004). Condiciones climáticas de frío y aridez predominaron durante el Pleistoceno tardío en Patagonia desde los Andes hasta la costa atlántica, con cortos intervalos más húmedos y temperaturas más elevadas. Estos intervalos explicarían la presencia de milodontes y jaguares en el registro fósil del sur de esta región (Pascual *et al.*, 2002). Uno de los

hechos más sobresalientes durante el Pleistoceno tardío- Holoceno temprano, fue la casi completa extinción de los mega-mamíferos, especialmente en América y Australia (Nieto *et al.*, 2005). Esto ha sido atribuido a diversas causas como por ejemplo cambios climáticos (Owen-Smith, 1997; Vivo y Carmignotto, 2004), presión de caza por los humanos (Martin, 1984) y una combinación de ambos (Politis *et al.*, 1995; Cione *et al.*, 2003).

1.4.1.2.1. Las glaciaciones pleistocenas en Patagonia

Entre 1,168 y 1,016 Ma. (Pleistoceno temprano) se desarrolló la Gran Glaciación Patagónica, luego se sucedieron entre 14 y 16 ciclos geoclimáticos con alternancia de fases frías (glaciales/estadales) y cálidas (interglaciales/interestadales) hasta finales del Pleistoceno. Algunos de estos ciclos se dieron durante la Última Glaciación, cuyo máximo (Último Máximo Glacial o *Last Glacial Maximum*) fue entre 25000 y 16000 años antes del presente (AP), durante el Pleistoceno tardío (Rabassa *et al.*, 2005). Más tarde, entre 15000 y 10000 años AP, tuvieron lugar dos reavances que fueron de gran influencia climática local en las regiones Pampeana y Patagónica. Según un modelo de tal ciclicidad como este, el intercambio faunístico regional se dio unas 14 veces desde la Gran Glaciación Patagónica y unas 50 veces desde el Plioceno temprano,

procesos de extrema importancia para ser considerados en un análisis biogeográfico.

Durante cada glaciación, la mayor parte de la región pampeana tuvo un clima más frío y seco que el actual (similar al del noreste de la Patagonia) (Tonni y Hidalgo, 1978; Clapperton, 1993 a, b). Debido a una disminución de unos 120 metros en el nivel del mar durante el Último Máximo Glacial, el este del sur de Sudamérica se extendió 300 km o más en algunas latitudes (Caldenius, 1932; Clapperton, 1993 a,b). En las regiones Pampeana y Andina, el clima fue árido y frío y en el centro del país se extendieron las dunas, el loess y la vegetación de desierto (Clapperton, 1993 b; Bonadonna *et al.*, 1995, Tonni *et al.*, 1999; Rabassa *et al.*, 2005). El clima, aunque más moderado en el sudeste de Brasil y Uruguay, también fue más frío y seco que el actual y los bosques fueron dando lugar a formaciones abiertas como las sabanas, luego estepas, vegetación xerofítica y arbustos espinosos (Markgraf, 1989; Turq *et al.*, 1997).

Como se mencionó, durante este período el nivel del mar fue bajando y a los 18.000 años AP aproximadamente llegó a estar 120 metros por debajo del actual, comenzando a subir a los 13.000 años AP. Se llega al nivel actual a los 6000 años AP (Clapperton, 1993 a,b).

La retirada de los glaciares comenzó alrededor de los 14000 años (Lowell *et al.*, 1995) y este derretimiento y el aumento de las nevadas en la zona cordillerana incrementaron la descarga de los

ríos (Zárate, 2002), lo que generó extensos ambientes lacustres en la región de Cuyo (González, 1994; Rodríguez y Barton, 1993).

1.4.1.3. Holoceno

El Holoceno comprende los últimos Ca 10 Ka (Fidalgo, 1983; International Stratigraphic Chart: www.stratigraphy.org/chus.pdf), período que sucedió a la última glaciación (Pleistoceno tardío). Durante dicho lapso, el nivel del mar aumentó significativamente debido al derretimiento de los hielos a nivel planetario, lo que modificó la configuración general de la superficie terrestre expuesta (Isla 1989). Este período se caracterizó por un aumento general de la temperatura, con su máximo durante el Holoceno medio y una marcada aridez interrumpida por lluvias cuya frecuencia e intensidad variaron local o regionalmente, tal como sucede en la actualidad. Grim et al. (2001) sostienen que todos los indicadores climáticos en Sudamérica sugieren aridez y temperaturas elevadas entre los 7800 y 4300 años AP (Holoceno medio), excepto algunos registros en latitudes medias que indican una tendencia hacia climas templados. Markgraf (1989), Clapperton (1993) y Schäbitz (1994) proponen que estas condiciones de aridez general parecen haber sido algo menos intensas en Sudamérica, moduladas en parte por los efectos de la corriente de El Niño. Entre los 7600 y 6000 años AP, las temperaturas alcanzaron los valores máximos, por lo cual se ha

denominado a este período como el “optimum climaticum” holocénico (Clapperton 1993 a, b, Budyka, 1994).

1.4.1.3.1. Temprano (11000 – 8000 años AP)

Este período se caracterizó por ser frío y húmedo con temperaturas en paulatino ascenso (Roth y Lorscheitter, 1989). La retirada de los glaciares del Pleistoceno tardío dio lugar a praderas que luego fueron reemplazadas por vegetación propia de climas más secos (Behling, 1998) lo que indica que la humedad, sobre el final del Holoceno temprano, fue menor que la actual.

Hacia los 10.500 años AP una fase lacustre húmeda se desarrolló en los Andes del sur (Grosjean, 1994) y al mismo tiempo la humedad se elevó en las tierras bajas amazónicas, lo que provocó el aumento de las precipitaciones (Sylvestre *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2001). En el noroeste argentino, la composición polínica de los sedimentos correspondientes a este período en la Puna, también indican un aumento de la humedad y disminución de la temperatura (Markgraf, 1985; Lupo, 1998).

La vegetación dominante fue la pradera, que se desarrolló al retirarse los glaciares. Comienza a darse una ciclicidad anual con un período seco de unos tres meses y las praderas glaciarias fueron reemplazadas por bosques semidecíduos en regiones con períodos secos cortos y vegetación tipo *cerrado* en regiones con períodos

secos más prolongados (Behling, 1998). Esto también afectó a la región central del actual territorio argentino. En formaciones sedimentarias del centro de la provincia de Buenos Aires que corresponden al período 10.000 – 3000 años AP, las especies de mamíferos fósiles halladas se asocian con condiciones climáticas secas y áridas y a ambientes de dunas y loess. Estos mamíferos pertenecen actualmente a los dominios Patagónico (monte y estepa) y al Central (espinal) (Tonni *et al.*, 1999). En la zona del centro-oeste, en la transición Pleistoceno – Holoceno, entre los 12000 y 8500 años AP, las dominantes precipitaciones invernales comenzaron a disminuir y a aumentar las estivales. También hubo un marcado aumento de la temperatura que provocó la evaporación de numerosos lagos a lo largo del este de la Región Andina (Markgraf, 1983).

En el noreste de Patagonia se desarrolló una estepa halofítica ya durante el Pleistoceno tardío, que perduró hasta el Holoceno temprano - medio. Esto evidencia condiciones climáticas áridas a semiáridas durante este período (Quattrocchio *et al.*, 1993, Schäbitz, 1994). Iriondo y García (1993) proponen que estas condiciones fueron extensivas hasta 750 km más hacia el noreste aún, lo que corresponde al sudeste de la actual provincia de Buenos Aires, en un período similar (Pleistoceno tardío – 8500 años AP).

1.4.1.3.2. Medio (8000 – 4000 años AP).

El aumento de la temperatura y las variaciones del nivel del mar son los principales factores que afectaron al clima de este período (Mancini *et al.*, 2005). Las condiciones climáticas generales durante el Holoceno medio pueden caracterizarse como áridas a semiáridas y las temperaturas alcanzaron su punto máximo en lo que se denomina el “*optimum climaticum*”, que se dio entre los 7600 y 6000 años AP (Clapperton, 1993b).

El mar alcanzó su máximo nivel durante este período (Grill y Quatrocchio, 1996, Stutz *et al.*, 1999). La aridez o semi-aridez estuvo interrumpida por tormentas episódicas y de carácter regional, lo que resultó en la concentración de los recursos en los denominados “refugios ecológicos” propuestos por Grosjean *et al.* (1997) y Yacobaccio (1998). Durante el Holoceno medio se extinguen las últimas especies de grandes mamíferos sudamericanos, probablemente por la reducción de las áreas de sabana (de Vivo y Carmignotto, 2004).

Estudios en el lago Titicaca coinciden en que entre los 6500 a 5200 años AP fue un período de extrema aridez, con una disminución de 85 metros respecto del nivel actual del lago, siendo el registro mas bajo de los últimos 25000 años (Thompson *et al.*, 1995). En la composición vegetal del noroeste argentino, entre los 8000 y 6000 años AP comenzaron a disminuir los pastizales y las hierbas y a aumentar los componentes de estepa (Markgraf, 1985;

Lupo, 1998). Alrededor de los 4500 años AP, la situación se revirtió y el nivel del Titicaca comenzó a subir (Baker *et al.*, 2001).

Durante el árido Holoceno medio, si bien el clima en la cuenca del Río de La Plata y el sudeste de Brasil también se caracterizó por las altas temperaturas, la humedad y precipitaciones fueron mayores y estacionalmente variables. Esto definió un clima tropical húmedo con veranos sumamente cálidos e inviernos moderados, condiciones generales interrumpidas por eventos semiáridos a áridos aislados (Iriando, 1999; Stevaux, 2000). El incremento de las lluvias se dio particularmente entre los 7000 y 5000 años AP, comenzando con la transición hacia un clima más húmedo (Salgado-Labouriau *et al.*, 1998) probablemente por efectos de la corriente de El Niño (Martin *et al.*, 1993). Se desarrollaron bosques lluviosos sobre la costa atlántica, los bosques semidecíduos fueron muy extensos y hubo sabanas y praderas (Behling y Negelle, 2001; Grim *et al.*, 2001). La fauna brasílica se dispersó hasta el sur de esta región, actualmente Mesopotamia y Uruguay) (Tonni, 1992), llegando incluso hasta las Pampas (Tonni *et al.*, 1999).

Evidencias paleontológicas (Tonni *et al.*, 1999) y palinológicas (Grill, 1995; Mancini *et al.*, 2005) indican que las condiciones pudieron haber sido menos áridas a directamente húmedas y templadas respectivamente, en el centro de la provincia de Buenos Aires. Estudios palinológicos realizados por Zárata y Flegenheimer (1991), evidencian que en el sudeste de esta provincia las condiciones fueron de mayor humedad hacia los 6500 a 5000

años AP. A lo largo de la costa bonaerense, especies de aguas cálidas expandieron su distribución hacia el sur a causa del aumento de temperatura durante este período (Aguirre, 1993).

A escala regional, estudios de sedimentos marinos (Lamy *et al.*, 1999), de paleosuelos (Veit, 1996) y palinológicos (Heusser, 1989; Villagrán y Varela, 1990), sugieren que en el centro oeste de Argentina el clima fue árido durante el Holoceno medio. Entre los 6000 y 4500 años AP se produjo una nueva glaciación (Stingl y Garleff, 1978, 1985), tal vez promovida por cambios en los vientos predominantes (Jenny *et al.*, 2003) y la influencia del anticiclón del Atlántico, lo que significó una disminución de las lluvias estivales y una mayor aridez en las zonas bajas que empobreció la vegetación (Gil *et al.*, 2005). El aumento de las nevadas durante este período glaciario produjo reavances entre los 5700 y 4700 años AP e incluso durante el Holoceno tardío (Espizúa, 2000). En la Patagonia, el aumento de temperatura y aridez da lugar al surgimiento de la Diagonal Árida (Bruniard, 1982), que cruza la parte norte de esta región desde los 44° S sobre la costa atlántica hasta los aproximadamente 40° S contra la cordillera, dirigiéndose luego hacia el norte hasta los 27° S (Mancini, *et al.*, 2005), a la altura aproximada de lo que actualmente es el límite oeste entre San Juan y La Rioja. Hacia finales de este período, la disminución de la temperatura en el sur de la cordillera patagónica da lugar al comienzo del Neoglacial (Mancini *et al.*, 2005).

1.4.1.3.3. Tardío (4000- actualidad)

Las condiciones climáticas y la vegetación durante el Holoceno tardío en Sudamérica comenzaron una transición hacia lo que son actualmente. Se establecen los patrones de circulación atmosférica y los de desplazamiento latitudinal de los centros de tormenta que producen una precipitación máxima hacia los 50° S (van Geel *et al.*, 2000). Esto resulta en una estacionalidad de las lluvias y de la humedad más marcada, tal vez en relación con el establecimiento de las fluctuaciones de la corriente de El Niño (Grimm *et al.*, 2001) y en una heterogeneidad ambiental a escala local similar a la actual (Stutz y Prieto, 2001; Mancini, 2002; Mancini *et al.*, 2002). La disminución de la temperatura en varias regiones montañosas en el mundo da lugar al desarrollo de un cierto avance glaciario, el Neoglacial o “Little Ice Age”, que también se dio en los Andes Centrales y del Sur, (Stingl y Garleff, 1985; Espizúa, 2000 b; Rabassa *et al.*, 2005). Masas de aire húmedo provenientes del océano Atlántico aportan un aumento en las precipitaciones y por lo tanto en la disponibilidad de agua, al menos en el sur de Sudamérica (Schäbitz y Liebritch, 1998).

Al norte de la Región Andina, aumentan las lluvias de verano hasta llegar a los niveles actuales así como la humedad a causa de la creciente insolación estival. (Ekdahl *et al.*, 2008). En el sudeste de Brasil, luego de los 3500 a 3000 años AP el clima se tornó cálido y

mas húmedo (similar al presente), con pequeñas oscilaciones en las precipitaciones. Esto dio lugar a un mosaico de áreas de bosque y cerrado (Parizzi *et al.*, 1998; Scheel-Ybert *et al.*, 2003)

En la Región Pampeana aún persisten condiciones climáticas de aridez que comienzan a modificarse por aumento paulatino de la humedad, muy marcado a los 2000 años AP (Deschamps y Tonni, 1992) y disminución de la temperatura (Politis *et al.*, 1983), generando un mosaico de microambientes donde habitaron especies de subtropicales a patagónicas caracterizando a la Región Pampeana, como una zona de ecotono entre los dominios brasílico y patagónico (Tonni *et al.*, 1999).

La Pequeña Edad de Hielo o Neoglacial (alrededor de los 500 años AP) afectó al clima de la región, que según evidencias paleontológicas provenientes de formaciones pampeanas (Tonni *et al.*, 1999) y datos geológicos del centro-oeste de Argentina (Ramonell *et al.*, 1993; Kronberg *et al.*, 1993) fue árido a semiárido. En lo que actualmente corresponde al sur de Mendoza, se registraron dos reavances glaciares (Espizúa, 2000b), las temperaturas y lluvias (invernales) fueron menores que las actuales y la vegetación predominante fue pastizal y estepa arbustiva (Markgraf, 1983; García *et al.*, 1989). En este marco de aridez local, en tierras mas bajas creció bosque en galería en las márgenes de los ríos, que tuvieron abundante descarga. La temperatura también disminuyó en Patagonia y aunque posiblemente hubo un aumento de las precipitaciones invernales sobre la cordillera, la menor

influencia de los vientos húmedos desde el oeste motivó la mayor aridificación de las tierras bajas de esta región. Estas condiciones de aridez incluso se extendieron hasta el centro y centro-oeste del territorio argentino (Mancini *et al.*, 2005; Schäbitz y Liebritch, 1998). Las condiciones de aridez que motivaron el surgimiento de la Diagonal Árida en el Holoceno medio aumentaron en el noroeste de Patagonia y en la estepa arbustiva entre los ríos Negro y Chubut comenzaron a aparecer las primeras especies que hoy conforman el monte (Páez, 1991; Mancini *et al.*, 2005). Secuencias sedimentológicas y palinológicas del noreste, indican condiciones de semi-aridez, con una mayor disponibilidad de agua estacionalmente, mas hacia el límite con la Región Pampeana (Schäbitz, 1994, 1999). En la porción sur de la cordillera, se mantuvo el clima frío y húmedo del Holoceno medio y se desarrolló un denso bosque de *Nothofagus*, mientras que en el llano semidesértico, la estepa dominó el ambiente (Mancini, 1998, 2002).

1.5 OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este trabajo de tesis pretende realizar el primer análisis filogeográfico de las especies de armadillos *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* en toda su distribución en la Argentina utilizando secuencias parciales de la Región Control (RC). De esta manera se persigue inferir:

a) si las poblaciones muestran señales de estructuración genética;

b) los procesos históricos o recurrentes que pudieran explicar dicha estructuración para cotejarlos con la información acerca de la evolución climática cuaternaria y explicar la distribución actual de las secuencias de ADNmt.;

c) el área de distribución ancestral mas probable de las especies y que relación guardan con el registro fósil;

d) los patrones de expansión de las especies a lo largo de su distribución;

e) la relación filogeográfica entre la población de *Chaetophractus villosus* introducida en Tierra del Fuego y las poblaciones continentales fuente;

f) posibles causas de la distribución disyunta de *Chaetophractus vellerosus* para cotejarlas con hipótesis previas.

Complementariamente se compararán las secuencias de la RC de estas especies entre sí y con secuencias ortólogas pertenecientes a especies de otros ordenes de mamíferos para caracterizar su estructura en Dasypodidae (Xenarthra).

Hipótesis: “Los individuos de las especies *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* se dispersaron hasta su distribución actual, de acuerdo con la expansión de las zonas semidesérticas a desérticas e independientemente de los gradientes de temperatura”.

APÉNDICE

**LA POBLACIÓN DE *Chaetophractus*
villosus INTRODUCIDA EN TIERRA
DEL FUEGO**

Paralelamente con los muestreos propios de la tesis doctoral se desarrollaron otros con el fin de conocer el estado poblacional de *Chaetophractus villosus* en Tierra del Fuego. Además, indagar sobre aspectos como el ecológico y otros concernientes a la introducción de esta especie, autóctona en el continente, en la Isla Grande de dicho archipiélago. El contenido de los resultados y la discusión surgidos de este estudio se incluyen en este segmento y gran parte de la información presentada aquí no se encuentra citada ya que fue obtenida y analizada por el propio autor de esta tesis.

Reseña de las introducciones en el archipiélago de Tierra del Fuego.

El Archipiélago de Tierra del Fuego, está ubicado en el extremo austral de América del Sur, entre los Océanos Atlántico y Pacífico, separado del continente por el Estrecho de Magallanes. La isla de mayor tamaño de las cientos que lo conforman es la Isla Grande (Figura 1.2). La condición insular y la influencia de la corriente marina antártica resultan en un clima húmedo templado-frío (Pisano, 1981), que resulta más seco hacia el norte de la mencionada isla donde el patrón de vegetación corresponde al de la estepa patagónica (Lizarralde, 1993). Desde el punto de vista faunístico, la región se caracteriza por poseer una escasa fauna

nativa y, paradójicamente, un extensísimo historial de introducciones de mamíferos (Lizarralde y Escobar, 2000).

Las primeras introducciones de las que se tiene registro en la Tierra del Fuego datan del siglo XVIII (múridos de los géneros *Rattus* y *Mus*) y actualmente se considera que más del 66% de las aproximadamente 30 especies que componen la mastofauna terrestre del archipiélago fueguino fue introducido deliberadamente por el hombre ya sea con fines económicos o de otra índole (Massoia y Chébez, 1993; Lizarralde y Escobar, 2000; Jaksic *et al.*, 2002). De las 10 especies de mamíferos nativas sólo una es endémica: el roedor cavícola *Ctenomys magellanicus* o “tucu-tuco”, que vive en colonias y construye redes de túneles en zonas abiertas con buen drenaje (Lizarralde *et al.*, 2001). El mamífero más recientemente incorporado a la larga lista de especies exóticas de la Tierra del Fuego es el armadillo *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Dasipodidae) vulgarmente conocido como “peludo”. Si bien esta especie fue detectada pocos años atrás (Deferrari *et al.*, 2002), datos obtenidos en entrevistas con lugareños, personal de los establecimientos ganaderos y empresas petroleras de la zona, coinciden en señalar que fue introducida en la Isla Grande hace aproximadamente 25 años (Poljak *et al.*, 2007).

Fisonomía y clima de la región

La Isla Grande de Tierra del Fuego se divide en tres áreas ecológicas principales: al sur la región andina montañosa; en el centro una de transición o ecotonal más bien plana, rodeando al Lago Fagnano y al norte, una extra-andina cubierta por pastizales típicos de la estepa magallánica (Lizarralde, 1993; Lizarralde *et al.*, 2004). En esta última, sobre la parte sur de la Bahía San Sebastián, en la costa atlántica, se ubica el área ocupada por *Chaetophractus villosus* (Fig. 1.2).

La unidad de vegetación es equivalente a la estepa magallánica húmeda en su porción continental. Los pastizales de “coirón dulce” (*Festuca gracillima*) dominan la topografía de la región, caracterizada por ondulaciones intercaladas con algunas planicies de origen glaciario. En zonas con buen drenaje se desarrollan manchones de “murtilla” (*Empetrum rubrum*), un arbusto rastroso y distribuidos de manera esporádica son notorios el “calafate” (*Berberis buxifolia*) y la “mata negra” (*Chilliotricum diffusum*) (Collantes *et al.*, 1989; Lizarralde, 1993; Tell *et al.*, 1997). Los suelos son molisoles con un horizonte superior A de textura franco-arenosa con un 5 a 10% de materia orgánica y uno inferior C areno-gravilloso o capas arcillo-areno-gravillosas compactas (Collantes *et al.*, 1989). Las precipitaciones anuales para la región se dan en un gradiente NE-SO desde 200 a 400 mm respectivamente (Vallerini *et al.*, 1975, Korembliit y Forte Lay, 1996). Son frecuentes y fuertes los vientos

desde el oeste con una velocidad media de 30 km/h en primavera y verano (Collantes *et al.*, 1989).



Fig. 1.2: en rayado: área de distribución de la población de peludos (*Chaetophractus villosus*) en Tierra del Fuego; en gris: área de muestreo dentro de la cuál se encuentra la red de tuberías de transporte de hidrocarburos. Los puntos negros dentro del área de muestreo representan los sitios de captura.

Las temperaturas medias para la zona oscilan entre 0 °C en el invierno con una mínima de -3 °C y 11 °C en verano con una máxima de 16,2 °C (datos de la Estación Astronómica Río Grande, E.A.R.G, UNLP-CONICET).

En el marco ambiental descripto, se incorpora la importante actividad de extracción de hidrocarburos en la zona, como la perforación de pozos petroleros, construcción de caminos, movimiento de vehículos y personal de las empresas petroleras Panamerican Energy y Total. Los hidrocarburos son transportados desde los pozos de extracción hasta los tanques de almacenamiento por una red de decenas de kilómetros de longitud, a temperaturas de entre 40 °C y 90 °C para mejorar su fluidez, de acuerdo a la presión del pozo y la temperatura ambiente (Rodolfo Alberto Gay, Supervisor de la Planta San Sebastián, Panamerican Energy, com. pers.).

Aspectos ecológicos de *Chaetophractus villosus* en Tierra del Fuego

Entre los representantes de la familia *Dasypodidae* en Argentina, *Chaetophractus villosus* es la especie que posee la distribución más extensa, habitando una variedad de ambientes con climas y recursos alimenticios diversos. Tanto los hábitos fosoriales del peludo, que le permiten afrontar fluctuaciones de temperatura ambiental (Mc Nab,

1979, 1985), como el poseer una dieta poco especializada (Redford, 1985), le confieren una notable capacidad adaptativa para habitar regiones con climas y recursos alimenticios diversos, como claramente lo demuestra su distribución. El hallazgo de esta especie en la Isla Grande de Tierra del Fuego, en un ambiente que se caracteriza por una temperatura media anual de 2 a 3 °C mas baja que la de Río Gallegos (datos de la Estación Astronómica Río Grande, E.A.R.G, UNLP-CONICET), la localidad continental mas austral de su distribución, es una prueba de su plasticidad adaptativa y plantea nuevamente interrogantes vinculados a la estrategia de colonización e impacto de las especies introducidas en el ecosistema fueguino (Lizarralde, 1993; Lizarralde *et al.* 2004).

Como ya se mencionó antes, Deferrari *et al.* (2002) proponen que el clima no sería un factor determinante para la distribución del peludo sino las barreras de agua que constituyen el Estrecho de Magallanes y el estuario del Río de la Plata.

La distribución de *Chaetophractus villosus* en la Isla Grande de Tierra del Fuego comprende una franja costera que se extiende de norte a sur desde las Sierras Cabeza de León hasta el Cabo Domingo, cubriendo una superficie de 484 km² aproximadamente (Fig. 1.2). Los sitios con signos de actividad de la especie como cuevas y pequeñas excavaciones para alimentación u “hozaduras”, denominadas “rooting places” por Crespo (1944) y “food probes” por Greegor (1980), así como el hallazgo de restos de individuos

sugieren que la colonización de estas nuevas latitudes está fuertemente asociada a la mencionada red de tuberías.

La velocidad y dirección de los vientos predominantes influyen en la ubicación y disposición de las cuevas (Crespo, 1944; Abba *et al.*, 2005). Si *Chaetophractus villosus* ha desarrollado hábitos cavadores en función de mejorar su termorregulación probablemente las zonas bajas, altas y costeras no son elegidas para la construcción de cuevas debido a factores tales como el drenaje del substrato, su cohesión y el viento, mientras que sí lo parecen las de elevación intermedia.

Las cuevas que la especie construye en esta región se agrupan en 2 tipos: 1) “*cuevas largas*” que miden entre 2 m y 7,2 m ($X = 3,23$ m, $SD = 1,045$ m) y poseen al menos una curva y 2) “*cuevas cortas*” rectas, que miden entre 0,8 m y 1 m de longitud, sin encontrarse cuevas de longitud intermedia entre la más larga del grupo 1 y la más corta del grupo 2. Los signos de actividad reciente en las bocas de las cuevas largas, sugieren que son éstas las que la especie ocupa como madriguera o al menos en forma semi-permanente y que las “*cuevas cortas*” son usadas transitoriamente, en posibles situaciones de peligro o por búsqueda de alimento. Esta observación podría coincidir con el agrupamiento propuesto por Abba *et al.* (2005) en cuevas simples y complejas de acuerdo a su morfología y a evidencias de su uso, como por ejemplo el hallazgo de pequeños túneles hechos por larvas de coleópteros en el extremo de las cuevas simples. Sin duda las cuevas constituyen el elemento

más conspicuo de la actividad de los armadillos pero, como ya se mencionó, debido al conocimiento parcial de las estrategias y comportamiento respecto de su construcción, no se ha desarrollado aún un método eficiente para la estimación del número de individuos de una población en base a ellas. Sin embargo, el número de cuevas activas es un índice indirecto que puede ser usado para estimar la abundancia relativa de las poblaciones de armadillos.

La abundancia estimada es de 14,58 cuevas activas por km lineal de tubería u 11 por km² dentro de un área de 74 km² y la proporción de *cuevas largas / cuevas cortas* fue de 1: 5,14.

Por medio de una serie de transectas se determinó que la mayor actividad alimentaria de la especie se desarrolla entre los 40 a 70 metros de distancia de la tuberías, sin registrarse signos de ello a mayor distancia que los 100 metros (Fig. 1.3).

Por ende, si consideramos aspectos fisiológicos de estos dasypódidos tales como la temperatura corporal y la tasa metabólica basal bajas (McNab 1979, 1980b, 1985) además de la relación entre los hábitos cavadores y la termorregulación, es posible asumir que las modificaciones físicas del suelo debidas a la actividad petrolera favorecieron el establecimiento y la dispersión (según Williamson & Fitter 1996) de *Chaetophractus villosus*.

Taber (1944) y Greigor (1974) mencionan la preferencia de los armadillos por construir sus cuevas en sitios con pendiente o en la base de terraplenes por lo cuál el cordón de tierra removida que

interrumpe el plano natural del suelo donde se ubican las tuberías sea también un factor influyente.

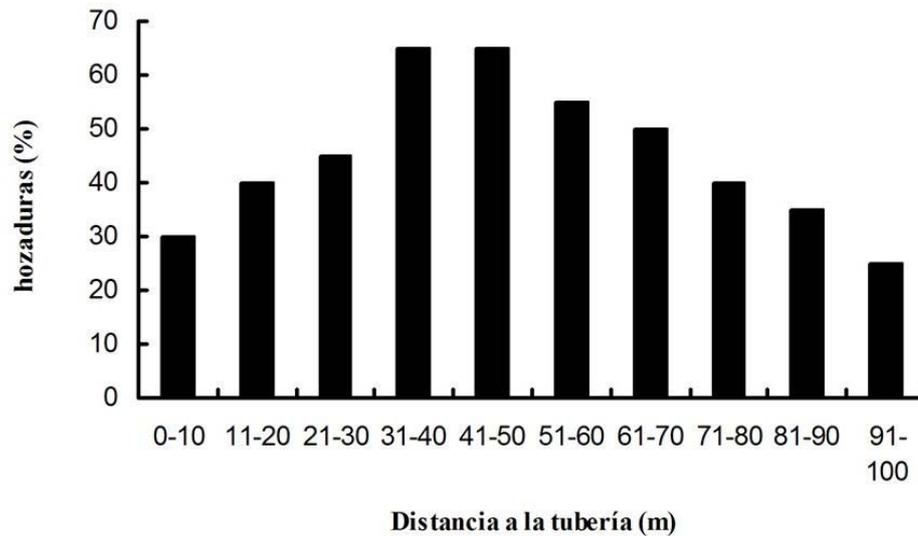


Fig. 1.3: actividad alimentaria (% de hozaduras) de los peludos en función de la distancia a las tuberías.

Sin embargo, otros autores como Carter & Encarnaçao (1983) no encontraron patrones en este sentido.

Datos preliminares sobre la dieta de *Chaetophractus villosus* en la Isla Grande indican que se alimenta de vegetales incluyendo frutos de calafate y artrópodos. El calafate es un fruto que también forma parte de la dieta del “zorro gris chico” (*Pseudalopex griseus*) que incluye en su distribución al área de estudio (Tell *et al.*, 1997; observaciones personales). Debido a la escasez del recurso en la zona, podría suponerse que ambas especies compiten por él. En algunas zonas también hay superposición de la distribución de las

cuevas de *Chaetophractus villosus* con las de “tucu-tuco” (*Ctenomys magellanicus*) así como en el aprovechamiento de los “murtillares” para forrajeo con la “bandurria” (*Theristicus caudatus*) donde ambas especies practican hoyos en el suelo a profundidades similares. Por otro lado, *Chaetophractus villosus* es un ítem presa de algunas especies de zorro que habitan la estepa patagónica continental en un porcentaje muy bajo (Medel y Jaksic 1988) pero no hay registros de que forme parte de la dieta de *Pseudalopex griseus* (Medel y Jaksic 1988), única especie de zorro que habita los patizales de coirón. El peludo no forma parte usualmente de la dieta de los pobladores de la zona seguramente por ser un componente nuevo en la estepa fueguina, en contraste con lo que ocurre en el resto de su distribución donde tiene importancia cultural como especie (como parte de la dieta de los pobladores, en la literatura, en manufacturas artesanales y como mascota).

La similitud del clima en toda la estepa patagónica (con temperaturas medias anuales pocos grados inferiores en Tierra del Fuego) ocurre de manera análoga con el de la cuenca del Río de la Plata entre Argentina y Uruguay, país en el que no se distribuye la especie en estudio.

Aparentemente no sería el clima un determinante de la distribución del peludo sino que las barreras geográficas naturales como el Estrecho de Magallanes hacia el sur y el Río de la Plata hacia el este son las que la han acotado (Deferrari *et al.*, 2002). *Chaetophractus villosus* es una especie introducida establecida en la

Isla Grande, favorecida por la actividad humana en un ambiente con los recursos necesarios y sin enemigos naturales.

Consideraciones finales

La introducción de plantas y animales tiene efectos homogeneizadores sobre la distinción natural regional de las biotas (Vitousek *et al.*, 1997) y ecológicos y genéticos sobre las especies introducidas y sobre las nativas de los ecosistemas donde fueron introducidas (Gray, 1986). Esto se agudiza en el caso de una isla debido a la circunscripción geográfica de los ecosistemas, que los hace especialmente vulnerables a las invasiones biológicas (Lizarralde y Escobar, 2000). El número poblacional de *Chaetophractus villosus* en Tierra del Fuego actualmente es bajo pero es una población establecida y las condiciones generadas por la actividad humana y el hecho de no poseer enemigos naturales en este nuevo ambiente le son claramente favorables. Su aislamiento la convierte en un excelente modelo para estudios ecológicos y genéticos desde una óptica filogeográfica en relación a las poblaciones continentales.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Procedencia de los especímenes

Para llevar a cabo un estudio filogeográfico, el número adecuado de muestras por localidad es una variable, en principio podría depender del grupo taxonómico del que se trate y de fenómenos poblacionales que son desconocidos previamente al estudio. Teniendo en cuenta esto, y la extensión geográfica de la distribución de las especies utilizadas, el objetivo del muestreo para este trabajo fue coleccionar muestras de 5 a 10 individuos por localidad, excepto en el caso de la población de *Chaetophractus villosus* de la provincia de Tierra del Fuego. Allí, la intención fue coleccionar la mayor cantidad posible de muestras debido a que uno de los objetivos planteados en el tema de esta tesis fue determinar la relación de dicha población con las eventuales continentales-fuente.

Las muestras se obtuvieron fundamentalmente durante 14 viajes de campaña diagramados específicamente para el desarrollo de este trabajo de investigación, y además, gracias al apoyo prestado por colaboradores externos en el marco del desarrollo de sus propias tareas de campo en distintos puntos del país. La recolección de ejemplares de la especie *Chaetophractus villosus* se realizó en diversas localidades de las siguientes provincias: Tucumán (Alberdi, Aguilares, Taco Ralo), Chaco (Reserva provincial Loro Hablador), Santa Fe (San Cristóbal, Laguna el Dientudo), Córdoba (Laboulaye), San Juan (Iglesia, colección CRICyT-IADIZA),

Buenos Aires (Pipinas, Punta Piedras, Verónica, Navarro, Uribelarrea, Azul, Bahía Blanca), La Pampa (Trenel, Winifreda), San Luis (Ea. La Luz, Nueva Galia, Ea. El Centenario), Mendoza (Lavalle), Chubut (Pla. Valdéz, Garayalde), Santa Cruz (Río Gallegos) y Tierra del Fuego (San Sebastián) (ver Tabla...). En algunos casos, también se aprovecharon las facilidades del apoyo prestado en distintos establecimientos rurales. Se colectaron muestras de 112 individuos.

El muestreo de ejemplares de la especie *Chaetophractus vellerosus* abarcó localidades de las siguientes provincias: Tucumán (Huasa Pampa, Graneros, Taco Ralo), Córdoba (Alcira), La Pampa (Trenel), Buenos Aires (Pipinas), Mendoza (Ñacuñán) y Santa Fé (San Cristóbal). Se colectaron muestras de 41 individuos.

2.2. Muestras, recolección y conservación

La captura de los animales se realizó manualmente y luego de la extracción de sangre fueron liberados en el sitio de captura. También se obtuvieron restos frescos de ejemplares utilizados para consumo por pobladores locales, y restos secos, con una conservación variable de sus partes. En pocos casos, debido a complicaciones en la extracción de sangre o directamente por ser la única opción, la muestra se obtuvo cortando un extremo del pabellón auricular del ejemplar. Algunos individuos fueron colectados

de aquéllos atropellados en caminos vecinales y rutas, en diferentes estados de conservación y preservación de partes. Los ejemplares de *Chaetophractus villosus* capturados en Tierra del Fuego, por su carácter de especie recientemente introducida (Poljak et al. 2007), y por un pedido de la Dirección de Fauna de dicha provincia por considerarla potencialmente invasora, fueron sacrificados. Esto se llevó a cabo mediante anestesia con una dosis acorde de ketamina (ver más abajo) y luego de 10 a 15 minutos, una inyección intracardíaca de 0,2 ml/kg de Euthanyle® (pentobarbital sódico 400 mg/ml y difenilhidantoína sódica 50 mg/ml). De estos especímenes se extrajeron muestras de sangre, hígado, bazo, músculo y el aparato digestivo completo para el estudio de endoparásitos en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (C.E.Pa.Ve, FCNyM - CONICET).

Durante la recolección en el campo, todas las muestras de tejido seco (cuero, cuero con pelo, tejido adherido a la cara interna de la coraza), fueron colocadas en tubos plásticos sin conservantes ni tratamiento alguno. Las de tejido húmedo, fresco o descompuesto (sobre todo músculo, también hígado y bazo), fueron trozadas en pequeñas porciones de 0,25 cm³ aproximadamente y colocadas en un tubo plástico con una solución de etanol-metanol 1:1, o alcohol 96° que cubría por completo la muestra y, siempre que fue posible, colocadas a -20 °C. Una vez en el laboratorio, se descartó el alcohol utilizado, renovándolo estrictamente por una solución de etanol-

metanol 1:1. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C para su conservación.

Los individuos capturados fueron anestesiados (ver más abajo) y en los casos en que la extracción de sangre falló, se les escindió una porción de uno de los pabellones auriculares, que fue conservada y almacenada en alcohol como se describió anteriormente.

Para la obtención de sangre, los individuos capturados fueron anestesiados con una dosis de 25-30 mg/kg de clorhidrato de ketamina 50 mg/ml aplicada mediante una inyección intramuscular en la cara externa de uno de los miembros posteriores. La punción para la extracción de sangre se realizó sobre la cara ventral de la cola en el punto que queda definido por la intersección entre el plano sagital, y una recta perpendicular y tangencial que pasa entre el primero y segundo anillos de placas del estuche caudal. La aguja fue introducida en dirección proximal, con una inclinación de 45° respecto de la parte distal de la cola y con el biselado hacia arriba. Como anticoagulante se utilizó heparina (0,1 a 0,2 ml cada 5 a 10 ml de sangre) o una solución de citrato de Na 0,063 mg/ml y ácido cítrico 0,172 mg/ml (1 ml cada 10 de sangre). Las muestras fueron congeladas a -20 °C en las siguientes 18 horas, aunque por circunstancias propias de los sitios de muestreo, en algunos casos se tardó hasta tres días en hacerlo. En este último caso, las muestras también dieron resultados positivos.

2.3. Extracción de ADN

2.3.1. A partir de muestras de tejido

La obtención del ADN a partir de muestras de tejido se llevó a cabo utilizando el método clásico con el uso de fenol - cloroformo - proteinasa K (Sambrook *et al.* 1989). Tanto el fenol como el cloroformo son solventes orgánicos más densos que el agua, que destruyen las membranas celulares arrastrando los restos al fondo de un gradiente de densidad dejando en la fase acuosa superior al ADN libre para su separación. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Pesar 300 mg de muestra de tejido fresco o 200 mg de tejido seco y colocarlo en una cápsula de Petri pequeña.
2. Lavar la muestra con 2 ml de una solución salina 0,15 M de etildiaminotetracético, sal disódica (EDTA). Descartar el líquido con pipeta.
3. Agregar 200 ul de sodio duodecil sulfato (SDS) y cortar finamente la muestra con tijeras.
4. Agregar 3 ml de EDTA (a).
5. Trasbasar a un tubo de polipropileno Falcon de 15 ml.
6. Agregar 200 ul de proteinasa K (a).
7. Incubar en estufa durante 28 horas a 37 °C (b).

8. Lavar por inversión con 1 volumen de fenol durante 10' y centrifugar a 3500 RPM durante 10'(c). Recuperar la fase acuosa sobrenadante con pipeta y trasvasar a un tubo nuevo.
9. Lavar por inversión con 1/2 volumen de fenol y 1/2 volumen de cloroformo durante 10' y centrifugar a 3500 RPM durante 10'. Recuperar la fase acuosa sobrenadante con pipeta y trasvasar a un tubo nuevo.
10. Lavar por inversión con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24) durante 10' y centrifugar a 3500 RPM durante 10'. Recuperar la fase acuosa sobrenadante con pipeta y trasvasar a un tubo nuevo.
11. Agregar 2 volúmenes de etanol a -20 °C para precipitar al ADN (d).
12. Extraer el ovillo de ADN con pipeta Pasteur ciega. Si no se obtiene ovillo, colocar el tubo a -70 °C durante 30' y luego ultra-centrifugar a 12.000 RPM durante 15-20'. Descartar el sobrenadante para obtener el pellet. Enjuagar con alcohol 70% para eliminar sales.
13. Secar a temperatura ambiente.
14. Resuspender en buffer T.E.

(a) Los volúmenes de los reactivos variaron de acuerdo al volumen de muestra utilizado o disponible y al recipiente en el que se llevó a cabo cada extracción (tubo de polipropileno de 15 ml o Eppendorf de 1,5 ml).

(b) El tiempo de incubación varió de acuerdo con la evolución del estado de degradación del tejido, ya que el tiempo de actividad de la

proteínasa K sobre muestras como por ejemplo las de hígado o de bazo fue menor que en el caso de muestras de piel, ya sean éstas provenientes de restos de individuos secados por acción del sol o muestras de tejido del pabellón auricular de individuos vivos.

(c) En los casos en los que la extracción se realizó en Eppendorfs de 1,5 ml de volumen, se ultra-centrifugó a 12.000 RPM durante 1'.

(d) En algunos casos se adicionó acetato de sodio 3M para mejorar la deshidratación del ADN y/o se sometió a la muestra a -80 °C durante 30'.

(e) El volumen utilizado varió de acuerdo al tamaño del ovillo o pellet de ADN.

Los buffers y soluciones se listan en el APÉNDICE de este capítulo.

2.3.2. A partir de muestras de sangre

La obtención de ADN a partir de muestras de sangre se llevó a cabo utilizando una adaptación del método rápido de extracción de ADN genómico de leucocitos de John *et al.* (1990), cuyos pasos fueron los siguientes:

1. Colocar en un tubo falcon 5 ml de sangre y agregar 1 volumen de *Solución 1* (10 mM Tris pH 7,6; 10 mM ClK; 10 mM Cl₂Mg) y 120 ul de SDS. Mezclar por inversión varias veces. Centrifugar 10' a 2000 RPM. Descartar sobrenadante.
2. Resuspender el pellet con 800 ul de *Solución 2* (10 mM Tris pH 7,6; 10 mM ClK; 10 mM Cl₂Mg; 0,5 M ClNa; 0,5 % SDS; 2mM EDTA) para lisar los núcleos. Transferir a un Eppendorf de 1,5 ml.
3. Agregar 400 ul de fenol y mezclar por inversión durante 10'. Micro-centrifugar 1' a 12.000 RPM y trasvasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
4. Agregar 200 ul de fenol y 200 ul de cloroformo-isoamílico (24:1) y mezclar por inversión durante 10'. Micro-centrifugar 1' a 12.000 RPM y trasvasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
5. Agregar 700 ul de cloroformo-isoamílico (24:1) y mezclar por inversión durante 10'. Micro-centrifugar 1' a 12.000 RPM y trasvasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
6. Agregar 2 volúmenes de etanol a -20 °C y mezclar por inversión para precipitar el ADN. Utilizar una pipeta Pasteur ciega para sacar el ovillo. (Si este no se formó, someter a la muestra a -80 °C durante 30 minutos y ultra-centrifugar durante 15' a 12.000 RPM; luego descartar el sobrenadante). Enjuagar con alcohol 70% y dejar secar a temperatura ambiente.
7. Resuspender en buffer T.E. (el volumen utilizado varió de acuerdo al tamaño del ovillo o pellet de ADN).

Los buffers y soluciones se listan en el APÉNDICE de este capítulo.

2.4. Control de calidad y cuantificación del ADN extraído

Una vez obtenido el ADN, se realizó un control de rutina para chequear su calidad y cuantificarlo. Para ello se sembraron 4 ul de cada muestra más 1 ul de buffer de carga en cada calle de un gel de agarosa 1 % (99 ml de buffer TBE, 1 g de agarosa y 1,5 ul de bromuro de etidio para la observación posterior del ADN en un transiluminador bajo luz ultravioleta) en una cuba de electroforesis GIBCO BRL™ modelo H5 (Horizontal Gel Electrophoresis System). Además, se sembró el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™) que posee 15 fragmentos de 100 a 1500 pb de longitud con una concentración de 25 ng/ml y una banda adicional de 2072 pb, como referencia de tamaño y concentración (ver Fig. 1). Para evitar que las muestras se difundan, se las corrió a 100 mv durante unos minutos y luego a 80 mv durante una hora aproximadamente. En los casos en que la corrida de una muestra en el gel presentó chorreado (“smear”), se la incubó 2 hs a 37 °C con ARNasa para descartar todo el ARN degradado debido al proceso de extracción del ADN, realizando posteriormente una nueva cuantificación. En los casos en los que la gran cantidad de ADN extraído dificultó su cuantificación debido al intenso brillo (Fig. 2.1, derecha), se procedió a realizar diluciones que permitieran obtener una solución adecuada para una mejor visualización y cuantificación final.

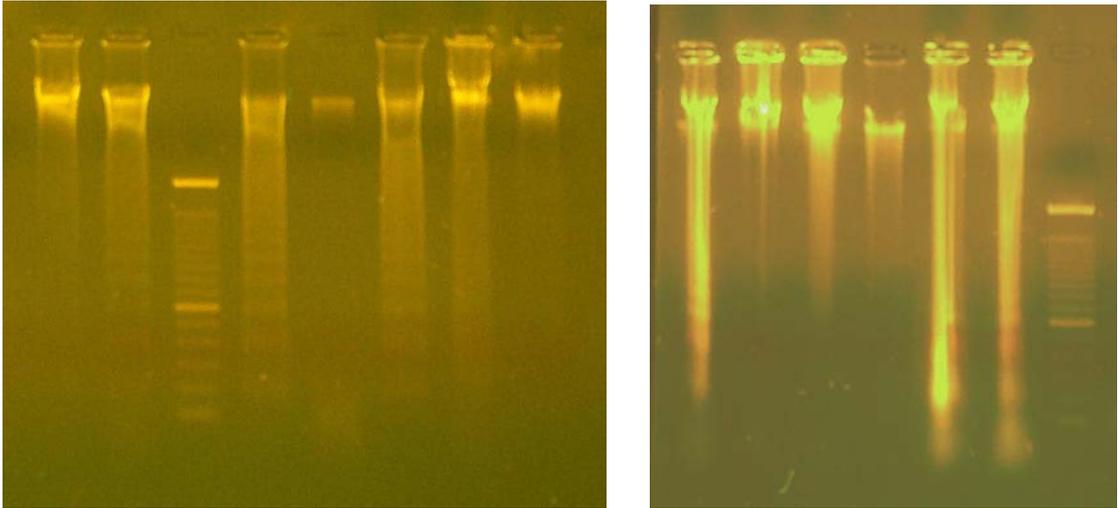


Fig. 2.1: ADN extraído de muestras de *Ch. villosus*. Izquierda: a partir de sangre; derecha: a partir de tejido.

2.5. Amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction)

La amplificación del fragmento de la Región Control o D-Loop, utilizado en este estudio, se realizó mediante el uso de los cebadores o “primers” universales: L15926: 5'-CAATCCCCGGTCTTGTAACC-3' y H16340: 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3', (Vila *et al.* 1999, Ducroz *et al.* 2005, Durka *et al.* 2005). Así, L y H designan a las cadenas livianas y pesadas (Light y Heavy) del ADN, y el número hace referencia a la posición correspondiente a la secuencia completa del ADN mitocondrial (ADNmt) de ratón (Bibb *et al.* 1981).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 y 50 μ l que comprendió 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen TM), 2,5 μ l de buffer de reacción para Taq polimerasa 10 X con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 mM de Cl_2Mg , 200 μ M de dNTP's y 5 pmol de cada primer. Para ello fueron utilizados dos termocicladores, uno fue un Biometra UNO, y el otro, un Thermo Hybaid MBS 0.2S (Electron Corporation). El perfil de tiempos y temperaturas ejecutado fue el mismo para ambos:

- 1) 4 min. a 94 °C (tiempo en el que se practicó hot start).
- 2) Desnaturalización durante 30 seg.
 Annealing durante 30 seg. a 55°
 Extensión durante 30 seg. a 72° C.
- 3) Extensión final durante 6 min. a 72 °C.

Los pasos del punto 2 se repitieron en 40 ciclos.

Luego de cada amplificación, se sembró un gel de agarosa 1% para control de la reacción (ver Fig. 2.2). Las amplificaciones de cada muestra con resultado positivo se repitieron de dos a seis veces de acuerdo a la cantidad del fragmento de interés obtenido en cada una de ellas.

2.6. Secuenciación del fragmento de ADN de la Región Control

Los productos de PCR doble cadena de cada individuo obtenidos en las sucesivas amplificaciones, fueron unidos en una única muestra que se precipitó con dos volúmenes de etanol a -20 °C. Luego, se centrifugó a 12.000 RPM durante 20 min para obtener un pellet de ADN que fue resuspendido en un volumen de buffer T.E. que varió de acuerdo con el tamaño de dicho pellet, de manera tal que la concentración de ADN en la solución aumente o disminuya según lo observado en los controles realizados luego de cada amplificación. El ADN amplificado se purificó por precipitación alcohólica utilizando 2 volúmenes de etanol absoluto y luego un enjuague con alcohol 70 %. Particularmente en el caso de las muestras con número de catálogo de laboratorio 186, 187, 194, 196 y 197, para su purificación fue utilizado el kit para productos de PCR QIAquick® (QIAGEN) por ser muestras de colección sobre las que los primeros intentos de purificación alcohólica y PCR fueron fallidos y por ende sospechadas de haber sido tratadas con productos químicos para su conservación, los cuales dañaron al ADN o impidieron su amplificación. La secuenciación fue llevada a cabo en el Servicio de Secuenciación y Genotipado del Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), de la Universidad de Buenos Aires, con un secuenciador automático ABI PRISM 3130 XL (Applied Biosystems™). Las secuencias (Fig. 2.3) fueron editadas manualmente con el programa Chromas 2.3 (<http://www.technelysium.com.au>) y alineadas con el programa Clustal W (Thompson et al. 1994).

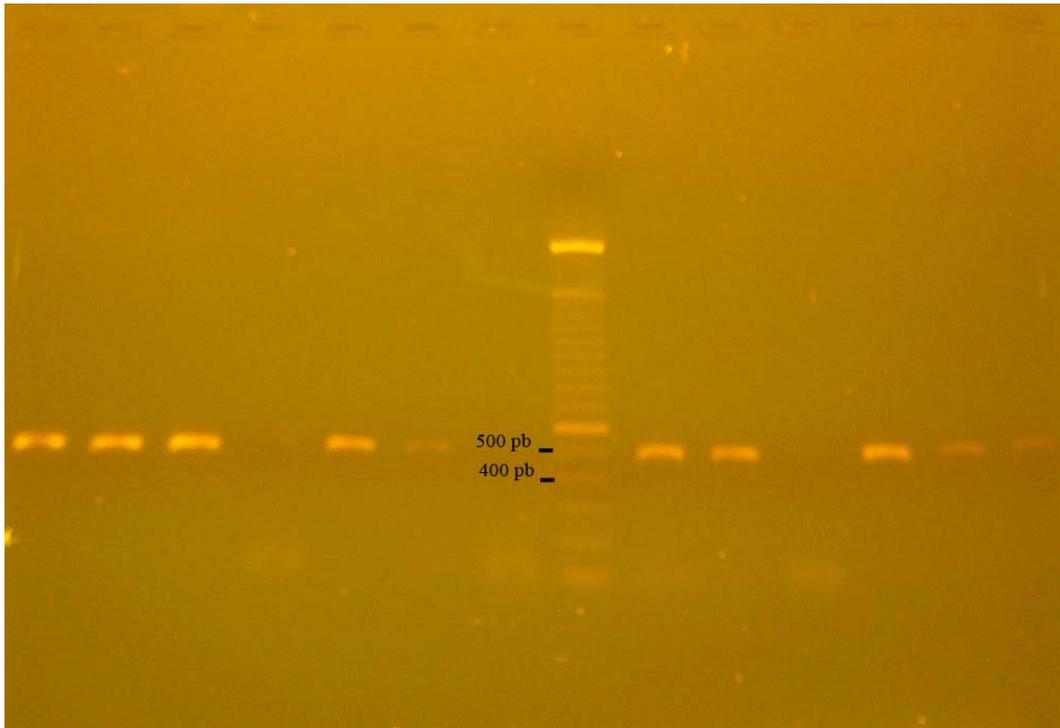


Fig. 2.2: PCR del fragmento de la Región Control. Las bandas de ADN de 400 y 500 pares de bases del marcador de peso molecular se encuentran señaladas.

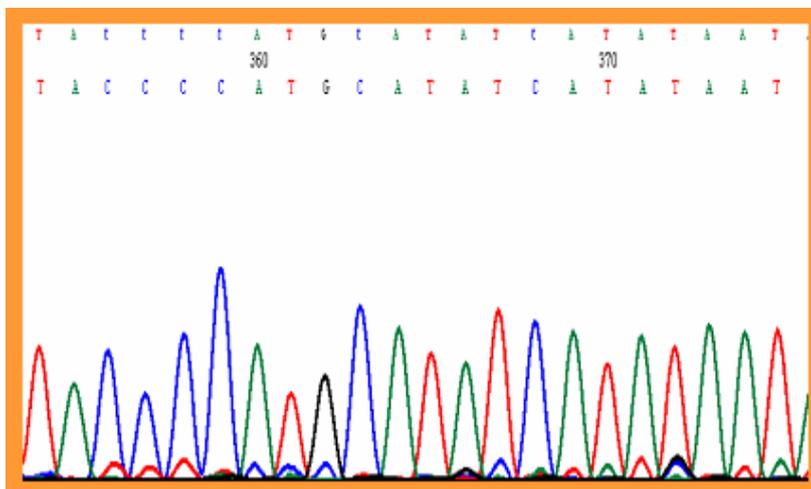


Fig. 2.3: segmento de la secuenciación de una porción de la RC de *Chaetophractus villosus*.

2.7. Análisis de las secuencias

2.7.1. Índices de diversidad molecular

Para estimar el nivel de polimorfismo de las secuencias de una población, pueden utilizarse índices basados en el número de sitios segregantes, o sitios nucleotídicos polimórficos de una muestra, como el parámetro poblacional θ . Éí se define como $\theta=2Mu$, donde M es igual a $2N$ para poblaciones diploides de tamaño N , o igual a N para poblaciones haploides, mientras que \underline{u} es la tasa de mutación total a nivel haplotípico. Otra forma de medir el polimorfismo en cuestión puede ser el promedio de las diferencias entre sitios (nucleótidos), entre todos los pares posibles de haplotipos (π), que se define como el número de diferencias nucleotídicas por sitio; es decir, para cada posición en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN, entre dos secuencias tomadas al azar, y que para un conjunto de secuencias es el valor promedio de dicha diferencia de nucleótidos (Nei y Li 1979). Aunque ambos índices se encuentran implícitos en tests estadísticos que se describen más adelante, en este trabajo se calculó π de manera explícita.

2.7.2. Detección de procesos demográficos

2.7.2.1. Test D de Tajima

Esta prueba compara estimadores del nivel de polimorfismo de las secuencias de una población como θ y π . Bajo un modelo de sitios infinitos (*infinite-site model*), no habría diferencia entre ambos valores, pero esta puede surgir si algún tipo de selección se encontrara actuando, si la población no se encuentra estable demográficamente, o existe una heterogeneidad de las tasas de mutación entre diferentes sitios.

Dicho de otra forma, si consideramos que la Teoría Neutralista (Kimura 1968, 1983), presupone un tamaño poblacional constante y apareamiento al azar, procesos como el de expansión poblacional, cuello de botella o apareamiento no aleatorio pueden generar valores significativos de este parámetro estadístico. Valores positivos, indican desvíos de la neutralidad hacia un exceso de variantes en frecuencias intermedias, lo que se interpreta como una selección equilibradora actuando sobre la población. En tanto que valores negativos, indican exceso de variantes con frecuencias bajas, es decir que la población pudo haber sufrido lo que se denomina un barrido selectivo reciente o una expansión poblacional.

2.7.2.2. Test Fs de Fu

Como el test de Tajima (1989a), el test de Fu (Fu, 1997) se basa en un modelo de sitios infinitos sin recombinación, y por ello

apropiado para secuencias cortas de ADN o para haplotipos obtenidos por RFLP. Evalúa la probabilidad de que en una muestra neutral al azar, se observe un número de alelos menor o similar que el valor observado dado un π (número de diferencias entre secuencias tomadas de a pares), tomado como un estimador de θ . Fu (1997), ha observado que el estadístico F_s es muy sensible al fenómeno de expansión demográfica de una población, el cuál generalmente lleva a valores negativos altos de este índice.

La significancia del estadístico F_s es testada mediante la generación de muestras al azar bajo la hipótesis de neutralidad selectiva y equilibrio poblacional, usando un algoritmo de simulación del coalescente, adaptado de Hudson (1990). El valor p del F_s se obtiene a través de la proporción de F_{ss} menores o iguales al F_s observado.

Para calcular la variabilidad genética del conjunto de secuencias obtenidas en este trabajo de tesis para cada especie por separado a través de la aplicación de los índices y tests mencionados más arriba, se utilizó el programa Arlequín versión 3.01 (Laurent y Excoffier 1998-2006). Además, con el mismo programa se calculó la composición de nucleótidos (%) y las frecuencias relativas de las secuencias parciales de la RC.

2.7.2.3. Distribución de las diferencias entre secuencias tomadas de a pares (*mismatch distribution*)

Para analizar la historia demográfica de las poblaciones con otra herramienta, y a modo comparativo con el estudio filogeográfico (ver más abajo), se calcularon las diferencias en modo pareado (pairwise differences) entre todos los pares posibles de secuencias. Para visualizar la distribución de dichas diferencias (mismatch distribution), se realizó un gráfico con el programa Network 4.5.0.2 (Fluxus Technology Ltd. 2004-2008). En otras palabras, la *mismatch distribution* es la distribución de π . Esta distribución es usualmente multimodal en muestras tomadas de poblaciones en equilibrio demográfico, ya que refleja la forma altamente estocástica de los árboles de genes. Por otro lado, normalmente es unimodal en el caso de poblaciones que han atravesado un gran aumento demográfico reciente (Rogers & Harpending 1992, Hudson & Slatkin 1991), o una expansión del rango de distribución (Ray et al. 2003, Excoffier 2004).

Para comparar la distribución de las diferencias observadas entre pares de secuencias, con las esperadas, también se utilizó el Arlequin 3.01.

2.7.3. Red de haplotipos utilizando median-joining

Con el fin de visualizar todas las relaciones que surgieron entre los haplotipos de ambas especies se construyó una red utilizando el algoritmo Median-Joining para cada una de ellas. En

este caso, en el gráfico resultante pueden verse relaciones conflictivas entre haplotipos, como por ejemplo en la que uno se une a dos haplotipos diferentes o incluso uniones de carácter circular. Es necesario remarcar esto ya que en el NCA (Análisis de Clados Anidados) estas relaciones que no son únicamente recíprocas (sin ambigüedad) se eliminan según ciertas reglas (ver mas abajo).

2.8. Análisis filogeográfico

Se llevó a cabo un Análisis de Clados Anidados (Nested Clade Analysis -NCA-) (Templeton 1998) sobre el conjunto de secuencias parciales de la RC de *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* obtenidas, utilizando la última actualización de la clave de Templeton (2006). El objeto del estudio fue detectar patrones filogeográficos estadísticamente significativos entre las secuencias de ADN. Específicamente, el NCA pone a prueba la asociación o agrupamiento geográfico *no al azar* de las secuencias y permite inferir qué procesos históricos podrían haber modelado la distribución geográfica de los haplotipos.

Se utilizó el programa TCS 1.13 (Clement *et al.* 2001) para construir una red de haplotipos según Templeton *et al.* (1992), cuyas ambigüedades fueron resueltas siguiendo los criterios sugeridos por Crandall y Templeton (1993) que indican que es más probable que

un haplotipo se una a uno más frecuente que a otro menos frecuente, y que un haplotipo se unirá más probablemente a otro que provenga de la misma población, que a uno de procedencia diferente. Luego, la red de haplotipos fue convertida manualmente en una serie de clados, o agrupamientos de haplotipos, usando las reglas definidas en Templeton *et al.* (1987). Ellos, por agrupamientos sucesivos, van conformando conjuntos más inclusivos y de mayor jerarquía, de manera que un conjunto en un nivel jerárquico pasa a ser un subconjunto en el nivel siguiente. La asociación entre haplotipos y su distribución geográfica, fue puesta a prueba mediante un análisis permutacional exacto de contingencia para cada clado, y calculando el estadístico chi-cuadrado entre clados vs. su ubicación geográfica. Esto revela si los haplotipos se encuentran significativamente asociados geográficamente, pero no brinda información acerca de si su dispersión es mayor o se encuentran más restringidos geográficamente que lo esperado por azar (Templeton *et al.* 1995). Para obtener información acerca de posibles eventos históricos que afectaron a la población estudiada, como expansión del rango de distribución, colonización, o fragmentación, el programa lleva a cabo un análisis adicional utilizando las distancias geográficas entre los sitios de proveniencia de los individuos. Partiendo de las expectativas según la hipótesis nula de *no asociación geográfica*, se calcularon dos distancias para cada clado en cada nivel jerárquico: i) **distancia del clado** (D_c), que es la distancia media entre los elementos que conforman un clado y

su centro geográfico; y, **ii) *distancia del clado anidado*** (D_n), que es la distancia media entre los elementos que conforman un clado (o clados) y el centro geográfico del clado de nivel jerárquico superior que lo (o los) contiene (Templeton *et al.* 1995). Además, el programa calcula la media de las distancias geográficas entre los elementos ubicados en los extremos de la red (*tip*) y en el interior (*interior*) dentro de un grupo o clado (I-T c), y las distancias geográficas entre los clados *tip* y los *interior* del clado de nivel jerárquico superior que los contiene.

Los cálculos de asociación geográfica se realizaron con 10000 permutaciones con el programa GEODIS 2.5 (Posadas *et al.* 2000), y los resultados fueron interpretados biológicamente utilizando la clave de inferencias de Templeton (2006).

2.9. Comparación estructural de las secuencias con las de otros Órdenes de mamíferos

Como ya fue mencionado en el Capítulo I, el orden Xenarthra es uno de los cuatro clados de placentarios, y su historia evolutiva, íntimamente relacionada con la historia geológica y climática de Sudamérica, se desarrolló con independencia de los otros clados mientras dicho continente permaneció esencialmente aislado hasta la emergencia del corredor continuo del Istmo de Panamá, durante el Plioceno tardío, hace unos 3 a 2,5 Ma.

Orden	Organismo	Nombre vulgar	Nº de acc.EMBL	Longitud RC
Primates	Hylobates lar	gibón	X99256	1029
	Homo sapiens	humano	V00662	1122
	Pan troglodytes	chimpancé común	X93335	1112
	Pan paniscus	chimpancé pigmeo	D38116	1121
	Gorilla gorilla	gorila	D38114	918
	Pongo pigmaeus	orangután	D38115	917
Rodentia	Mus musculus	ratón	V00711	879
	Rattus norvegicus	rata	X14848	894
	Glis glis	lirón	Y11137	1157
Lagomorpha	Oryctolagus cuniculus	conejo europeo	X54172	966*
Cetacea	Cephalorhynchus commersonii	delfín de Commerson	****	891
	Kogia breviceps	cachalote	X72201	940
	Balaena mysticetus	ballena de Groenlandia	X72197	917
Artiodactyla	Bos taurus	vaca	V00654	910
	Ovis aries	oveja	L29055	934*
Perissodactyla	Diceros bicornis	rinoceronte negro	L22010	1050*
	Equus asinus	burro	X97337	959*
	Equus caballus	caballo	X79547	960*
Insectivora	Crocidura russula	musaraña gris	X78793	1079*
	Sorex araneus	musaraña de eurasia	X78796	1048*
	Erinaceus europaeus	erizo	X88898	1403*
Carnivora	Halichoerus grypus	foca gris	X72004	996*
	Phoca vitulina	foca de la bahía	X63726	995*
	Mirounga angustirostris	elefante marino	S66015	1071*
	Felis catus	gato	U20753	1106*
Marsupialia	Didelphis virginiana	comadreja	Z29573	1193*
Monotrema	Ornithorhynchus anatinus	ornitorrinco	X83427	1169*

Tabla 2.1: (Extraída y modificada de Sbisà *et al.* 1997). Mamíferos con los que se comparó la secuencia parcial de Chaetopractus. EMBL: European Molecular Biology Laboratory; los números con asterisco (*) corresponden a secuencias en las que fueron eliminadas las repeticiones; el cuádruple asterisco (****) indica que la secuencia no está disponible en el EMBL sino en (Southern *et al.* 1988).

Por otro lado, dado que la RC posee elementos muy conservados entre los vertebrados que ya han sido brevemente descritos en este trabajo (como los ETAS), adicionalmente al estudio filogeográfico se compararon las secuencias del género

Chaetophractus con las de representantes de otros 10 órdenes de mamíferos extraídas de la bibliografía. Esta comparación se llevó a cabo desde una óptica evolutiva a una escala mayor dado que, como se acaba de mencionar, Xenarthra conforma uno de los clados de mamíferos Placentarios.

Para ello se calcularon manualmente los porcentajes de bases que conforman los dominios ETAS y Central, y se los compararon con un promedio de los valores de 27 especies pertenecientes a 10 órdenes de mamíferos diferentes (Sbisà et al. 1997; Tabla 2.1).

Adicionalmente, se determinaron la posición, la longitud y el grado de conservación de los elementos estructurales ETAS 1 y ETAS 2 en las secuencias de *Chaetophractus*, comparándolas con las de los otros grupos considerados.

APÉNDICE

MATERIALES Y

MÉTODOS

I: Soluciones

➤ Solución stock de 200 ml de etil-diamino-tetracético sal disódica (EDTA, pM 372,24 grs) 0,5 M:

- 37,2 grs EDTA
- 180 ml de H₂O destilada
- Llevar a pH 8 con NaOH (7 grs aproximadamente)
- Completar con agua destilada hasta 200 ml
- Agitar hasta disolver.

➤ Solución stock de 500 ml de detergente sodio duodecil sulfato (SDS) 20 %:

- 100 grs de SDS en polvo
- Llevar a 500 ml con H₂O destilada
- Agitar hasta disolver

➤ Tris-Cloruro 1M pH 8 (500 ml):

- 60,57 grs de Tris
- Agregar 400 ml de H₂O destilada
- Agitar hasta disolver
- Agregar HCl hasta pH>7,8
- Completar con H₂O destilada hasta 500 ml

➤ Buffer T.E.(1 lt):

- Tris 0,01M (10mM) (10 ml de Tris 1M pH 8 en 1lt de solución)
- EDTA 0,001M (1mM) (2 ml de EDTA 0,5M en 1 lt de solución)
- 988 ml de H₂O destilada

➤ Solución 1 (250 ml):

- 10mM Tris base pH 7,6 (1,25 ml de Tris base 1M)
- 10 mM KCl (0,185 grs)
- 10 mM MgCl₂•6H₂O 10 mM (0,5 grs)
- Completar hasta alcanzar 250 ml con H₂O destilada
- Filtrar

➤ Solución 2 (250 ml):

- 1,25 ml de Tris base 0,01M (12,5 ul de Tris base 1 M)
- KCl 10 mM (0,19 grs)
- MgCl \cdot 6H $_2$ O 10 mM (0,51 grs)
- NaCl 0,5 M (7,31 grs)
- SDS 20% 0,5 M (6,25 ml)
- EDTA 2mM (0,19 grs)
- Completar hasta alcanzar 250 ml con H $_2$ O destilada
- Filtrar

➤ Buffer TBE 5X:

- 54 grs de Tris base
- 27,5 grs de ácido bórico
- 20 ml de EDTA 0,5M pH 8
- Llevar a 1 lt con H $_2$ O destilada.

II: Muestras

Nº	ESPECIE	SEXO	PROCEDENCIA	TEJIDO
5	Ch. villosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	M
6	Ch. villosus	?	Bahia Blanca, Buenos Aires	H,B,M
7	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,M,B
8	Ch. villosus	macho	Alberdi, Tucumán	H,B,M
17	Ch. villosus	macho	Navarro, Buenos Aires	S
20	Ch. villosus	?	Pipinas, Buenos Aires	H
21	Ch. villosus	?	Pipinas, Buenos Aires	H
22	Ch. villosus	?	Pipinas, Buenos Aires	H
30	Ch. villosus	hembra	Bahia Blanca, Buenos Aires	H,B,M
38	Ch. villosus	hembra	Garayalde, Chubut	S
42	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
43	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
44	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
45	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
46	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
47	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
48	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
49	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
50	Ch. villosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
54	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
55	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
56	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
60	Ch. villosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S, H, B, M
61	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M,S
62	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
63	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
64	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
65	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
66	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
67	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
68	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M,S
69	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
70	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S y tej. testicular
71	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
72	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
73	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
74	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
75	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
76	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
77	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
78	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
79	Ch. villosus	hembra	Trenel, La Pampa	S
80	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
81	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
82	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
83	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
84	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
85	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
86	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S

Nº	ESPECIE	SEXO	PROCEDENCIA	TEJIDO
87	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
91	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
92	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
93	Ch. villosus	macho	Trenel, La Pampa	S
102	Ch. villosus	hembra	Aguilares, Tucuman	S
105	Ch. villosus	hembra	Uribelarrea, Buenos Aires	S
107	Ch. villosus	macho	La Pampa	S
108	Ch. villosus	macho	La Pampa	M y tej. testicular
109	Ch. villosus	macho	La Pampa	M y tej. testicular
120	Ch. villosus	hembra	Taco Ralo, Tucuman	S
123	Ch. villosus	?	Loro Hablador, Chaco	H
124	Ch. villosus	macho	Loro Hablador, Chaco	H
127	Ch. villosus	macho	Punta Piedras, Buenos Aires	M
128	Ch. villosus	?	Punta Piedras, Buenos Aires	M
129	Ch. villosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S
130	Ch. villosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	S
131	Ch. villosus	macho juv.	Loro Hablador, Chaco	S
134	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
135	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
136	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
137	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
138	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
139	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
140	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
141	Ch. villosus	macho	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
142	Ch. villosus	hembra	San Sebastián, Tierra del Fuego	H,B,M
143	Ch. villosus	macho	Tolhuin, Tierra del Fuego	H,B,M
146	Ch. villosus	?	Ea. la Luz, San Luis	M
147	Ch. villosus	?	R10, 60km W.de Winifreda, La Pampa	M
148	Ch. villosus	?	Ruta 148, San Luis	M
149	Ch. villosus	?	Nueva Galia, San Luis	M
150	Ch. villosus	macho	Ea. El Centenario, San Luis	S y PA
151	Ch. villosus	hembra	R35, 16 km S. de Winifreda, La Pampa	M
152	Ch. villosus	?	R13 Buena Esperanza, San Luis	M
154	Ch. villosus	?	Ea. El Centenario, San Luis	cuero y M secos
155	Ch. villosus	?	Ea. El Centenario, San Luis	cuero y M secos
156	Ch. villosus	?	Veronica, Buenos Aires	PA
159	Ch. villosus	macho	Laboulaye, Cordoba	M
160	Ch. villosus	?	Ea. El Centenario, San Luis	PA
161	Ch. villosus	?	Ea. El Centenario, San Luis	PA
162	Ch. villosus	?	R10 km 215, La Pampa	M
171	Ch. villosus	?	Lavalle, Mendoza (colección CRICyT)	cuero con pelos
172	Ch. villosus	macho	80 km S. Iglesia, San Juan (colección CRICyT)	cuero con pelos
173	Ch. villosus	?	Ea. El Centenario, San Luis	PA
174	C. villosus	hembra	R3 80km N de R.Gallegos, Santa Cruz	M
177	Ch. villosus	?	PN El Chalten, Santa Cruz	cuero seco
178	Ch. villosus	?	10km S. R.Gallegos, Santa Cruz	cuero seco
183	Ch. villosus	macho	Azul, Buenos Aires	M
184	Ch. villosus	macho	Azul, Buenos Aires	M
185	Ch. villosus	macho	Azul, Buenos Aires	M

Nº	ESPECIE	SEXO	PROCEDENCIA	TEJIDO
187	Ch. villosus	macho	San Cristoba, Santa Fé	M
188	Ch. villosus	macho	Laguna El Dientudo, Santa Fé	PA
189	C. villosus	macho	Taco Ralo, Tucuman	PA y cuero secos
190	C. villosus	?	Taco Ralo, Tucuman	cuero seco
191	Ch. villosus	?	Taco Ralo, Tucuman	cuero seco
192	Ch. villosus	macho	Itsmo Ameghino, Península Valdés	H
193	Ch. villosus	?	Ea. La Irma, Península Valdés	PA
194	Ch. villosus	?	Ea. Santa Maria, Península Valdés	PA
195	Ch. villosus	hembra	Ea. San Pablo, Península Valdés	PA
197	Ch. villosus	?	Pedro Luro, Buenos Aires	M
198	Ch. villosus	?	San Cristóbal, Santa Fé	cuero seco

Nº	ESPECIE	SEXO	PROCEDENCIA	TEJIDO
4	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
13	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
14	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
15	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	H,M
16	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
18	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,M
19	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,M
23	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S
24	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	S
25	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S
29	Ch. vellerosus	?	Pipinas, Buenos Aires	H
31	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
32	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	H,B,M
33	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	S
34	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S
35	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	S
39	Ch. vellerosus	macho	Pipinas, Buenos Aires	S
41	Ch. vellerosus	hembra	Pipinas, Buenos Aires	S
88	Ch. vellerosus	macho	Trenel, La Pampa	S
89	Ch. vellerosus	macho	Graneros, Tucumán	S
94	Ch. vellerosus	macho	Huasa Pampa, Tucumán	S
95	Ch. vellerosus	macho	Taco Ralo, Tucumán	S, H, B
96	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
97	Ch. vellerosus	macho	Taco Ralo, Tucumán	S
98	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
99	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
100	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
101	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
103	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S, H, B
104	Ch. vellerosus	hembra	Taco Ralo, Tucumán	S
118	Ch. vellerosus	macho	Taco Ralo, Tucumán	S
119	Ch. vellerosus	macho	Taco Ralo, Tucumán	S
166	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza (colección CRICyT)	cuero seco
167	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza (colección CRICyT)	cuero seco
168	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza (colección CRICyT)	cuero seco
169	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza (colección CRICyT)	cuero seco
170	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza (colección CRICyT)	cuero seco
175	Ch. vellerosus	?	Alcira, Córdoba	M
176	Ch. vellerosus	?	Ñacuñán, Mendoza	PA y cuero secos
199	Ch. vellerosus	?	Museo San Cristóbal - Santa Fé	cuero seco
200	Ch. vellerosus	?	Museo San Cristóbal - Santa Fé	cuero seco

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. *Chaetophractus villosus*

3.1.1. Muestreo

Se realizaron 14 viajes de campaña, además de la invaluable colaboración de terceros (colegas, trabajadores rurales, etc.) que facilitaron la obtención del material de estudio. Un total de 112 muestras y/o ejemplares completos provenientes de 26 sitios o localidades de muestreo fueron colectados.

Básicamente, 36 muestras fueron descartadas del estudio debido a los siguientes motivos:

1. un balance previo del número de muestras por localidad (como las 34 provenientes de la localidad pampeana de Trenel, de las cuales sólo se secuenciaron 10),
2. la imposibilidad de extraer ADN de calidad suficiente para amplificar el segmento de interés a través de la técnica de PCR
3. inconvenientes relacionados con la secuenciación.

De acuerdo a lo mencionado, 76 muestras de *Chaetophractus villosus* fueron analizadas en este estudio, 20 de ellas fueron colectados en la provincia de Tierra de Fuego (TDF), específicamente en San Sebastián (Poljak *et al.* 2007). Todos los ejemplares colectados en dicha localidad fueron utilizados en este estudio para poder determinar el origen y la relación de esta

población introducida respecto de la continental fuente (ver Capítulo I y IV)

El rango de distancia de separación entre los puntos geográficos incluidos en este análisis varió entre 27 km y, excepcionalmente hasta 800 km (como entre los puntos 18 y 19 de la Fig. 3.1). Debido a tales diferencias, como la distancia que separaba a algunos lugares de muestreo entre sí era muy pequeña respecto de las distancias a otros puntos de recolección, en tres casos se realizó un agrupamiento de dos o más puntos en uno solo. Así, el sitio 14 de la Tabla 3.II denominado Pip-PtaPied-Ver corresponde a las localidades de Pipinas, Punta Piedras y Verónica; el sitio 11, denominado Winifreda, corresponde a dos puntos ubicados uno a 50 km al oeste y otro a 16 km al sur de dicha localidad; el número 9, Ea. La Luz, corresponde a la estancia misma y a un punto a 27 km al oeste y por último, el sitio número 19, Río Gallegos, corresponde a un punto a 60 km al norte y otro a 10 km al sur de esta ciudad.

Además se menciona que, debido al grado de degradación de la muestra, no fue posible extraer ADN del único individuo proveniente de la localidad de Iglesia (norte de la provincia de San Juan) depositado en la colección del IADIZA, Por todo lo expuesto el número de localidades o sitios utilizados en el estudio fue de 20 (ver Fig. 3.1 y Tabla 3.II). Cabe destacar que una prospección de la presencia de *Chaetophractus villosus* en el sudoeste de la provincia de Entre Ríos no arrojó resultados positivos.

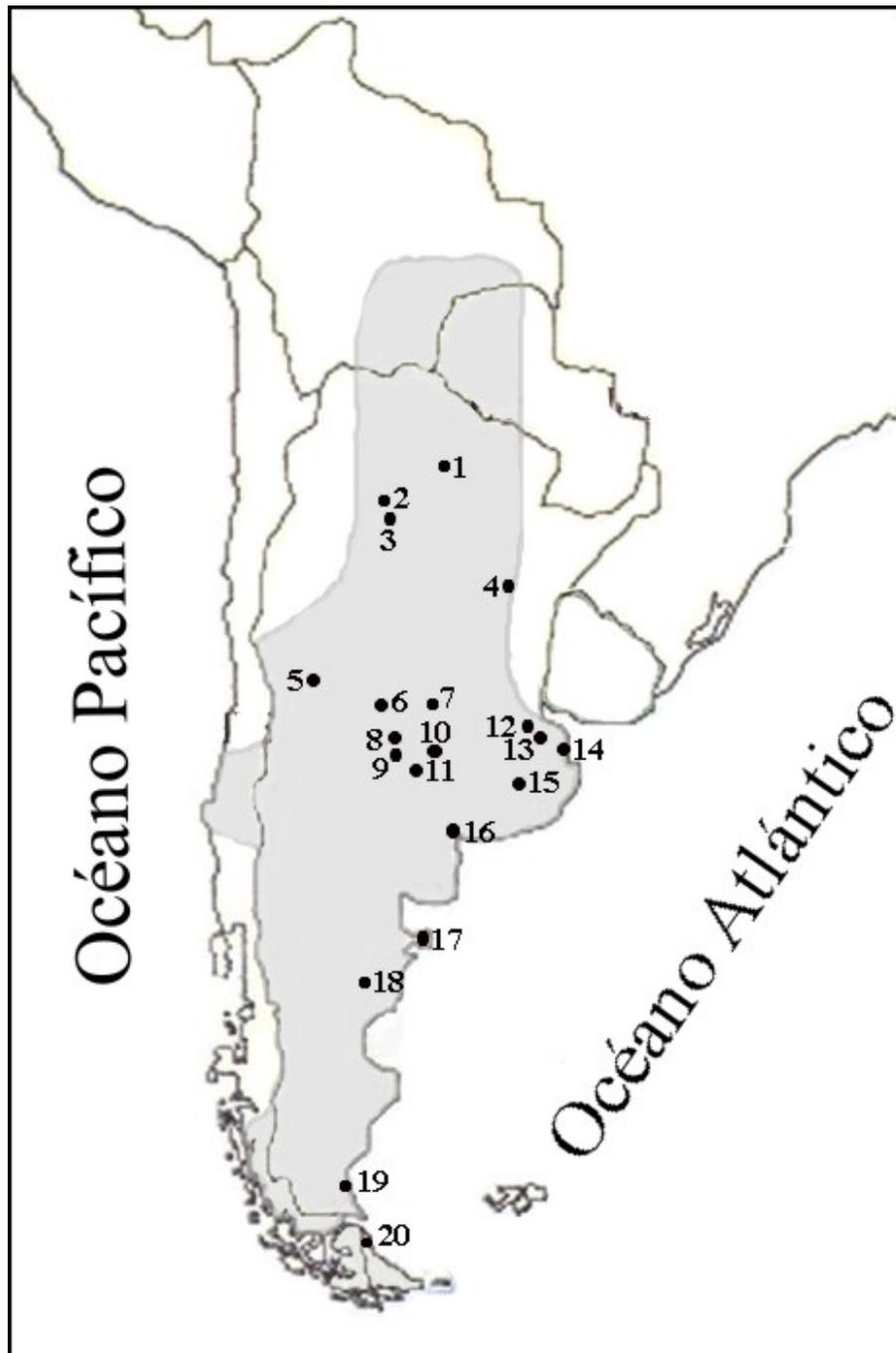


Fig. 3.1: Distribución de las 20 localidades/puntos de muestreo de *Chaetophractus villosus* en Argentina (ver Tabla I para la descripción de las localidades y el tamaño muestral). El área sombreada con gris indica la distribución de la especie.

3.1.2. Variabilidad de las secuencias

El análisis de las secuencias de los 76 peludos reveló la existencia de los primeros 17 haplotipos de la RC descritos para esta especie, que fueron depositados en el GenBank (DQ 136314-17, EU 019190-94, EU 100942-44, FJ 544909-14). Se obtuvieron secuencias parciales cuya longitud fue de 484 pb, las cuales fueron editadas y corregidas manualmente con el programa Chromas 2.3 (Technelysium Pty. Ltd. 1998-2004, disponible en <http://www.Technelysium.com.au>). Las secuencias alineadas por CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) mostraron 12 mutaciones de punto o sitios polimórficos (ver Anexo). En particular todos los cambios detectados fueron transiciones con un desvío hacia las de tipo Citosina-Timina (Tabla 3.I).

Huchon *et al.* (2002) mencionaron el fenómeno de heteroplasmia (es decir la presencia de secuencias diferentes obtenidas a partir de la utilización de los mismos promotores o *primers* sobre el ADN proveniente de distintas mitocondrias del mismo individuo). Sin embargo, no hubo evidencias de ello en las secuencias de ADN de las especies *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*, analizadas en este trabajo de tesis.

Los haplotipos hallados, frecuencias relativas, sitios polimórficos y números de acceso al depósito de las secuencias en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se presentan en la Tabla 3.I, mientras que las localidades de

Haplotipo	6	13	20	177	204	214	238	289	295	311	335	348	n	Frec. Rel.	n° acc. GenBank
HA	G	T	G	T	C	C	C	C	T	G	G	A	17	0,22368	DQ 136314
HB						T							3	0,03947	DQ 136315
HC									C				28	0,36842	DQ 136316
HD		C								A			4	0,05263	DQ 136317
HE	A												2	0,02631	EU 019190
HF				T				T	C				1	0,01315	EU 019191
HG										A			5	0,06578	EU 019192
HH									C	A			1	0,01315	EU 019193
HI											A		2	0,02631	EU 019194
HJ				C				T	C	A	A		2	0,02631	EU 100942
HK									C		A		1	0,01315	EU 100943
HL										A	A		5	0,06578	EU 100944
HM							T		C				1	0,01315	FJ 544909
HN									C	A	A		1	0,01315	FJ 544910
HO			A	C			T			A	A	G	1	0,01315	FJ 544911
HP			A				T			A	A	G	1	0,01315	FJ 544912
HQ				C					C	A	A		1	0,01315	FJ 544913

Tabla 3.I: HA-HQ: haplotipos de *Chaetophractus villosus*; 6 - 348: sitios polimórficos en la secuencia de 484 pb; n: número de individuos que poseen el haplotipo correspondiente; Frec.Rel: frecuencia relativa; n° acc. GenBank: número de acceso al depósito del haplotipo en la base de datos del GenBank.

procedencia de los ejemplares, la cantidad de individuos por localidad y sus haplotipos correspondientes se listan en la Tabla 3.II.

Utilizando el programa Arlequín versión 3.0 (Excoffier *et al.* 1992, 2006) se calculó la composición de nucleótidos promedio de las secuencias, que fue C: 26.54%; T: 29.66%; A: 30.68%; G: 13.12% y la diversidad nucleotídica (π) fue de 0.003781 +/- 0.002436.

Sitio	Provincia	Localidad	n	Haplotipo (nº de individuos)
1	Chaco	Loro Hablador	3	HI(2) HK(1)
2	Tucumán	Aguilares	1	HL(1)
3	Tucumán	Taco Ralo	3	HQ(1) HO(1) HP(1)
4	Santa Fé	Lag. El Dientudo	1	HL(1)
5	Mendoza	Lavalle	1	HN(1)
6	San Luis	Ea. El Centenario	4	HG(1) HA(2) HM(1)
7	Córdoba	Laboulaye	1	HG(1)
8	La Pampa	Nueva Galia	1	HA(1)
9	San Luis	Ea. La Luz	2	HL(1) HJ(1)
10	La Pampa	Trenel	15	HA(7) HG(3) HB(1) HC(1) HL(1) HE(1) HJ(1)
11	La Pampa	Winifreda	2	HD(1) HA(1)
12	Buenos Aires	Navarro	1	HA(1)
13	Buenos Aires	Uribebarrea	1	HF(1)
14	Buenos Aires	Pip.-PtaPied-Ver	10	HB(2) HA(3) HD(3) HH(1) HC(1)
15	Buenos Aires	Azul	3	HC(1) HL(1) HE(1)
16	Buenos Aires	Bahia Blanca	2	HA(2)
17	Chubut	Pla. Valdés	2	HC(2)
18	Chubut	Garayalde	1	HC(1)
19	Santa Cruz	Río Gallegos	2	HC(2)
20	Tierra del Fuego	San Sebastián	20	HC(20)

Tabla 3.II: procedencia de los individuos de la especie *Chaetophractus villosus*, cantidad de individuos por sitio de muestreo y sus haplotipos: HA-HQ.

3.1.3. Demografía y red de haplotipos utilizando median-joining (MJ)

3.1.3.1. Distribución de las diferencias entre secuencias (mismatch)

La media de las diferencias pareadas (*pairwise differences*) entre las secuencias parciales de la RC de los 76 peludos fue de 1.829 +/- 1.06, el desvío S= 2.38 y el porcentaje de diferencias entre secuencias varió entre 0 y 1,9 % (Fig. 3.2).

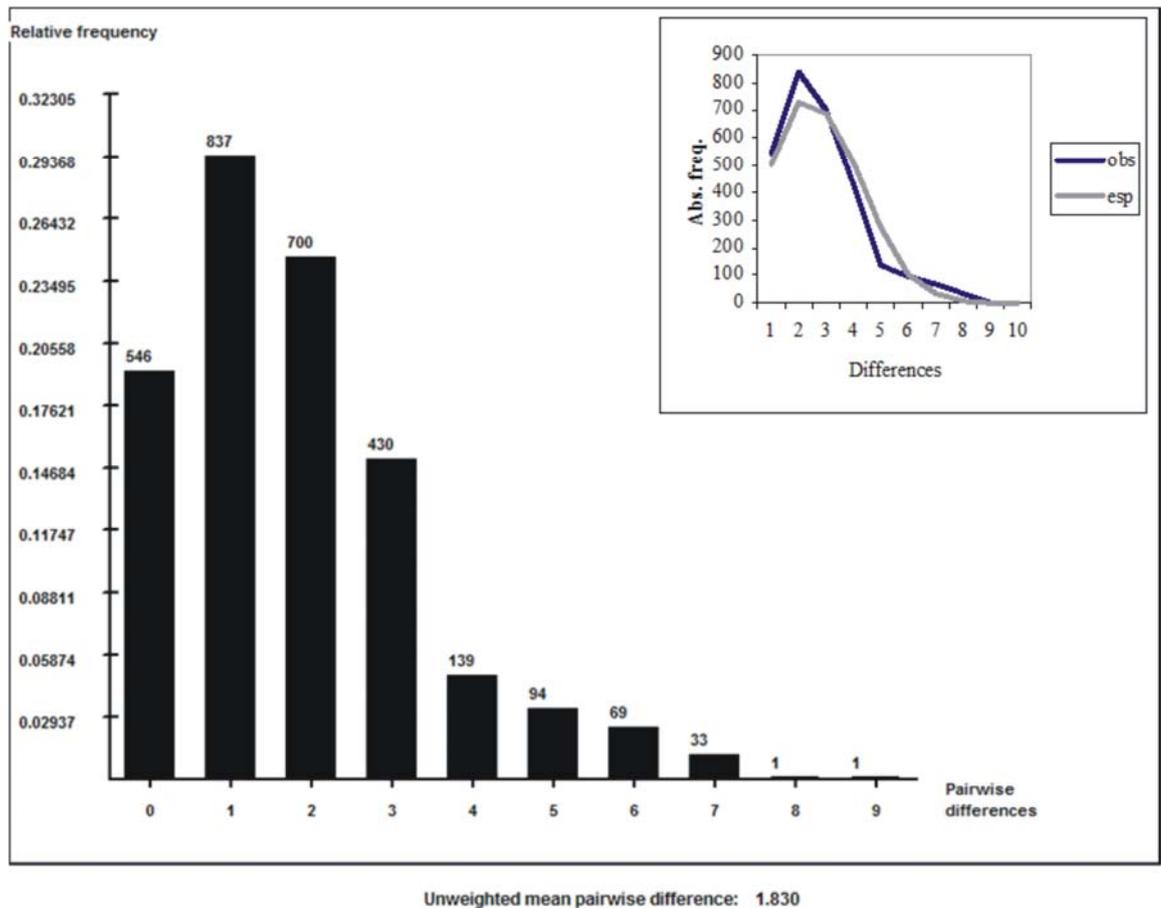


Fig. 3.2: Frecuencias relativas observadas en función del número de diferencias pareadas. Los valores sobre las barras indican la cantidad de pares de secuencias de todas las posibles combinaciones entre los 76 individuos (frecuencia absoluta) que presentan el número de diferencias que figura en la base de cada barra. En el gráfico superior derecho de la figura se encuentran representadas las frecuencias absolutas observadas y esperadas en función del número de diferencias pareadas.

3.1.3.2. Tests de neutralidad

El resultado del test de neutralidad de Fu fue significativo, con un valor de $F_s = -8.63207$ ($p: 0.001$), mientras que el de Tajima fue $D = -0.69809$ ($p: 0.269$), no significativo.

3.1.3.3. Red de haplotipos utilizando median-joining

La red utilizando median-joining que muestra la relación entre los haplotipos se muestra en la Fig. 3.3.

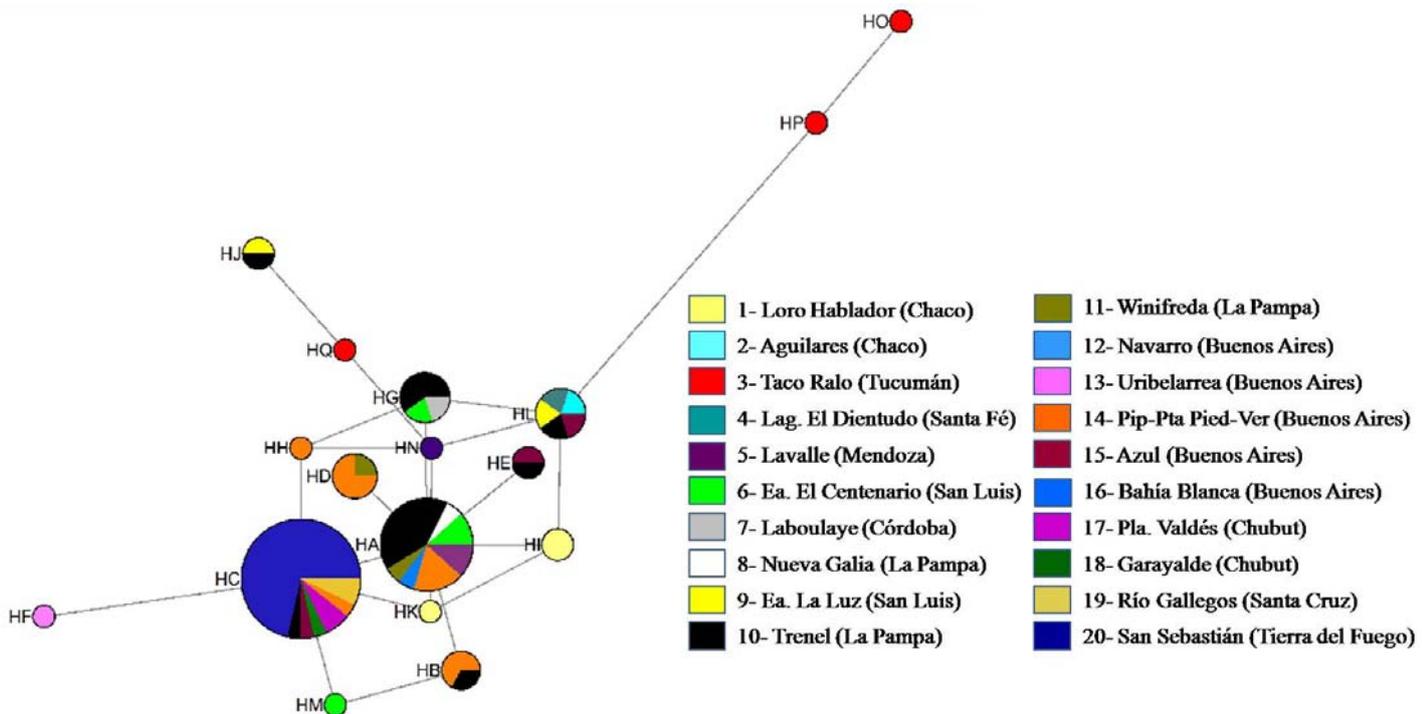


Fig 3.3: Red de haplotipos de *Chaetophractus villosus* utilizando el algoritmo median-joining. Cada círculo representa un haplotipos. Cada color representa una

localidad. El tamaño de las áreas de diferentes colores en cada uno de los círculos es proporcional a la frecuencia de aparición del haplotipo en la localidad. Obsérvese la ausencia de haplotipos hipotéticos.

3.1.4. Análisis filogeográfico

La Fig. 3.4 presenta la red conformada por los 17 haplotipos de la RC detectados entre los 76 individuos de *Chaetophractus villosus* y muestra otros 3 haplotipos denominados hipotéticos, generados por el programa. De esta forma todos los haplotipos de la red se diferencian del más próximo por una sola mutación de punto. El análisis también contempla la construcción de agrupamientos o clados siguiendo una estructura jerárquica de anidamientos, de manera que los clados de un nivel o jerarquía son sub-clados en el nivel siguiente. Los haplotipos en sí mismos representan los clados de nivel 0. En consecuencia, la red resultante del presente trabajo esta conformada por los haplotipos (nivel 0) y por clados de primero, segundo y tercer nivel.

El haplotipo HA ubicado en el centro de la red, domina el clado 2.2 de posición interior con respecto a todos los demás (Fig. 3.4), lo cuál indica que resultó el más frecuente entre las localidades muestreadas, en 7 de ellas en este caso. También resulta el más frecuente entre todos los haplotipos de dicha red y además posee alta frecuencia absoluta. Estas características, fundamentalmente la primera de las mencionadas, resultan importantes para determinar

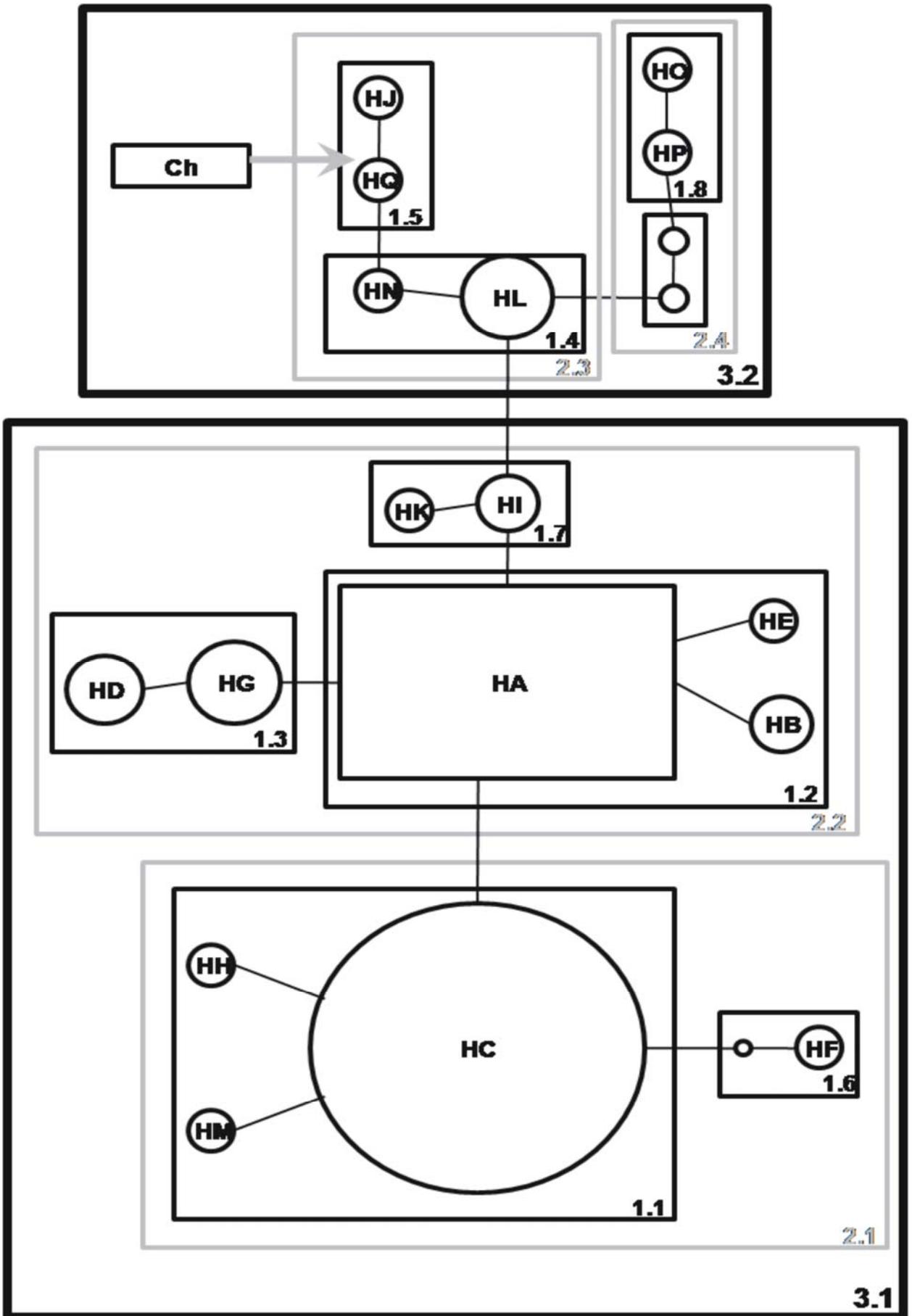


Fig. 3.4: Red de haplotipos de la RC de *Chaetophractus villosus*. Los anidamientos de los clados fueron construidos a partir de las reglas definidas por Templeton *et al.* (1987). Cada haplotipo se encuentra representado por un par de letras (ej. haplotipo C: HC) dentro de un círculo cuyo tamaño es proporcional a la cantidad de individuos que lo poseen. El rectángulo pequeño Ch corresponde a una secuencia de la especie *Chaetophractus vellerosus* usada como secuencia de referencia (outgroup) y la flecha indica su lugar de enraizamiento en la red. El haplotipo ancestral HA se encuentra representado por un rectángulo. Los círculos vacíos más pequeños representan haplotipos hipotéticos. Las líneas negras finas delimitan clados de primer nivel (1.1 - 1.7), las grises de segundo (2.1 - 2.4) y las negras gruesas de tercero (3.1 y 3.2).

la condición de ancestralidad relacionada a un haplotipo (ver Fig. 3.4 y Tabla II). Es importante destacar que el haplotipo ancestral no está determinado únicamente por la cantidad de individuos que lo poseen (es decir por su frecuencia absoluta). Es de suma importancia considerar la cantidad de localidades en las que un haplotipo aparece, dado que si son numerosas, es muy probable que ese linaje se haya dispersado a todas ellas, descartando la probabilidad de que dicho haplotipo haya aparecido en cada localidad independientemente. Por último, la condición de ancestralidad se infiere también por el hecho de que de un haplotipo deriven varios, de allí su posición interna en la red. De hecho, HA es el haplotipo que presenta mayor número de haplotipos derivados, al menos cinco según los resultados del presente trabajo.

El análisis de contingencia de los anidamientos y su asociación geográfica llevados a cabo mediante el programa GeoDis 2.5 (Posada *et al.* 2000) se muestran en la Tabla 3.III.

Clado	Chi-cuadrado	Probabilidad
1.1	44,46	0,069
1.2	15,33	0,427
1.3	9	0,037*
1.4	6	1
1.5	3	1
2.1	31	0,149
2.2	36,32	0,023*
2.3	4,5	1
3.1	46,96	0,000*
3.2	6,52	0,672
Total cladogram	54,56	0,000*

Tabla 3.III: Análisis de contingencia de los clados y su asociación geográfica.

Clado	Cadena de inferencias	Evento demográfico inferido
1-1	1-2-11-12 No	contiguous range expansion
1-3	1-19-20-2-11-12 No	contiguous range expansion
2-2	1-2-17-4 No	restricted gene flow with isolation by distance
3-1	1-2-11-12 No	contiguous range expansion

Tabla 3.IV: Los números de la cadena de inferencia refieren a la serie de pasos seguidos en la clave de Templeton (2006). En la tabla están representados sólo los clados que rechazan la hipótesis nula de la no asociación entre la variabilidad de los haplotipos y la distribución geográfica.

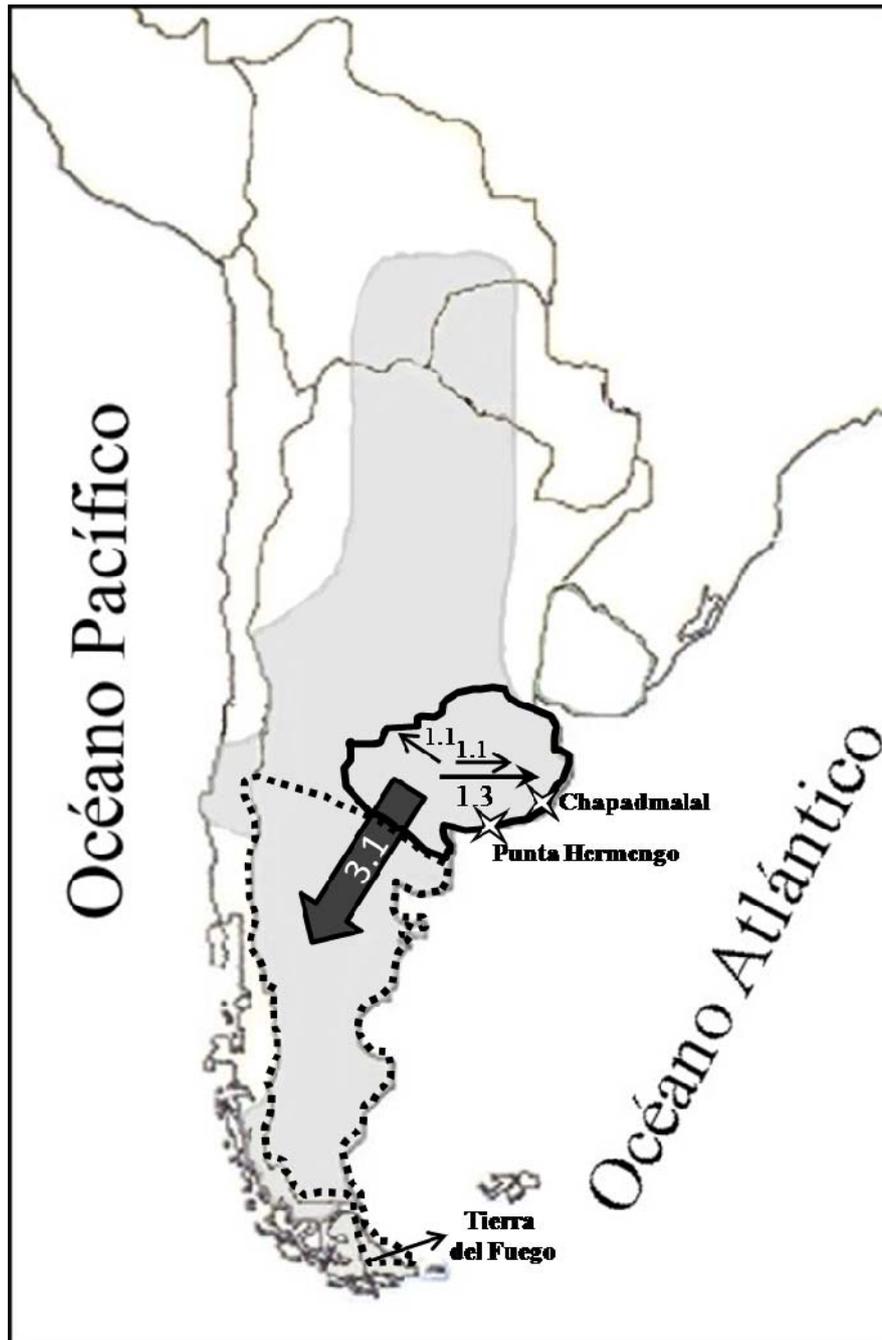


Fig. 3.5: Región Patagónica (línea punteada) y Región Pampeana (línea continua). Las flechas indican el proceso de expansión contigua del rango de distribución (*contiguous range expansion*) inferido en el NCA. Los índices 1.1, 1.3 y 3.1 representan los clados. Se destacan las localidades de Chapadmalal y Punta Hermengo, de importancia paleontológica para *Chaetophractus* (ver Discusión). En gris se muestra la distribución de la especie.

Los clados no incluidos no presentaron variación geográfica y/o haplotípica. Entre los 11 clados examinados, 4 rechazaron la hipótesis nula de *no asociación geográfica* ($p < 0.05$) mientras que uno de ellos se encontró cerca del límite de la significancia ($p = 0.06$). La Tabla 3.IV describe las interpretaciones biológicas de los valores estadísticos de la clave de inferencia de Templeton (2006).

La expansión del rango de distribución (*contiguous range expansion*) aparece como proceso general en la historia de esta especie (clados 1-1, 1-3 y 3.1) mientras que el clado de segundo nivel 2.2 se caracteriza por un flujo génico restringido (*restricted gene flow*) con aislamiento por distancia (*isolation by distance*) (Fig. 3.5).

3.2. *Chaetophractus vellerosus*

3.2.1. Muestreo

El muestreo realizado en 8 localidades resultó en un total de 41 muestras colectadas (ver Anexo Materiales y Métodos, II: Muestras) de las cuales 30 fueron incluidas en este estudio. En el caso de 5 carcazas secas provenientes de Ñacuñán (Mendoza), 2 muestras de tejido de ejemplares de colección de la localidad santafecina de San Cristóbal y 1 muestra de un ejemplar proveniente de Huasa Pampa (Tucumán) no fue posible extraer ADN de calidad para poder realizar una PCR con éxito. Tampoco se obtuvieron secuencias de calidad suficiente de 3 individuos provenientes de Pipinas, provincia de Buenos Aires. Sin duda, el grado de degradación y/o preservación de las muestras a analizar, ha sido la causa de este inconveniente habitual en este tipo de estudios. Por consiguiente, el número de localidades representadas fue 6 (ver Fig. 3.6 y Tabla 3.VI).

3.2.2. Variabilidad de las secuencias

El análisis de las secuencias de los 30 pichis llorones reveló la existencia de los primeros 10 haplotipos de la RC descritos para esta especie que fueron depositados en el GenBank

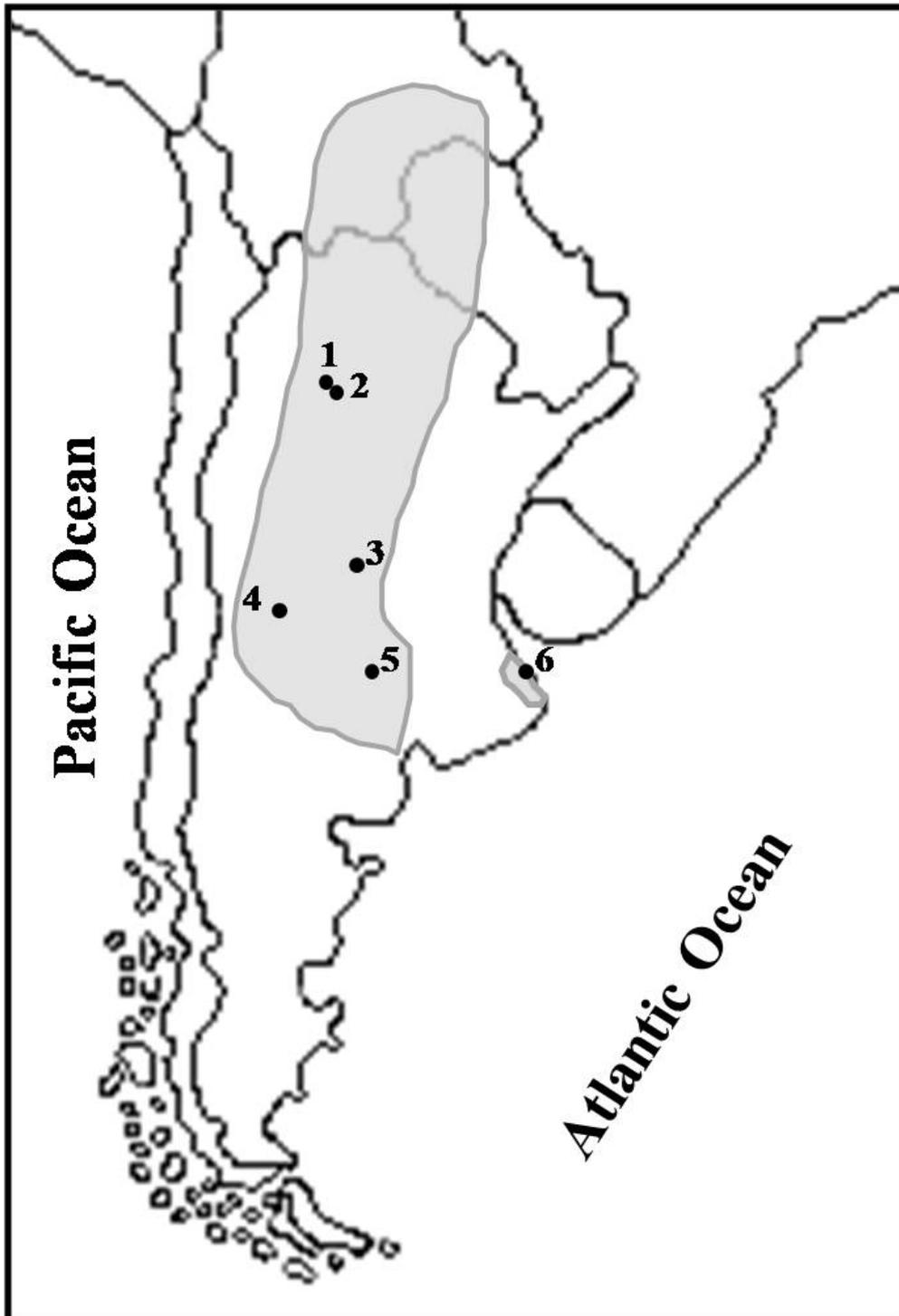


Fig. 3.6: En gris se muestra la distribución de *Ch. vellerosus* (Wetzel 1982, Carlini & Vizcaíno 1987) y los puntos de color negro representan las localidades de muestreo (Ver Tabla VI).

(DQ 136318, EU 090356-59, FJ 824592-96). Se obtuvieron secuencias parciales, cuya longitud fue de 485 pb, excepto un individuo con una inserción extra, que presentó una secuencia de 486 pb. Las secuencias alineadas por CLUSTAL W (ver el Anexo de este capítulo) mostraron 9 cambios o mutaciones de punto, de las cuales 7 fueron transiciones, con un desvío hacia las de tipo C-T, una fue una transversión y la restante fue una inserción (Tabla 3.V). Las secuencias que fueron editadas y corregidas manualmente con el programa Chromas Pro.

Al igual que en la especie hermana *Chaetophractus villosus*, no hubo evidencias de heteroplasma entre las secuencias de ADN obtenidas a partir de diversos tejidos.

Los haplotipos, frecuencias relativas, sitios polimórficos y números de acceso al GenBank se indican en la Tabla 3.V. Las localidades de procedencia, la cantidad de individuos por localidad y sus haplotipos correspondientes se listan en la Tabla 3.VI.

La composición de nucleótidos promedio de las secuencias fue C: 26,85%; T: 29,43%; A: 31,02%; G: 12,71% y la diversidad nucleotídica (π), baja al igual que en la población de peludos, fue de 0.003971 +/- 0.002555.

Haplotipo	197	238	268	297	329	356	364	432	441	n	Frec.Abs	n° acc.GenBank
veA	G	C	T	C	T	A	C	T	-	16	0,5333333	DQ 136318
veB	A	.	C	.	.	.	T	.	-	4	0,1333333	EU 090356
veC	A	.	C	-	3	0,1	EU 090357
veD	A	T	C	T	.	.	T	.	-	1	0,0333333	EU 090358
veE	A	.	C	C	-	1	0,0333333	EU 090359
veF	A	.	C	T	-	1	0,0333333	FJ 824592
veG	A	.	C	C	G	1	0,0333333	FJ 824593
veH	A	.	C	.	G	.	.	.	-	1	0,0333333	FJ 824594
veI	A	T	C	-	1	0,0333333	FJ 824595
veJ	A	.	C	.	.	G	.	.	-	1	0,0333333	FJ 824596

Tabla 3.V: HA-HQ: haplotipos; 197 - 441: sitios polimórficos en la secuencia de 485 pb de *Ch. vellerosus*; n: número de individuos que poseen el haplotipo correspondiente; Frec.Rel: frecuencia relativa; n° acc. GenBank: número de acceso al depósito del haplotipo en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

sitio	provincia	localidad	n	haplotipo (n° de individuos)
1	Tucumán	Graneros	1	veD(1)
2	Tucumán	Taco Ralo	11	veB(4) veC(3) veE(1) veG(1) veH(1) veI(1)
3	Córdoba	Alcira	1	veA(1)
4	Mendoza	Ñacuñán	1	veJ(1)
5	La Pampa	Trenel	1	veF(1)
6	Buenos Aires	Pipinas	15	veA(15)

Tabla 3.VI: distribución geográfica de los haplotipos y cantidad de individuos por sitio de muestreo.

3.2.3. Demografía y red median-joining (MJ) de haplotipos

3.2.3.1. Distribución de las diferencias entre secuencias (mismatch)

La media de las diferencias pareadas (*pairwise differences*) entre las secuencias de los 30 individuos de la especie *Chaetophractus vellerosus* fue de 1.9 +/- 1.1, el desvío estándar $S = 2.129$. El porcentaje de diferencias entre secuencias varió entre 0 y 1,029 %, lo cual indica que entre un par de secuencias tomadas al azar existen entre 0 y 5 bases de diferencia. Las frecuencias relativas y cantidad de diferencias entre pares de secuencias (0 - 5) y las diferencias pareadas observadas vs. las esperadas se presentan en la Fig 3.7. En líneas generales la distribución bimodal y aserrada representan estadios de estabilidad poblacional demográfica y de rango de distribución. Este patrón es el que se observa en el caso de la población de pichi llorón (Fig. 3.7).

3.2.3.2. Tests de neutralidad

El resultado del test de neutralidad de Fu fue de $F_s = -3.38897$ ($p: 0,035$), mientras que el de Tajima fue de $D = -0.27466$ ($p: 0.449$). Por lo tanto, ninguna de las dos pruebas contradice la neutralidad

selectiva, ni tampoco evidencian algún tipo de estructuración poblacional.

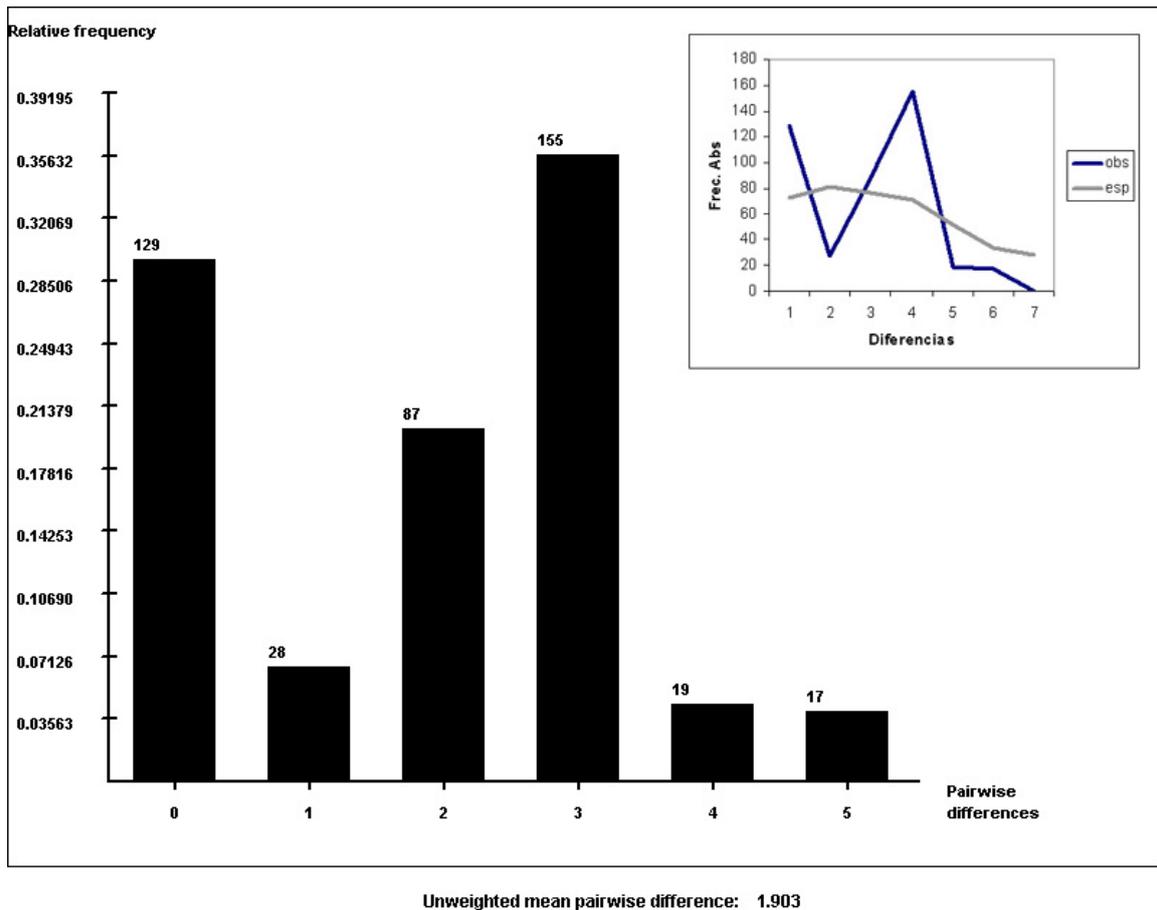


Fig. 3.7: Frecuencia relativa observada en función del número de diferencias pareadas. Los valores sobre las barras indican la cantidad de pares de secuencias de todas las posibles combinaciones entre los 30 individuos que presentan el número de diferencias que figura en la base de cada barra. En el gráfico superior derecho de la figura se encuentran representadas las frecuencias absolutas observadas y esperadas en función de las diferencias pareadas.

3.2.3.3. Red de haplotipos utilizando median-joining (MJ)

La red utilizando median-joining que muestra la relación entre los haplotipos se muestra en la Fig. 3.8.

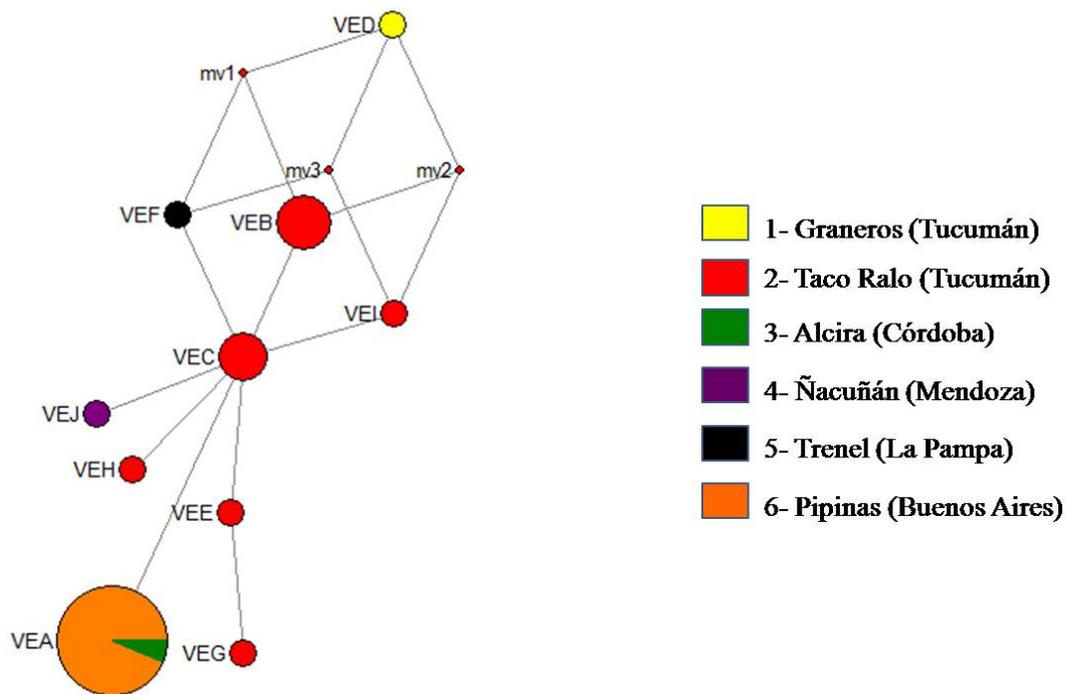


Fig 3.8: Red de haplotipos de *Chaetophractus vellerosus* utilizando el algoritmo median-joining. Los haplotipos hipotéticos se indican con mv.

3.2.4. Análisis filogeográfico

La Fig. 3.9 presenta la red conformada por los 10 haplotipos de la RC detectados entre los 30 individuos de *Chaetophractus vellerosus* y 2 haplotipos hipotéticos generados por el programa de

manera que todos se diferencien del más próximo por una sola mutación de punto. La red resultante a partir de las secuencias de los pichis llorones está conformada por los haplotipos (nivel 0) y por clados de primero y segundo nivel.

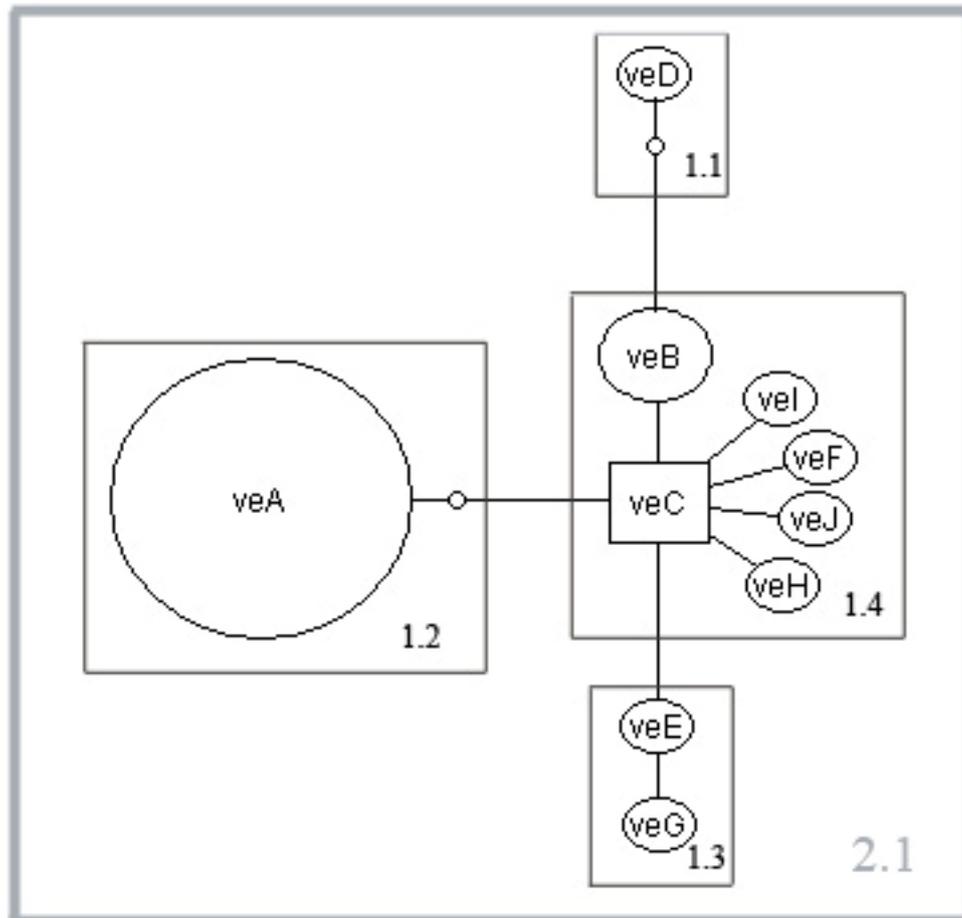


Fig. 3.9: Red de haplotipos de la Región Control de *Chaetophractus vellerosus* usando TCS 1.13 (Clement *et al.* 2001). Los anidamientos de los clados fueron construidos a partir de las reglas definidas por Templeton (2006). En este caso cada haplotipo se encuentra representado por “ve” (que hace referencia al epíteto específico de la especie) y una letra correspondiente al haplotipos (ej. haplotipo A: veA) dentro de un círculo cuyo tamaño es proporcional a la cantidad de individuos que poseen ese haplotipo. El haplotipo ancestral veC se encuentra representado

por un rectángulo. Los círculos vacíos más pequeños representan haplotipos hipotéticos necesarios para unir a todos los haplotipos encontrados entre los individuos del muestreo. Todos los haplotipos se diferencian del más próximo por un nucleótido. Las líneas grises delgadas delimitan clados de primer nivel (1.1 - 1.4) y la gris gruesa de al de segundo nivel (2.1).

El haplotipo veC domina al clado 1.4 por su posición interior mientras que, 1.4 domina la red debido a la misma condición. Como ya fue mencionado, entre las características que determinan la ancestralidad de un haplotipo son su posición interior en la red, su frecuencia y que se encuentre presente en el mayor número de localidades. En particular, veC está presente en una sola localidad al igual que casi todos los demás haplotipos, excepto veB que se encuentra en dos, y resulta menos frecuente que veA y veB (ver Tabla VI). A pesar de esto, los datos indican que veC sería el haplotipo ancestral dado que de este linaje surgen otros 7 haplotipos incluyendo uno hipotético (Fig. 3.9).

Clado	Chi-cuadrado	Probabilidad
1.4	22	0,104
2.1	65,05	0,002

Tabla 3.VII: análisis de contingencia de los clados y su asociación geográfica.

Los resultados del análisis de contingencia de los anidamientos y asociación geográfica utilizando el programa GeoDis se muestran en la Tabla 3.VII. Los clados no incluidos no presentaron variación geográfica y/o haplotípica.

Cinco clados fueron examinados, de los cuales sólo uno rechazó la hipótesis nula de *no asociación geográfica* ($p=0,05$). Sin embargo, los datos no permitieron realizar las interpretaciones biológicas de los valores estadísticos usando la clave de inferencia de Templeton (2004) debido a que los valores D_c y D_n no fueron significativos en ningún caso. A pesar de ello, el rechazo de la hipótesis nula en el clado 1.4 sugiere que existe estructuración geográfica entre los linajes en la población de *Chaetophractus vellerosus*, aunque no fue posible especificar a través de que tipo/s de fenómeno/s genéticos y/o demográficos.

3.3. Características estructurales de la Región Control de *Chaetophractus*. Comparación entre especies.

3.3.1. Posición de las mutaciones y diferencias entre especies

Los datos muestran 12 sitios de cambio (transiciones) entre las secuencias de *Chaetophractus villosus* analizadas. De las cuales:

- a) 3 pertenecen a la secuencia del gen tRNA-Pro (ARN de transferencia de la prolina), adyacente al extremo 3' de la RC (posiciones 6, 13 y 20 de las secuencias parciales de ese estudio).
- b) 9 restantes fueron identificadas en el dominio ETAS (en las posiciones 177, 204, 214, 238, 289, 295, 311, 335 y 348).

Las 30 secuencias de *Chaetophractus vellerosus* mostraron 9 cambios, de los cuales:

- a) 6 se encuentran dentro del dominio ETAS (197, 238, 268, 297, 329 y 356),
- b) 3 (364, 432 y 441) se ubican en el Dominio Central (DC) (ver Tabla 3.V y Fig. 3.10).

La Tabla 3.VIII muestra las diferencias de la secuencia de la RC utilizada en este trabajo entre las dos especies del género estudiadas.

Posición	<i>Ch. villosus</i>	<i>Ch. vellerosus</i>	Tipo
6	G / A	G	transición
13	T / C	T	"
20	G	A	"
69	T	C	"
85	T	C	"
177	T / C	T	"
197	A	G / A	"
204	C / T	C	"
214	C / T	C	"
238	C / T	C / T	"
239	C / T	A	transversión
268	T	C / T	transición
283,284,285,286	GTTC	ACCT	" (*)
289	C	T	"
295	T	C	"
297	C	C / T	"
308	A	C	transversión
311	G	A	transición
318	A	G	"
323	-	T	inserción (+)
324	T	A	transversión
329	C	T	transición
336	G	A	"
349	A / G	A	"
355	A	G	"
361	C	T	"
364,365,366	TCG	CTA / TTA	" (*)
432	T	C	"
441	-	- / G	inserción (+)

Tabla 3.VIII: diferencias entre las secuencias parciales de la RC de *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus*. (*) transiciones agrupadas; (+) se interpretan como inserciones por considerar que el pichi llorón aparece como especie posteriormente (ver Capítulo IV, Discusión).

3.3.2. Composición de bases de los Dominios y elementos ETAS

En el dominio ETAS, el orden decreciente en la composición

de bases es T>A>C>G mientras que la extensión de la secuencia del DC obtenida fue de 127 pb con una composición de bases C>A>G>T. La Tabla 3.IX muestra la composición de bases (%) de los dominios ETAS y DC en cada especie mientras que la Fig. 3.10 muestra la longitud y posición de éstos y la secuencia de los elementos conservados ETAS 1 y ETAS 2

El dominio ETAS muestra una extensión de 289 y 290 bp en *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* respectivamente. También este dominio incluye una repetición de 80 bp que involucra parcialmente a ETAS 1 separándolo de ETAS 2 por 73 bp (Fig. 3.11). ETAS 1 se ubica a 29 bp de distancia del extremo 3' de la RC (adyacente al gen tRNA-Pro) y tiene una extensión de 66 bp mientras que la de ETAS 2 es de 75 bp (Fig. 3.10).

Taxa \ % de bases por Dominio	ETAS				Dom.C. (sec.parcial)			
	T	A	C	G	A	G	C	T
Ch. villosus	34,25	33,22	22,84	9,69	23,01	22,22	34,13	20,63
Ch. vellerosus	33,45	33,1	23,8	9,65	23,81	21,43	33,33	21,43
media (X) Sbisà et al. 1997	29,77	34,44	24,81	11,03	24,39	20,67	27,04	27,85

Tabla 3.IX: composición de bases (porcentaje) del dominio ETAS y la secuencia parcial del Dominio Central de *Chaetophractus* comparados con los valores medios (X) de las 27 especies de mamíferos presentadas en Sbisà *et al.* (1997).

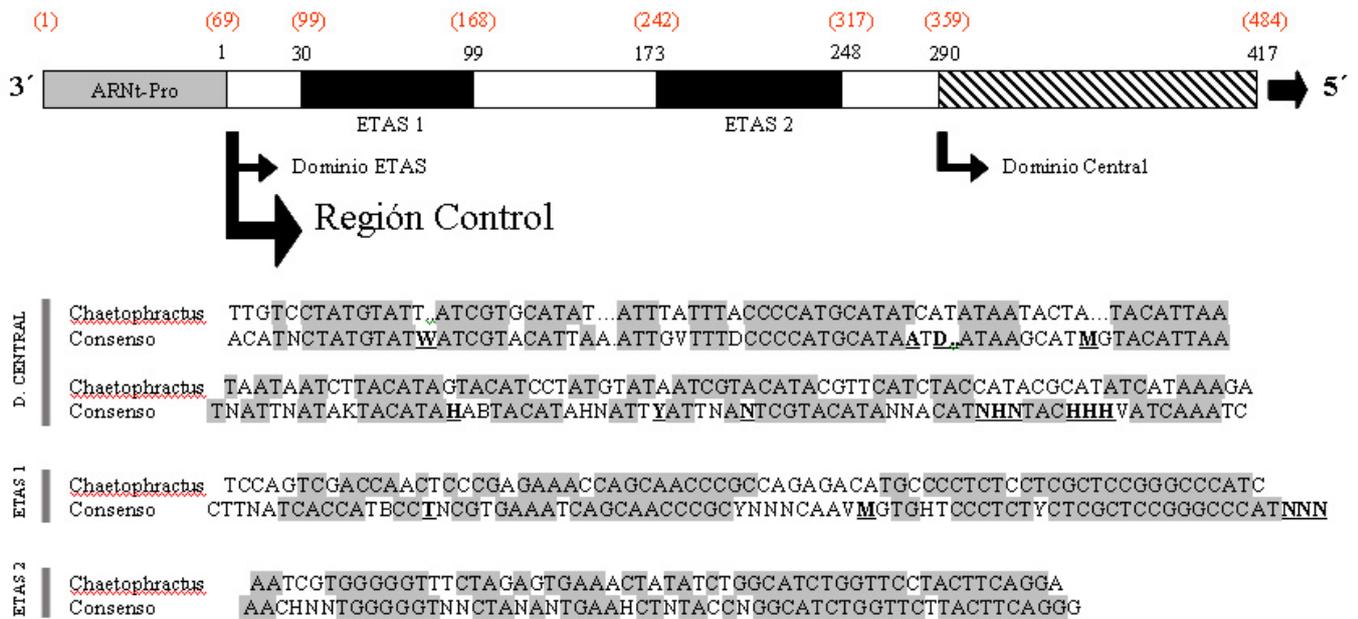


Fig. 3.10: Posición de los dominios y elementos ETAS en la RC de *Chaetophractus*. Los números rojos indican la posición relativa en las secuencias obtenidas para este estudio; los negros ubicados por debajo, la posición absoluta en la RC. En la parte inferior de la figura se comparan las secuencias del Dominio Central (parcial), ETAS 1 y 2 de *Chaetophractus* con las consenso (calculadas a partir de Sbisà et al. 1997) correspondientes. Resaltado gris: bases conservadas; N, W, V, D, M, K, H, Y, B: letras de acuerdo con el WOBBI CODE (International Code for Degenerate Bases, ver Anexo); letras en negrita y subrayadas indican que en al menos 13 de las 27 especies comparadas en Sbisà et al. (1997) no hay una base en esa posición cuando las secuencias se encuentran alineadas (gris).

En 3 de los 76 ejemplares de *Chaetophractus villosus* y en sólo 1 de los 30 de *Chaetophractus vellerosus* analizados en este estudio, los fragmentos de secuencias obtenidos mostraron mayor longitud, lo que permitió detectar una repetición de 52 bp en el DC (Fig. 3.11).

1. TTTATTTACCCCATGCATATCATATAATACTATACATTAATAATCTTACATAGTACATCCTATG
TATAATCGTACATACACTTATTTACCCCATGCATATCATATAATACTATACATTAATAATCTTA
CATAGTACATCCTATGTATAATCGTACATACG
2. GTGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTCAGGAGTGGGGGTTTCT
AGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTCAGGA

Fig. 3.11: repeticiones en las secuencias de la RC de *Chaetophractus*: 1. repetición en el Dominio ETAS; 2. repetición en el Dominio Central.

El elemento ETAS 1 de *Chaetophractus* comparte entre 48 y 55 bases con la secuencia consenso homóloga, lo cual significa un 78 a 83 % de conservación, mientras que ETAS 2 comparte entre 41 y 56 bases, lo que equivale a un 58 a 79% de conservación. En el caso del DC, las bases compartidas fueron entre 92 y 113, lo que significa un 72 a 89% de conservación (Fig. 3.10).

ANEXO

RESULTADOS

156D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 143D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 151D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 138D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 171D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 142D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 160D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 83D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 178D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 185D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 195D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 148D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 161D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 189D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 192D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 105D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 183D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 5D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 139D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 81D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 174D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 123D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 190D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 120D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 141D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 134D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 147D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 135_DL15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 150D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 136D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC
 146D_L15926 GGCCCATCAATCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACTTC

140D_L15926 AGGA
 173D_L15926 AGGA
 30D_L15926 AGGA
 131D_L15926 AGGA
 6D_L15926 AGGA
 42D_L15926 AGGA
 50D_L15926 AGGA
 21D_L15926 AGGA
 43D_L15926 AGGA
 7D_L15926 AGGA
 22D_L15926 AGGA
 74D_L15926 AGGA
 17D_L15926 AGGA
 20D_L15926 AGGA
 124D_L15926 AGGA
 128D_L15926 AGGA
 44D_L15926 AGGA
 38D_L15926 AGGA
 61D_L15926 AGGA
 79D_L15926 AGGA
 77D_L15926 AGGA
 65D_L15926 AGGA
 78D_L15926 AGGA
 62D_L15926 AGGA
 76D_L15926 AGGA
 102D_L15926 AGGA
 64D_L15926 AGGA
 71D_L15926 AGGA
 63D_L15926 AGGA
 127D_L15926 AGGA
 80D_L15926 AGGA
 66D_L15926 AGGA
 72D_L15926 AGGA
 67D_L15926 AGGA
 73D_L15926 AGGA
 149D_L15926 AGGA
 69D_L15926 AGGA
 188D_L15926 AGGA
 68D_L15926 AGGA
 184D_L15926 AGGA
 129D_L15926 AGGA
 130D_L15926 AGGA
 154D_L15926 AGGA
 70D_L15926 AGGA

152D_L15926	AGGA
137D_L15926	AGGA
159D_L15926	AGGA
156D_L15926	AGGA
143D_L15926	AGGA
151D_L15926	AGGA
138D_L15926	AGGA
171D_L15926	AGGA
142D_L15926	AGGA
160D_L15926	AGGA
83D_L15926	AGGA
178D_L15926	AGGA
185D_L15926	AGGA
195D_L15926	AGGA
148D_L15926	AGGA
161D_L15926	AGGA
189D_L15926	AGGA
192D_L15926	AGGA
105D_L15926	AGGA
183D_L_15926	AGGA
5D_L15926	AGGA
139D_L15926	AGGA
81D_L15926	AGGA
174D_L15926	AGGA
123D_L15926	AGGA
190D_L15926	AGGA
120D_L15926	AGGA
141D_L15926	AGGA
134D_L15926	AGGA
147D_L15926	AGGA
135_DL15926	AGGA
150D_L15926	AGGA
136D_L15926	AGGA
146D_L15926	AGGA

II: Alineamientos de las secuencias de *Chaetophractus vellerosus*

CLUSTAL W multiple sequence alignment Ch. Vellerosus - N = sitios variables

```

89D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
118D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
88D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
4D_L15926       AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
13D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
14D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
15D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
16D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
18D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
19D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
23D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
24D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
31D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
41D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
175D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
39D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
35D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
34D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
32D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
119D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
176D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
101D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
103D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
100D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
99D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
98D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
96D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
95D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
104D_L15926     AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
97D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATTCTACTTAAACT
*****

```

```

89D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
118D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
88D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
4D_L15926       ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
13D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
14D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
15D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
16D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
18D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
19D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
23D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
24D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
31D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
41D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
175D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
39D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
35D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
34D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
32D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
119D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
176D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
101D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
103D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
100D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
99D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
98D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
96D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
95D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
104D_L15926     ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
97D_L15926      ACTCCTTGCTAACTAACCCTGCATCATGCACGGTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
*****

```


34D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 32D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 119D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 176D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 101D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 103D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 100D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 99D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 98D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 96D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 95D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 104D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 97D_L15926 TAGCTAACCAACTCCCGAGAAACAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
 *** **

89D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 118D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 88D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 4D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 13D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 14D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 15D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 16D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 18D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 19D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 23D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 24D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 31D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 41D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 175D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 39D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 35D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 34D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 32D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 119D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 176D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 101D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 103D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 100D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 99D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 98D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 96D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 95D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 104D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 97D_L15926 GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
 ***** **

89D_L15926 TCAGGA
 118D_L15926 TCAGGA
 88D_L15926 TCAGGA
 4D_L15926 TCAGGA
 13D_L15926 TCAGGA
 14D_L15926 TCAGGA
 15D_L15926 TCAGGA
 16D_L15926 TCAGGA
 18D_L15926 TCAGGA
 19D_L15926 TCAGGA
 23D_L15926 TCAGGA
 24D_L15926 TCAGGA
 31D_L15926 TCAGGA
 41D_L15926 TCAGGA
 175D_L15926 TCAGGA
 39D_L15926 TCAGGA
 35D_L15926 TCAGGA
 34D_L15926 TCAGGA
 32D_L15926 TCAGGA
 119D_L15926 TCAGGA
 176D_L15926 TCAGGA
 101D_L15926 TCAGGA
 103D_L15926 TCAGGA
 100D_L15926 TCAGGA
 99D_L15926 TCAGGA
 98D_L15926 TCAGGA
 96D_L15926 TCAGGA

III: Diferencias entre especies

CLUSTAL W multiple sequence alignment: 5D (villosus), veG 97 (vellerosus)

N = Diferencias entre especies

```

5D_L15926      AAGGAGGAAACATCTTACAGCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATCTACTTAAACT 60
veG__97_      AAGGAGGAAACATCTTACAACCTCCACCATCAACTCCCAAAGCTGATATCTACTTAAACT
*****

5D_L15926      ACTCCTTGTTAACTAACCGTGCATTATGCACGGTTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT 120
veG__97_      ACTCCTTGCTAACTAACCGTGCATCATGCACGGTTTTTTTGTCTATGTATTATCGTGCAT
*****

5D_L15926      ATATTTATTTACCCATGCATATCATATAAATACTATAACATTAATAATCTTACATAGTACA 180
veG__97_      ATATTTATTTACCCATGCATATCATATAAATACTATAACATTAATAATCTTACATAGTACA
*****

5D_L15926      TCCTATGTATAATCGTACATACACTTATTTACCTCATGCATATCATATAAATACTATAACAT 240
veG__97_      TCCTATGTATAATCGTACATACACTTATTTACCCATGCATATCATATAAATACTATAACAT
*****

5D_L15926      TAATAATCTTACATAGTACATCCTATGTATAATCGTACATACGTTTCATCTACCATACGCA 300
veG__97_      TAATAATCTTACATAGTACATCCTATGCTATAATCGTACATACACCTATTTACCACACGCA
*****

5D_L15926      TATCATAAAGGCATTGTATCAG-TAAACCTCGTACGCGAACCACCTCCAACCGGAATTTC 360
veG__97_      TATCATAAAGGCATTGTATCAGTAAACTTCGTACACGAACCACCTCCAACCGGGATTTC
*****

5D_L15926      CAGTCGACCAACTCCCAGAAACCAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC 420
veG__97_      TAGCTAACCAACTCCCAGAAACCAGCAACCCGCCAGAGACATGCCCTCTCCTCGCTCC
**

5D_L15926      GGGCCCATCAATCGTGGGGG-TTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT 480
veG__97_      GGGCCCATCAACCGTGGGGGTTTCTAGAGTGAAACTATATCTGGCATCTGGTTCCTACT
*****

5D_L15926      TCAGGA 486
veG__97_      TCAGGA
*****

```

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1. DINÁMICA POBLACIONAL Y
FILOGEOGRAFÍA DE *Chaetophractus villosus*

4.1.1. Filogeografía

El análisis de clados anidados (NCA) reveló una asociación geográfica significativa en la distribución de la variabilidad genética de la población de *Chaetophractus villosus*, con un patrón general de expansión del rango de distribución (*contiguos range expansion*). El patrón mencionado, bajo un modelo de expansión repentina, ha sido descrito por Cann *et al.* (1987). Así, los haplotipos más antiguos resultan confinados al área pre-expansiva ancestral mientras que algunos de los haplotipos más jóvenes, surgidos a partir de poblaciones en áreas de expansión, están diseminados geográficamente (*contiguous range expansion*) o ubicados en áreas distantes de las ocupadas por los haplotipos ancestrales (*interior*). A este último evento se lo denomina colonización a larga distancia (*long distance colonization*). Como la expansión resulta entonces un evento definido por lo antedicho, los patrones que predicen Cann *et al.* (1987) no deberían ser recurrentes. Sin embargo, también pueden ocurrir en más de una categoría de anidamiento debido al polimorfismo ancestral de la población en expansión. En este caso, los patrones significativos deberían ser geográficamente congruentes ya que reflejan el mismo evento histórico (Templeton, 1995). Si consideramos los modelos de simulación y la distribución geográfica de los haplotipos *interiores* (más viejos) y exteriores o *tip*

(más jóvenes) en los clados, los datos obtenidos permiten inferir que *Chaetophractus villosus* presenta un patrón de tipo *contiguous range expansion*. De acuerdo a ello se desprende (1) que el área pre-expansiva de la especie se localiza en el centro de Argentina, y (2) que la expansión de su rango de distribución ocurrió hacia el Este, el Noroeste y principalmente hacia el Sur. Esta evidencia resulta claramente congruente a distintos niveles jerárquicos de los clados (ver Fig. 3.5).

En función de estos modelos, una de las hipótesis más importantes desde un punto de vista histórico-poblacional es que el haplotipo HA debe ser considerado el linaje más antiguo por los siguientes motivos:

1- su presencia como haplotipo predominante en el clado 1.2 de posición *interior* respecto de todos los demás clados;

2- su mayor frecuencia de aparición en las localidades (ver Tabla II);

3- la superposición entre la distribución de dicho linaje, y la Región Pampeana, donde fue registrada la mayor variabilidad haplotípica de toda la distribución de la especie (ver Fig. 3.1 y Tabla 3.II) y finalmente,

4- que el fósil más antiguo proviene de la localidad de Chapadmalal, sobre la costa atlántica de la Región Pampeana, según veremos más adelante (ver Fig. 3.5).

Un análisis más detallado de los clados permite realizar otras consideraciones vinculadas al proceso histórico de expansión. En

primer lugar uno de los clados que rechaza la hipótesis nula de no asociación geográfica, el 1.3 (Tabla 3.III), está conformado por dos haplotipos, HG en posición *interior* y HD en posición *tip* (Fig. 3.4). De acuerdo a Castelleo y Templeton (1994) esto significa que HG, que aparece en las localidades 6, 7 y 10, es un haplotipo más antiguo que HD, presente en las localidades 11 y 14 (Fig. 3.1), por lo que se interpreta que la expansión contigua del rango de distribución (Tabla 3.IV) avanza principalmente desde el centro de Argentina en dirección Este, hasta la costa atlántica. Se observa además un movimiento menor de expansión del rango de distribución hacia el sur, según lo indica la presencia de HD en la localidad 11 (Fig. 3.5).

En relación al haplotipo HC, por su mayor frecuencia domina el clado 2.1, cuya posición *tip* en la red de haplotipos indica que los linajes que lo conforman son más jóvenes que los contenidos en el clado 2.2, de posición *interior*. Siguiendo el mismo criterio se observa que desde la misma área del centro de la Región Pampeana donde se ubica HC (localidades 10 y 15, Fig. 1), los movimientos de expansión del rango de distribución de dicho haplotipo se dieron hacia el Este y el Noroeste dentro de dicha región, representados por los haplotipos HH-HF, presentes en las localidades 13 y 14 y HM, presente en la localidad 6. (Fig. 3.1 y Fig. 3.5), respectivamente.

Entre los factores que podrían haber intervenido en los cambios climáticos invocados a lo largo de este trabajo de tesis, es indudable que las glaciaciones patagónicas y los cambios en el nivel

del mar fueron los que tuvieron mayor incidencia en la Región Pampeana. Por ello, es posible suponer que las expansiones de algunos linajes de la población de *Chaetophractus villosus* hacia el Este y Noroeste dentro de la región mencionada hayan estado correlacionadas con pulsos de mayor aridez debido a reavances glaciarios y a disminuciones en el nivel del mar, lo que aumentaba la superficie continental.

Es destacable que si bien HC no es el haplotipo más joven del clado 1.1, probablemente haya ocupado siempre una posición marginal-sur dado que efectivamente es el único linaje que expandió el rango de distribución de la especie ocupando toda la Patagonia e incluso la Isla Grande de Tierra del Fuego (Poljak *et al.*, 2007). Como claramente muestran la Tabla 3.II y la Fig. 3.1, todos los individuos provenientes de las localidades patagónicas presentan únicamente el haplotipo HC. Es indiscutible que este linaje ha alcanzado un extenso rango de distribución durante un período de 10.000 años antes del presente como límite máximo, luego de la retracción del último re-avance glaciario hacia la Cordillera de Los Andes durante el Pleistoceno tardío (Rabassa *et al.*, 2005). Esta hipótesis apoya la idea de una población en expansión que resulta del análisis de distribución pareada de secuencias (*mismatch distribution*) (Fig. 3.2).

El clado 1.3 no sólo evidencia una expansión contigua del rango sino que además da lugar al flujo génico restringido con aislamiento por distancia (*restricted gene flow with isolation by*

distance) que caracteriza al clado de jerarquía mayor que lo contiene (2.2). El clado 1.3 comprende las localidades 6, 7, 10, 11, y 14 mientras que el clado 2.2 a 1, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16, de manera que la distribución del primero es restringida y se encuentra superpuesta a la del segundo (Fig 3.1). De acuerdo a los modelos de simulación propuestos por Neigel y Avise (1993), esta configuración determina el flujo génico restringido con aislamiento por distancia. Este tipo de procesos se observa en especies de baja vagilidad (la capacidad de los organismos para diseminarse, lo que constituye el parámetro que define la dispersión; Frankham *et al.*, 2002, Moraes-Barros *et al.*, 2006), como sería el caso de *Chaetophractus villosus* y es, además, el único proceso no histórico detectado en la red, es decir un proceso que deja huellas en la estructuración poblacional de la especie y que ocurre recurrentemente, generación tras generación. Según lo expuesto, cabría plantearse entonces ¿porqué esta recurrencia no se ha detectado en mas clados? De hecho, 6 de los 11 clados considerados no rechazan la hipótesis nula de no asociación geográfica (Tabla 3.III). Varias razones podrían ser invocadas para responder a este interrogante, por ejemplo 1- no haber hallado la suficiente variación genética en las poblaciones muestreadas, 2- que el número de individuos en algunas de ellas sea bajo o 3- que sencillamente el número de poblaciones sea escaso y que por alguna o todas estas razones el poder de resolución del análisis sea insuficiente (Templeton *et al.* 1995). Sin embargo, el muestreo no parece estar sesgado, dado que sólo 3

haplotipos hipotéticos fueron necesarios para completar la red de 17 haplotipos hallados en *Chaetophractus villosus* de manera que cada uno tenga una sola diferencia con el vecino más próximo.

En el caso del clado 1.2 ninguna de las razones mencionadas antes explican el rechazo de la hipótesis nula, y si no se detectó aislamiento por distancia, esto pudo deberse a la mayor antigüedad de los haplotipos que lo conforman respecto de todos los demás. Esta situación es expresada por la posición “interior” no sólo en relación al clado de jerarquía mayor siguiente (2.2), sino además respecto de la red total. La antigüedad aludida probablemente haya borrado las huellas de una asociación geográfica de la variabilidad genética debido a que los haplotipos más jóvenes HE y HB tuvieron el tiempo suficiente para dispersarse en la Región Pampeana tanto como el ancestral HA.

Teniendo en cuenta que el NCA sugiere que *Chaetophractus villosus* es una especie con baja vagilidad y que su resto fósil más antiguo y simultáneamente del género *Chaetophractus*, proviene de la Región Pampeana (ver más abajo), se podría proponer que el linaje que dio origen a esta especie se distribuyó originalmente en la Región Pampeana o al menos en la zona central de Argentina.

Los cambios climáticos en dicha región estuvieron histórica y estrechamente relacionados a los períodos glaciares e interglaciares ocurridos en la Patagonia durante los últimos 5 Ma. y especialmente durante el Pleistoceno (Rabassa *et al.*, 2005). Esto provocó una serie de cambios ecológicos y faunísticos

correlacionados (Tonni *et al.*, 1999; Nabel *et al.*, 2000; Rabassa *et al.*, 2005) y la retracción definitiva de las masas de hielo hacia los Andes dejó disponible el extenso territorio patagónico, lo que seguramente tuvo un fuerte impacto biogeográfico en las biotas del cono sur de Sudamérica. Una posibilidad es que la menor disponibilidad de recursos alimenticios debida a las condiciones climáticas menos favorables de la Patagonia, ligado al hábito de vida fosoria de *Chaetophractus villosus* probablemente hayan inducido la rápida colonización post-glacial (Pleistoceno tardío – Holoceno temprano, 16 – 10 Ma) de esta región debido a un forzado aumento del home-range para la subsistencia. Algo similar parecen indicar estudios previos sobre el área de hogar de *Chaetophractus vellerosus*, que necesita entre 3,4 y 4,6 ha en ambientes de dunas de una gran aridez en Catamarca (Greegor, 1985), mientras que en ambientes modificados a causa de las actividades ganaderas en zonas más húmedas como la de la costa de la Bahía Samborombón, específicamente en Pipinas, 1 ha puede ser suficiente como área de hogar (Glaz y Carlini, 1999).

Sin embargo, en los registros paleontológicos y arqueológicos de dasipódidos en Patagonia, sólo aparecen fósiles de la especie *Zaedyus pichiy* de aproximadamente 3500 años de antigüedad (Holoceno tardío), provenientes del norte de la provincia de Santa Cruz. Por otro lado, en base a la nula variabilidad encontrada entre las secuencias de los individuos provenientes de Patagonia no puede descartarse que la colonización de esta región haya sido más

reciente aún, lo que hace que, en este marco, la expansión del rango de distribución a través de la colonización de Patagonia haya sido y sea realmente explosiva.

Los procesos de expansión del rango de distribución de la población de peludos en la Región Pampeana y la Patagonia no parecen haber sido simultáneos ya que la expansión en la primera incluye un fenómeno de aislamiento por distancia genética por un lado y una distribución geográfica similar entre haplotipos derivados y su haplotipo ancestral por otro. Ambos requieren un tiempo de desarrollo que en principio supera al posiblemente muy corto tiempo de colonización de la Patagonia, en la que la nula variabilidad de haplotipos y las referencias paleontológicas disponibles así lo indican. Además, si asumimos que las expansiones pampeanas se debieron a pulsos de mayor aridificación por reavances glaciarios en Patagonia (además de disminuciones del nivel del mar), no hubiese sido posible la colonización de esta última región debido a la presencia de las masas de hielo continental y a la adversidad del clima.

4.1.2. Test de neutralidad, distribución de las diferencias (mismatch) y red median-joining (MJ) de haplotipos.

La comparación entre secuencias de ADN es una herramienta sumamente potente para identificar los procesos históricos que determinan la estructura de las poblaciones así como también las fuerzas evolutivas que actúan sobre una región determinada de dicha molécula (Wayme y Simonsen, 1998). En contraste, las poblaciones son dinámicas pudiendo cambiar de tamaño, localización y densidad mientras que espacialmente, pueden fragmentarse o unirse a otras (Hey y Machado, 2003).

Algunas pruebas estadísticas infieren el pasado a través del análisis del presente, como lo propone la Teoría de la Coalescencia presentada por Kingman (1982) y refinada por Hudson (1990), la cual indica que la variación tiene una historia, y que en última instancia todas las diferentes secuencias debieron haberse originado de una secuencia original en el pasado. Para que ello tenga sentido deben analizarse secuencias de ADN no sujetas a selección o deriva, de manera que la variabilidad no sea eliminada por éstos fenómenos y por ende, tanto las secuencias ancestrales como las descendientes, se encontrarán representadas en un muestreo dado.

4.1.2.1. Test de neutralidad

En primer lugar, la prueba D_T de Tajima, basada en el espectro de frecuencias de sitios polimórficos o segregantes dentro de un locus dado, distingue crecimiento poblacional de tamaño

constante. Por lo cual, una población en crecimiento presentará una gran cantidad de mutaciones recientes de una sola base (*singletons*), evidenciadas en la presencia de variantes en muy baja frecuencia (incluso sólo una secuencia entre todas las secuencias muestreadas), que se ubicarán en las ramas externas de una genealogía (Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

El resultado del test D_T de Tajima ($D = -0.69809$; $p = 0.269$) aplicado a las secuencias de peludo, arrojó un valor negativo que no fue significativo, lo que indicaría que no es posible rechazar la hipótesis de que la población está sujeta a neutralidad.

En segundo lugar, la prueba F_s de Fu, de mayor sensibilidad que la anterior, se basa en el espectro de la distribución de los haplotipos, cuyas frecuencias varían en distintos escenarios demográficos, permitiendo identificar desviaciones del modelo neutral (Nei, 1975). Así, un déficit en la diversidad haplotípica o un exceso de frecuencia de algunos haplotipos, ambos elementos por separado o combinados en diferentes grados, permiten inferir el estado demográfico de una población. En este estudio, la prueba F_s de Fu aplicada al conjunto de secuencias de la población de *Chaetophractus villosus* resultó en un alto valor negativo significativo ($F_s = -8.63207$; $p = 0.001$) indicando un exceso de variantes en baja frecuencia lo cual sugiere una reciente expansión poblacional.

4.1.2.2. Distribución de las diferencias (*mismatch*)

Como en los test mencionados, eventos tales como la expansión poblacional dejan huellas en la distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) entre secuencias. De esta manera, una distribución con un patrón multimodal o aserrado es característico de poblaciones con un tamaño constante o estabilidad demográfica (Slatkin y Hudson, 1991; Matocq *et al.*, 2000; Rogers y Harpending, 1992), mientras que el patrón de las poblaciones en expansión corresponde a una distribución unimodal (Schneider y Excoffier, 1999; Harpending y Rogers, 2000; Whorley *et al.*, 2004; Michaux *et al.*, 2005). Sin embargo, este último tipo de patrón de diversidad haplotípica, con distribución unimodal, puede responder también a otro tipo de fenómeno, como por ejemplo a una selección sobre mutaciones deletéreas (*slightly deleterious mutations*). En este sentido, dado que la RC no es codificante y su capacidad de acumular mutaciones es lo que la convierte en una buena herramienta para analizar variaciones a nivel poblacional, una distribución de las diferencias en modo pareado entre secuencias de ADN de dicha región, sería más sensible de responder a un patrón de expansión del rango de distribución, sin que exista la posibilidad de tratarse de una selección sobre mutaciones deletéreas.

Como se muestra en la Fig. 3.2, la distribución en modo pareado de la población de *Chaetophractus villosus*, responde al patrón unimodal mencionado anteriormente (expansión del rango),

en correspondencia con los resultados del test de Fu y también con el análisis de clados anidados o NCA (Figs. 2 y 3).

4.1.2.3. Red median-joining (MJ) de haplotipos

La red de haplotipos utilizando median-joining muestra como HA se ubica en una posición central, lo que refuerza su condición de ancestralidad (Fig. 3.3). Coincidiendo con lo propuesto recientemente por Poljak *et al.* (2007), los resultados obtenidos permiten establecer relaciones entre los linajes de La Pampa, especialmente Buenos Aires y luego Santa Cruz, con los de Tierra del Fuego. Algo para destacar nuevamente es la uniformidad en las secuencias de individuos provenientes de dicha isla, seguramente consecuencia del efecto fundador de la introducción. A pesar de ello, el crecimiento y dispersión que presenta esta población indicarían que no estaría afectada por un fenómeno de depresión por endogamia (Poljak *et al.* 2007). En contraposición, entre los ejemplares provenientes de Pipinas - Punta Piedras - Verónica (sitio 14) se identificó la mayor variabilidad de haplotipos (HA, HB, HC, HD y HH). El HA resultó el más heterogéneo geográficamente y ramas relativamente cortas lo relacionan con otros haplotipos de localidades pampeanas (ver Figs. 3.1, 3.3 y tabla 3.II), sugiriendo que la mayor variabilidad de linajes se encontraría en la región central de Argentina (La Pampa - Buenos Aires). En esta región es

característico el ambiente de pastizal al que clásicamente se ha encontrado asociado a *Chaetophractus villosus*.

4.2. DINÁMICA POBLACIONAL Y
FILOGEOGRAFÍA DE *Chaetophractus*
vellerosus.

4.2.1. Filogeografía

Esta especie posee una distribución menor a la de *Chaetophractus villosus* en territorio argentino, dado que no se extendería más al sur que las provincias de La Pampa y Buenos Aires. En particular, Wetzell (1985) menciona la presencia de *Chaetophractus vellerosus* en las provincias de Río Negro y Santa Cruz sobre la base de material de colección depositado en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia. Sin embargo, la supuesta procedencia patagónica de dicho material es dudosa dado que durante las últimas décadas no fue verificada la presencia de esta especie en dicha región. Por otra parte, durante los viajes de campaña y muestreos vinculados a este trabajo de tesis como también otros viajes de campo realizados por el Co-Director, no se registró la presencia de esta especie en Patagonia.

Actualmente *Chaetophractus vellerosus* se considera distribuída en las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, San Juan, La Rioja, Mendoza, San Luis, Córdoba, La Pampa y Buenos Aires.

Recordemos que esta especie además presenta una disyunción en su distribución y que para explicar esto, Carlini y Vizcaíno (1987) propusieron que su origen estuvo en los cambios climáticos hacia condiciones más húmedas que se produjeron en lo

que hoy es la provincia de Buenos Aires, durante fines del Pleistoceno y parte del Holoceno, tema que será tratado con más detalle en este capítulo.

Según los resultados filogeográficos de este trabajo, dos clados presentaron variabilidad geográfica y haplotípica y solo uno (clado 2.1 que en este caso además resulta el clado total) rechaza la hipótesis nula de no asociación geográfica (es decir, de distribución al azar de la variabilidad genética) (Tabla 3.VII). A pesar de ello, ninguno de los valores D_c y D_n de los elementos contenidos (ver el punto 2.8) son significativos indicando que el clado no puede ser analizado por la clave de Templeton (2004). El valor marginal $p = 0,104$ del clado 1.4 (Tabla 3.VII) indicaría la existencia de cierta estructuración geográfica aunque, como en el caso del clado 2.1, no es posible especificar a través de que tipo de fenómenos ya sean genéticos y/o demográficos. Todo ello permite inferir que sí existe estructuración en la distribución de los linajes en la población de *Chaetophractus vellerosus*.

Los 2 conjuntos principales de muestras provenientes de las localidades de Taco Ralo, provincia de Tucumán y Pipinas, provincia de Buenos Aires, presentan una notoria diferencia de variabilidad genética, tanto cualitativa como cuantitativa. Todos los ejemplares de Pipinas ($n = 15$) corresponden al haplotipo veA, mientras que entre 12 individuos de Tucumán (incluyendo a la localidad vecina de Graneros) se encontraron 7 haplotipos (Tabla 3.VI). Esta variabilidad probablemente aun sea mayor dado que veD,

proveniente de esa región, se encuentra unido al resto de los haplotipos tucumanos de la red a través de uno hipotético (Fig. 3.9).

Aunque desde el punto de vista de la cobertura geográfica podría existir un sesgo de muestreo, los haplotipos hipotéticos agregados en la red de la Fig. 3.9 para que todos se diferencien entre sí por una sola mutación sólo fueron dos, indicando que la representación de la variabilidad genética de la población es lo bastante sólida como para suponer que la posición de ancestralidad (interior) de veC no se verá afectada por un aumento de la cantidad de individuos y localidades en el muestreo.

Si bien el análisis de clados anidados no dio signos estadísticamente significativos sobre estructuración poblacional de algún tipo, podemos inferir su ocurrencia basándonos en la distribución geográfica de los haplotipos y en sus posiciones en la red. Los resultados obtenidos muestran claramente que debe haber existido una expansión continua del rango también en esta especie, desde su área central de distribución, hacia la costa bonaerense. Como se mencionó en el punto 4.1.1 sobre *Chaetophractus villosus*, la expansión del rango continuo se detecta cuando algunos de los haplotipos más antiguos están confinados al área pre-expansiva ancestral mientras que algunos de los haplotipos más jóvenes, surgidos de poblaciones en áreas de expansión, están diseminados geográficamente (*contiguous range expansion*) o ubicados en áreas distantes de la que ocupan los haplotipos ancestrales (*interior*). A este último fenómeno se lo denomina colonización a larga distancia

(*long distance colonization*) (Cann *et al.*, 1987) y parece ser el caso de veA, un haplotipo joven dada su posición en la red, que se encuentra en Córdoba (que forma parte de la distribución general de la especie) y en Pipinas, como único representante de esta región. Esta distribución de la variabilidad se condice con los supuestos de expansión del rango brindados por modelos de simulación pero su asociación geográfica no pudo ser detectada estadísticamente debido a bajos valores en los tamaños muestrales y a un escaso número de poblaciones analizadas en la zona más marginal (sólo 2). Sin embargo, el clado 2.1 indica claramente que la distribución de los haplotipos no es al azar con respecto a su distribución geográfica, y, como veremos en la próxima sección, un test de neutralidad podría estar indicando el fenómeno mencionado, aunque con una significación marginal.

4.2.2. Tests de neutralidad, distribución de las diferencias (*mismatch*) y red median Joining (MJ) de haplotipos

4.2.2.1. Tests de neutralidad

El resultado del test de Fu fue negativo (-3.38897) aunque marginalmente significativo ($p = 0,035$; en este test se considera significativo cuando es menor que 0,02) (Fu, 1997). Como F_s tiende

a ser negativo cuando se observa un exceso de mutaciones recientes que generan alelos raros, un valor grande y negativo significativo de este estadístico puede tomarse como evidencia contra la neutralidad de las mutaciones. Pero estos alelos raros podrían ser el resultado también de una expansión poblacional reciente. Por lo tanto, si bien de una manera marginalmente significativa, este test podría estar evidenciando las señales de la expansión poblacional mencionada en el apartado anterior.

El test de Tajima (D) fue de -0.27466 (p: 0.449), indica que no podemos rechazar la hipótesis nula sobre neutralidad.

Como en el caso de su especie hermana, los resultados de los tests de neutralidad aplicados al muestreo de *Chaetophractus vellerosus*, destacan la mayor sensibilidad del test de Fu.

4.2.2.2. Distribución de las diferencias (*mismatch*)

En cuanto al test de distribución de diferencias (*mismatch*), tampoco se encontraron evidencias de expansión poblacional en *Chaetophractus vellerosus*, ya que se encontró un patrón que es típicamente bimodal, característico de poblaciones cuyo tamaño permanece constante durante un largo período de tiempo. Sin embargo, Ramos Onsins y Rozas (2002) demostraron que aquellas pruebas basadas en la distribución de las diferencias pareadas, como el *mismatch*, son muy conservativas y poco potentes. Por lo

tanto, teniendo en cuenta estos problemas, y la posible deficiencia en el muestreo de esta especie, es altamente probable que esta prueba no haya detectado la expansión poblacional inferida cualitativamente en el análisis filogeográfico, como lo hizo el test de Fu, más sensible.

4.2.2.3. Red median-joining de haplotipos

A través de esta herramienta también fue posible visualizar al haplotipo veC en una posición central en la red, siendo probablemente el ancestral (Fig. 3.8). Por otro lado, también se aprecia la diferencia de variabilidad entre la zona de Tucumán (áreas rojas y amarilla) y la de Pipinas (anaranjada) y la conexión de esta última localidad con Alcira, al sur de la provincia de Córdoba (porción verde). Cabe destacar que los haplotipos hipotéticos en esta red son tres, en vez de los dos que presentó el NCA. Esto podría estar indicando la falta de representación de la variabilidad en el muestreo. Sin embargo, los aspectos mencionados en este punto se encuentran soportados por los demás análisis realizados.

4.2.3. Consideraciones paleobiogeográficas de la especie *Chaetophractus vellerosus*

Hasta aquí, los datos disponibles respecto de la historia biogeográfica de la población de pichi llorón son:

1. Según los datos presentados en este trabajo, el haplotipo ancestral entre los hallados en el muestreo proviene de la población de *Chaetophractus vellerosus* de la zona de Tucumán.

2. Como se mencionó en la introducción, la población del pichi llorón parece haber experimentado una disyunción durante el final del Pleistoceno – principio del Holoceno debido a cambios climáticos de condiciones áridas a semiáridas hacia condiciones de mayor humedad en el que actualmente es el territorio de la provincia de Buenos Aires (Carlini y Vizcaíno, 1987), (ver 1.1.3.2 y Fig. 3.6). Como el pichi llorón está mejor adaptado a la aridez por poseer túbulos colectores más largos (Greegor, 1975) prefiere climas más áridos o al menos suelos con una gran permeabilidad (Carlini y Vizcaíno, 1987), dicho cambio probablemente haya sido desfavorable.

3. El único haplotipo hallado entre los 15 individuos de la localidad de Pipinas, que en este caso representa a la población disyunta sobre la costa atlántica bonaerense, también fue hallado en el único individuo proveniente de la localidad de Alcira, en el centro oeste de la provincia de Córdoba, dentro de la distribución general de la especie.

4. El fósil más antiguo hasta ahora hallado para la especie, proviene de un estrato datado entre 0,9 y 0,78 Ma, que

corresponde a la Edad Mamífero Ensenadense (2 a 0,5 Ma), que aflora en el paraje Punta Hermengo, en la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires (Soibelzon *et al.* 2006 y referencias allí citadas).

Una barrera al flujo génico durante un tiempo considerable debería dejar una huella, es decir lo que se denomina un gap filogenético entre las poblaciones separadas (Avice 2000). En este caso en particular, luego de una fragmentación histórica como la disyunción mencionada de al menos unos 10000 a 8000 años (Pleistoceno tardío - Holoceno temprano), se esperaría encontrar una variabilidad haplotípica mayor en el relicto costero de la distribución de la especie (Pipinas), que aparezcan haplotipos propios de esta población fragmentada (es decir, no compartidos con las poblaciones de la distribución general) y que además estos haplotipos tuvieran una diferenciación genética relativamente alta con respecto al resto de los haplotipos de Tucumán (gap filogenético). Sin embargo, como se observa en la Fig. 3.6, veA se ubica en una posición tip en la red lo cual significa que es joven respecto de los demás y se separa del resto solamente por dos diferencias en la secuencia (clado 1.2 de la Fig. 3.9)

Por otro lado veA también aparece en Córdoba, dentro de la distribución general. Esto no condice con una disyunción sino que resulta congruente con una dispersión muy reciente (o expansión continua del rango como la detectada en el peludo) hacia la zona costera de la Bahía Samborombón en la costa de Buenos Aires, que

pudo haber sido a través de unos pocos individuos, lo que constituye un cuello de botella. Hablamos de “reciente” basándonos en la nula variabilidad haplotípica encontrada en la costa de Buenos Aires, en donde veA es el único haplotipo derivado (joven) que aparece como única variante en toda esta área.

Si consideramos que: 1) la tasa de sustitución nucleotídica observada para la RC en otros organismos superiores es alta y que además puede resultar mayor luego de “un pequeño cuello de botella” (Parsons *et al.*, 1997), y 2) que ambas especies del género *Chaetophractus* pudieron diferenciarse por hasta 29 mutaciones (Tabla 3.VIII) siendo linajes que divergieron al menos durante el tiempo equivalente a la edad del fósil de *Chaetophractus vellerosus* de Punta Hermengo (unos 0,8 Ma), se esperaría encontrar una mayor variabilidad en la zona de Pipinas si la dispersión hubiera ocurrido antes de la aparición de dicho fósil. Entonces, el problema consiste en que la información sobre la variabilidad genética y la filogeografía de la especie no parecen corresponderse con los escasos datos paleontológicos y la hipótesis paleoclimática propuesta oportunamente para explicar la disyunción (Carlini y Vizcaíno, 1987), al menos interpretada como una única expansión-retracción.

El registro fósil demuestra que el pichi existió en la costa bonaerense hace casi un millón de años, pero los datos moleculares indican que las poblaciones que se encuentran en esta región en la actualidad han llegado mucho después y que no son un relictos de

una distribución disyunta, sino más bien el resultado de una dispersión reciente. Sin embargo, es posible compatibilizar los datos paleontológicos, la hipótesis previa sobre la disyunción y la inédita información filogeográfica para explicar esto. Es muy difícil asumir que ha habido un solo evento de colonización de la costa bonaerense que haya sido exitoso desde el Ensenadense hasta hoy, de acuerdo con la falta de variabilidad haplotípica como ya se explicó. Al menos parecen haber habido dos olas de expansión de la población de *Chaetophractus vellerosus* que llegaron hasta allí, una hace unos 0,8 Ma. (a la que pertenece el fósil de Punta Hermengo) y otra reciente, que dio lugar a la población que actualmente habita dicha zona.

Carlini *et al.* (2003) reportaron una expansión pleistocénica-holocénica de la distribución de *Tolypeutes matacus* (Tolypeutinae, Dasypodidae) hacia el sur de su distribución argentina, llegando al norte de la provincia de Buenos Aires. Ellos propusieron que dicha expansión pudo haber sido posible gracias a un pulso de aridez. En función de ello y dado que el haplotipo veA de *Chaetophractus vellerosus* también fue encontrado en Córdoba, es posible que la última ola de expansión haya llegado por el norte de la provincia de Buenos Aires, durante un período más árido y a través de una franja de espinal que llega hasta la Bahía de Samborombón (Cabrera 1958). Como se mencionó más arriba, hubieron al menos dos posibles expansiones hasta la costa, pero obviamente no es descartable que hayan ocurrido más.

4.3. CONSIDERACIONES PALEOBIOGEOGRÁFICAS
Y FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Chaetophractus*

Delsuc *et al.* (2004) aplicando un reloj molecular sobre la filogenia de la familia Dasypodidae, señalaron que el linaje que habría dado origen al género *Chaetophractus* se separó del resto de la subfamilia Euphractinae durante el Mioceno tardío, aproximadamente unos 6 Ma. Sin embargo, el primer registro de restos fósiles asignados a la especie *Chaetophractus villosus* (y al género *Chaetophractus*) proviene de sedimentos que afloran en la Región Pampeana, (específicamente en la localidad bonaerense de Chapadmalal, Fig. 3.5), cuya edad estimada es de 4 a 3,2 Ma (Plioceno temprano) (ver Scillato-Yané 1982, Carlini y Scillato-Yané 1986). Dichos sedimentos son portadores de una asociación particular de taxones de mamíferos que Cione y Tonni (1995) han utilizado, junto con la datación del período de tiempo geológico durante el que se registran, para definir a la Edad Mamífero Chapadmalalense.

La aparición de *Chaetophractus* en el registro fósil coincide con la de muchas otras especies de la familia Dasypodidae y de otros Xenarthra (Carlini y Scillato-Yané, 1986). Esta diversificación probablemente tuvo relación con la formación y apogeo de las llamadas extensas Planicies del Sur (“*The Age of Southern Plains*”) durante el Plioceno, luego de la retirada de la gran ingresión marina miocénica conocida como el “Mar Paranense” y de la Fase Quechua del elevamiento de los Andes (ver Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006 y referencias allí citadas).

Hasta ahora, el fósil más antiguo adjudicado a la especie *Chaetophractus vellerosus* también proviene de la provincia de Buenos Aires, específicamente de la localidad costera de Punta Hermengo (ver Fig. 3.5). Fue hallado en sedimentos correspondientes a la Edad Mamífero Ensenadense (2 - 0,5 Ma), en un estrato cuya edad se calculó entre los 0,9 y 0,78 Ma (Soibelzon *et al.*, 2006 y referencias allí citadas).

Actualmente *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* coexisten y se consideran especies hermanas, por lo cual, si comparten un ancestro común deberían encontrarse fósiles de ambas especies con igual antigüedad. Sin embargo, los 2 a 3 Ma de diferencia entre los primeros registros de cada especie sugieren la posibilidad de la existencia de un linaje fantasma de *Chaetophractus vellerosus*. En otras palabras, existiría un linaje evolutivo para el cual no existe registro fósil, aunque su presencia sea inferida a partir de una filogenia (Norell, 1992). En este caso particular, el linaje fantasma abarcaría un período que se extiende desde el Chapadmalalense hasta la aparición de *Chaetophractus vellerosus* en el Ensenadense de Punta Hermengo.

Una hipótesis alternativa, sería un proceso de especiación simpátrica. Según esta propuesta *Chaetophractus villosus* sería efectivamente la especie ancestral de *Chaetophractus vellerosus*, y esta última habría surgido a partir de unos pocos individuos de la primera. Sin embargo, además de no contar con elementos que permitan apoyar una u otra hipótesis, existen evidencias de que la

determinación sistemática de los osteodermos de los armadillos (que muchas veces es el único remanente fósil) a veces puede no ser la correcta. De hecho, en Soibelzon *et al.* (2006) el biocrón de *Chaetophractus vellerosus* se amplía, gracias a un reestudio de osteodermos fósiles que erróneamente habían sido asignados a *Zaedyus pichiy*.

De acuerdo a lo mencionado, es posible asumir que restos anteriores al Ensenadense adjudicados a *Chaetophractus villosus* o *Zaedyus*, en realidad pertenezcan efectivamente a *Chaetophractus vellerosus*. Esta posibilidad sugiere que con una correcta identificación sistemática, el linaje fantasma resulte en un linaje real y que las dos especies hayan divergido de manera dicotómica de un ancestro común ya extinguido que existió hace al menos 6 Ma.

4.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA
REGIÓN CONTROL DE *Chaetophractus*.
COMENTARIOS FINALES

A partir de los alineamientos y la corrección de las secuencias parciales de la RC del género *Chaetophractus* comenzaron a ser notorias repeticiones en ciertos fragmentos que resultaron llamativas. Así fue como se inició una pequeña investigación paralela al tema central de la tesis doctoral, cuyos resultados presentados en la sección 3.3 del Capítulo III serán brevemente comentados aquí, ya que una verdadera discusión sobre este tema requiere de estudios estructurales y funcionales más profundos para que tenga sentido realizarla en un marco filogenético. Sin embargo, dado que *Xenarthra* es uno de los cuatro clados de mamíferos placentarios, que se separa como linaje tempranamente del resto de ellos luego de los Afrotheria (Madsen *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2001a; Delsuc *et al.* 2001) y que hay trabajos que dan cuenta de las características del ADNmt de este orden pero sólo basados en *Dasypus novemcinctus*, el aporte de esta tesis en ese sentido no deja de ser novedoso.

Los resultados sobre la estructura y variabilidad de la CR obtenidos enriquecen la información genética disponible sobre la familia Dasypodidae que, como se mencionó, actualmente se basa casi exclusivamente en *Dasypus novemcinctus*. Esta especie, conocida vulgarmente como mulita, colonizó América Central y el sur de Estados Unidos a través de una explosiva dispersión generando una gran variabilidad genética que ha sido extensamente analizada a nivel intra e interpoblacional (Huchon *et al.* 1999). Esta variabilidad, por consiguiente, podría no resultar representativa del

stock que dio origen a los dasypodidos sudamericanos actuales. Por otro lado, estudios filogenéticos moleculares y citogenéticos recientes sobre *Xenarthra* sugieren que *Dasypus* diverge en una rama aparte de *Chaetophractus* y *Zaedyus* durante la evolución de los armadillos (Delsuc *et al.* 2002, 2003, 2004, Lizarralde *et al.* 2005).

Como ya fue mencionado en la Introducción, la RC, la porción no codificante del ADNmt, contiene al menos en los vertebrados, las señales de comienzo, regulación y finalización de la transcripción y replicación de la molécula. Tiene una longitud de entre 880 y 1400 pb aunque puede extenderse mucho más debido a las repeticiones en la secuencia en varias especies (Sbisà *et al.* 1997). La evolución de la RC no procede con continuidad entre los organismos, es decir que no parece tener un hilo conductor (Greenberg *et al.* 1983) pero cuando las secuencias de especies diferentes son comparadas, aunque estén lejanamente emparentadas existe una homología confinada al Dominio Central y a los elementos ETAS y CSB.

4.4.1. Dominio ETAS y elementos ETAS 1 y 2

La composición de bases del dominio ETAS de *Chaetophractus* obtenida en este estudio indica que T>A>C>G, lo cuál es coincidente con la de *Ornithorhynchus anatinus* (Monotremata), *Didelphis virginiana* (Marsupialia) y *Ferungulata* (Artiodactyla,

Perissodactyla y Cetacea) aunque el orden decreciente A>T>C>G es el más común entre los mamíferos, con excepciones como ocurre con Primates donde A>C>T>G. Sin embargo, en todos los casos G es la base menos frecuente (Saccone and Sbisà 1994; Saccone 1994).

Dentro de este Orden, los elementos ETAS pueden ubicarse prácticamente adyacentes como en los carnívoros, en los que se encuentran separados por una sola base, mientras que en otros casos como el de los primates la separación puede ser de 160 bases. Esto indica la propensión de este segmento de las secuencias a acumular mutaciones o repeticiones. La separación de 73 bp hallada en *Chaetophractus* entre ETAS 1 y ETAS 2, producto de la repetición de 80 bp identificada (Fig. 3.11) sugiere que ambos elementos estructurales habrían sido prácticamente adyacentes. Ésto y el hecho de que el orden decreciente en la composición de bases de este dominio sea T>A>C>G son características comunes entre Ferungulata y Chaetophractus. El elemento ETAS 1 de *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* se encontró incluido parcialmente en dicha repetición que lo separa de ETAS 2 y repeticiones similares que involucran a este elemento también fueron halladas en otros grupos como ovejas, musarañas y gatos (Sbisà *et al.* 1997). Los grados de conservación respecto de la secuencia consenso de mamíferos mencionada en el Capítulo II (Materiales y Métodos) de los elementos ETAS 1 y ETAS 2 fueron

de 78 a 83 % y 58 a 79 % respectivamente y son realmente elevados.

4.4.2. Dominio Central

El orden C>T>A>G y el T>C>A>G son los más comunes entre los mamíferos, con un marcado aumento de G como característica general de este dominio. En el caso del género bajo estudio la composición C> A> G > T hallada no es representativa ya que la longitud de la secuencia completa del DC en mamíferos es 200 a 328 bp (Walberg & Clayton 1981; Brown *et al.* 1986; Saccone *et al.* 1991; Sbisà *et al.* 1997) y las obtenidas para *Chaetophractus* son parciales, de 127 pb, por lo cuál los valores reales en la composición podrían variar y una comparación sería prematura.

El grado de conservación del DC del género *Chaetophractus* respecto de la secuencia de mamíferos consenso fue de 72 a 89 % (Fig. 3.10), también elevada. Este hallazgo, junto con el que respecta a los elementos ETAS en este sentido, refuerzan la propuesta que sostiene que el uso de la secuencia de la RC, sobre todo la del DC, es adecuado para estudios filogenéticos (Saccone 1991). Aunque el alto grado de conservación de este dominio se conoce en mamíferos e incluso en otros grupos de vertebrados su función, no obstante, es aún desconocida (Sbisà *et al.* 1997).

En cuanto a la repetición detectada en el DC de 3 de los 76 ejemplares de *Chaetophractus villosus* y en sólo 1 de los 30 de *Chaetophractus vellerosus* analizados en este estudio (Fig. 3.11), cabe destacar que es novedosa ya que éste fenómeno ha sido reportado sólo para los dominios laterales (Sbisà *et al* 1997). De todas formas, deberían ser realizados estudios más detallados de la secuencia completa del dominio para confirmar esta característica con un número muestral mayor.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

5.1. *Chaetophractus villosus*

El análisis de clados anidados (NCA) reveló:

1. Una asociación geográfica significativa en la distribución de la variabilidad genética de la población de *Chaetophractus villosus*, con un patrón general de expansión contigua del rango de distribución.

2. De acuerdo a 1, a partir de los resultados de este estudio se desprendió que el área pre-expansiva de la especie se localiza en el centro de Argentina, y que la expansión de su rango de distribución ocurrió hacia el Este y el Noroeste en la Región Pampeana. El haplotipo HA, distribuído en el área pre-expansiva, debe ser considerado el linaje más antiguo por su frecuencia de aparición en las localidades muestreadas y porque de él surge el mayor número de haplotipos en la red del NCA.

3. Una expansión hacia el sur de Argentina, ocupando toda la Patagonia, con un haplotipo único: HC. Este linaje ha alcanzado un extenso rango de distribución y su dispersión parece haber comenzado con posterioridad a los 3500 años antes del presente, ya que no hay evidencias de la presencia de la especie en sitios arqueológicos estudiados. Por otro lado, según la nula variabilidad de las secuencias de la RC, tal expansión geográfica austral en la Patagonia, debió haber sido sumamente reciente.

4. Los procesos de expansión en la Región Pampeana y la Patagonia no parecen haber sido simultáneos, ya que la expansión

en la primera incluye un fenómeno de aislamiento por distancia genética por un lado, y una distribución geográfica similar entre haplotipos derivados y su haplotipo ancestral, por otro. Ambos requieren un tiempo de desarrollo, que en principio supera al probable corto tiempo de colonización de la Patagonia, en la que la nula variabilidad de haplotipos y las referencias arqueopaleontológicas disponibles así lo indican. Así, el haplotipo HC es el único linaje que expandió el rango de distribución de la especie ocupando toda la Patagonia, e incluso es el único presente entre los animales introducidos en la Isla Grande de Tierra del Fuego.

El flujo génico restringido con aislamiento por distancia, es un proceso que se observa en especies de baja vagilidad, como sería el caso de *Chaetophractus villosus* en el centro del país, según lo que sugirió el NCA.

5.2. Chaetophractus vellerosus

El análisis de clados anidados (NCA) reveló:

1. Que el haplotipo ancestral entre los hallados en el muestreo proviene de la población de la zona de Tucumán. Por ello, y por la gran variabilidad hallada entre los individuos de dicha zona, ella parece una potencial candidata a ser (o en todo caso formar parte) del área de origen de la especie.

2. La especie parece mostrar una expansión del rango de distribución desde su área central, hacia la costa bonaerense, lo que se denomina colonización a larga distancia. Este fenómeno se encuentra representado por el haplotipo VeA, surgido recientemente dada su posición en la red, que se encuentra en Córdoba (que forma parte de la distribución general de la especie), y en Pipinas, como único haplotipo presente de esta última zona;

3. La colonización de la zona costera de la Bahía Samborombón en la provincia de Buenos Aires pudo haber ocurrido a través de unos pocos individuos, lo que constituye un cuello de botella. A pesar de que se esperaría encontrar una mayor variabilidad en la zona de Pipinas (si la dispersión hubiera ocurrido alrededor de la edad que presenta el fósil más antiguo de la especie en dicha zona), la población presentó una variabilidad genética nula, por lo que se infiere que el evento de dispersión mencionado es muy reciente.

4. El cambio climático del Pleistoceno tardío – Holoceno temprano probablemente retrajo la distribución de la especie hacia el interior del actual territorio argentino.

5. Al menos parecen haber habido dos eventos de expansión de la población de *Chaetophractus vellerosus* que llegaron hasta el Este de la provincia de Buenos Aires, una hace unos 0,8 Ma. (a la que pertenece el fósil de Punta Hermengo), y otra mucho más reciente, que dio lugar a la población que actualmente habita la zona. Es posible que la última expansión (o corrimiento de

área de distribución) haya llegado por el norte de la provincia de Buenos Aires, durante un período más árido, y a través de una franja de espinal que llega hasta la Bahía de Samborombón.

Según lo antedicho, el pichi llorón es una especie que tiene la capacidad de expandir y retraer su distribución, como lo demuestra la presencia del fósil y la nula variabilidad de las secuencias en la actualidad.

5.3. Consideraciones finales sobre el registro fósil y paleobiogeografía de las especies estudiadas

Actualmente *Chaetophractus villosus* y *Chaetophractus vellerosus* coexisten y se consideran especies hermanas, por lo cual, si comparten un ancestro común deberían encontrarse fósiles de ambas especies con antigüedad semejante. Sin embargo, la existencia de 2 a 3 Ma de diferencia entre los primeros registros de cada especie sugiere la posibilidad de la existencia de un linaje fantasma de *Chaetophractus vellerosus*. Sin embargo, y dado que podría haber habido alguna identificación equívoca de restos fósiles de la familia, es posible que restos anteriores al Ensenadense adjudicados a *Chaetophractus villosus* o *Zaedyus pichiy*, en realidad pertenezcan efectivamente a *Chaetophractus vellerosus*.

Finalmente, debe destacarse que parece haber una correlación en ambas especies entre los eventos de expansión de sus poblaciones y los cambios climáticos ocurridos, especialmente aquellos que afectaron la zona central de Argentina. Posiblemente, las principales causas de dichos cambios fueron las glaciaciones patagónicas y la disminución en el nivel del mar, eventos que promovieron pulsos de aridez cuyo impacto en el ambiente permitió los fenómenos de expansión poblacional de las especies del género *Chaetophractus* estudiadas en este trabajo de tesis.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abba AM, Udrizar Sauthier DE & Vizcaíno SF (2005).** Distribution and use of burrows and tunnels of *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Xenarthra) in the eastern argentinean pampas. *Acta Theriologica* 50 (1): 115-124.
- Aguirre ML (1993).** Paleobiogeography of the Holocene molluscan fauna from northeastern Buenos Aires Province, Argentina: its relation to coastal evolution and sea level changes. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 102: 1–26.
- Alberdi MT, Bonadonna FP, Ortiz-Jaureguizar E, (1997).** Chronological correlation, paleoecology and paleobiogeography of the late Cenozoic South American 'Rionegran' land-mammal fauna: a review. *Revista Española de Paleontología* 12: 249–255.
- Anderson TJC, Komuniecki R, Komuniecki PR & Jaenike J (1995).** Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? *Int. J Parasitol.* 25: 1001-1004.
- Avise JC (1989).** A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends Ecol. Evol.*, 4: 279-281.
- Avise JC (1996).** Toward a regional conservation genetics perspective: Phylogeography of faunas in the southeastern United States. En: *Conservation genetics: Case histories from nature*, Avise JC y Hamrick JL (eds.), Chapman and Hall, Nueva York, pp. 431-470.
- Avise JC (1998).** The history and purview of phylogeography: A personal reflection. *Mol. Ecol.*, 7: 371-379.
- Avise JC (1994).** Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman and Hall, New York, NY. 511 pp.
- Avise JC (2000).** Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, London. 447 pp.
- Avise JC (2004).** Molecular Markers, Natural History and Evolution, 2nd Edition. Sinauer Associates, 684 pp.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM Jr, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC (1987).** Intraspecific phylogeography. The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise JC, Ball RM Jr. & Arnold J (1988).** Current versus historical population sizes in vertebrates species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutation. *Mol. Biol. Evol.* 5: 331-344
- Azize Atallah G (1975)** Presencia de *Chaetophractus villosus* (Edentata, Dasypodidae) Nueva especie para la región de Magallanes, Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia* (Pta. Arenas, Chile), VI, 1-2: 169-171.

- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999).** Median-joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Baker P, Seltzer G, Fritz S, Dunbar R, Grove M, Tapia P, Cross S, Rowe H, Broda J (2001).** The history of South American tropical precipitation for the past 25,000 years. *Science* 291: 640–643.
- Behling H (1998).** Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology* 99, 143–156.
- Behling H, Negrelle R (2001).** Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the late Quaternary. *Quaternary Research* 56: 383–389.
- Bermingham E, McCafferty SS, & Martin AP (1997).** Fish phylogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. *En: Molecular systematics of fishes*, Kocher TD & Stepien CA (eds.), California Academic Press, San Diego, pp 113-128.
- Bernatchez L & Dodson JJ (1990).** Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mt-DNA restriction analysis. *Evolution* 44: 1263-1271.
- Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA (1981).** Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 2:167–80.
- Bonadonna F, Leone G, Zanchetta G (1995).** Composición isotópica de los fósiles de gasterópodos continentales de la provincia de Buenos Aires. Indicaciones paleoclimáticas. In: *Evolución Biológica y Climática de la Región Pampeana Durante los Últimos Cinco Millones de Años. Un Ensayo de Correlación con el Mediterráneo Occidental*. Alberdi M, Leone G, Tonni E (Eds.), Museo Nacional de Ciencias Naturales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 77–104.
- Brown GG, Gadaleta G, Pepe G, Saccone C, Sbisà E (1986)** Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol*, 192: 503-511.
- Bruniard E (1982).** La diagonal árida Argentina: un límite climático real. *Revista Geográfica* 95: 5–20.
- Budyko MI, Borzenkova I, Menzhulin LB, Shikonianov I (1994).** Cambios antropogénicos del clima en América del Sur. *Acad. Nac. Agron. Vet.* Buenos Aires, p. 223.
- Cabrera AL, Willink A (1980).** Biogeografía de América Latina, segunda ed. OEA, Washington, DC. 286 pp.

Caldenius CC (1932). Las glaciaciones cuaternarias en la Patagonia y Tierra del Fuego. *Publ. Dir. Minas Geol.* 95: 1–147.

Cann PL, Brown WM, Wilson AC (1984). Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 106: 479-499
Hutchinson CA, Newbold JE, Potter SS, Hall EM (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 256: 536-538

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987). Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*, 325: 31-6.

Cao Y, Janke A, Waddell PJ, Westerman M, Takenaka O, Murata S, Okada N, Pääbo S, Hasegawa M (1998). Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of Eutherian orders. *J Mol Evol*, 47: 307–322.

Carlini AA & Vizcaíno SF (1987). A new record of the armadillo *Chaetophractus vellerosus* (Gray, 1865) (Mammalia, Dasypodidae) in the Buenos Aires Province of Argentine: possible causes for the disjunct distribution. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 22: 53-56.

Carlini AA, Scillato-Yané GJ (1996) Un Euphractini (Mammalia, Dasypodidae) del Pliceno de Chapadmalal (Buenos Aires, Argentina) Consideraciones filogenéticas sobre los Euphractini. *Revista del Museo de La Plata (Argentina)* 9: 225-238.

Carlini AA & Scillato-Yané GJ (1999). Evolution of Quaternary Xenarthrans (Mammalia) of Argentina. In *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. Edited by Rabassa J & Salemme MC. Rotterdam: Balkema Publishers, 10: 149-176.

Carlini AA & Scillato-Yané GJ (2004). The oldest Megalonychidae (Xenarthra: Tardigrada); phylogenetic relationships and an emended diagnosis of the family. *Neues Jahrbuch Für Geologie und Paläontologie Abhandlungen* 233: 423- 443.

Carlini AA, Ortiz-Jaureguizar E, Pascual R, Scillato-Yané GJ, Vizcaíno SF (1994) The negative paleontological record on the controverted origin and relationships of the Xenarthra. *Resúmenes del VI Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía*, Trelew (Argentina) 21-22.

Carlini AA, Scillato-Yané GJ, Goin FJ y Praderio F (2002a). Los Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) del Eoceno. 1) El registro en Paso del Sapo, NO de Chubut (Argentina): exclusivamente Astegotheriini. *1º Congreso Latinoamericano de Paleontología de Vertebrados* (Santiago de Chile), *Resúmenes*: 23.

Carlini AA, Scillato-Yané GJ, Madden RH, Soibelzon E y Ciancio M (2002b). Los Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) del Eoceno. 2) El conjunto de especies del Casamayorensis de Cañadón Vaca, SE de Chubut

(Argentina) y su relación con los que le suceden. *1º Congreso Latinoamericano de Paleontología de Vertebrados* (Santiago de Chile), *Resúmenes*: 24.

Carlini AA, Scillato-Yané GJ, Madden RH, Ciancio M y Soibelzon E (2002c). Los Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) del Eoceno. 3) Las especies del Casamayorensis de la Barranca Sur del lago Colhué Huapi, S de Chubut (Argentina): el establecimiento de los Euphractinae. *1º Congreso Latinoamericano de Paleontología de Vertebrados* (Santiago de Chile), *Resúmenes*: 24-25.

Carlini AA, Zurita AE, Gasparini G, Noriega J (2004). Los mamíferos de la Mesopotamia argentina y su relación con los del centro norte de la Argentina, Paraguay y sur de Bolivia, y los del sur de Brasil y oeste de Uruguay: paleobiogeografía y paleoambientes. In: Aceñolaza FG (Ed.), *Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino*, vol. 12, INSUGEO, Miscelánea, San Miguel del Tucumán, pp. 83–90.

Carter TS & Encarnaçao CD (1983) Characteristics and use of burrows by four species of armadillos in Brazil. *Journal of Mammalogy* 64 (1): 103-108.

Castelloe J, Templeton AR (1994) Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 102–113.

Cione AL, Tonni EP (1995). Chronostratigraphy and “land mammal ages” in the Cenozoic of southern South America: principles, practices and the “Uquian” problem. *J. of Paleontol.* 69: 135-159.

Cione AL, Tonni EP, Soibelzon L (2003). The broken zig-zag: Late Cenozoic large mammal and tortoise extinction in South America. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, n.s 5: 1–19.

Clapperton C (1993a). Nature and environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 101: 189–208.

Clapperton C (1993b). Quaternary Geology and Geomorphology of South America. Elsevier, Amsterdam, 779 pp.

Clement M, Posada D, Crandall KA (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.

Coates AG (2003). La forja de Centroamérica. In: Coates, A.G. (Ed.), *Paseo Pantera*. Smithsonian Books, Washington, DC, pp. 1–40.

Coates AG, Obando JA (1996). The geological evolution of the Central American Isthmus. In: *Evolution and Environment in Tropical Americas* Jackson JBC, Budd AF, Coates AG (Eds.), The University of Chicago Press, Chicago, pp. 21–56.

- Coates AG, Obando JA (1996).** The geological evolution of the Central American Isthmus. In: *Evolution and Environment in Tropical Americas* (eds. Jackson JBC, Budd AF, Coates AG), pp 21-56.
- Collantes MB, Anchorena J & Koremblit G (1989)** A soil nutrient gradient in magellanic empetrum Heathlands. *Vegetatio* 80: 183-193
- Confalonieri VA, Sequeira AS, Todaro L & Vilardi JC (1998).** Mitochondrial DNA and phylogeography of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. *Heredity*, 81: 444-452.
- Confalonieri VA, Scattaglini MA & Lanteri AA (2000).** Origin and dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: a mtDNA phylogeographic study. *XXI International Congress of Entomology (ICE)*, Foz do Iguassu, Paraná, Brazil, Abstracts, Book 1, pp 566.
- Crandall KA, Templeton AR (1993)** Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959–969.
- Crespo JA (1944)** Contribución al conocimiento de la ecología de algunos dasypódidos (edentata) argentinos. *Revista Argentina de Zoogeografía*, Buenos Aires 4: 7-39.
- Crespo JA (1974).** Comentarios sobre nuevas localidades para mamíferos de Argentina y de Bolivia. *Mus. Arg. de Cs. Nat. "Bernardino Rivadavia" Zoología*, XI (1): 10-13.
- Cunningham CW, Collins TM (1998).** Beyond area relationships: extinction and recolonization in molecular marine biogeography. *En: Molecular approaches to ecology and evolution*. DeSalle R y Schierwater B (eds.), Birkhauser, Basilea, pp 297-321.
- Deferrari G, Camilión C, Escobar J & Lizarralde MS (2002)** Presencia de *Chaetophractus villosus* en Tierra del Fuego: nueva especie introducida ¿nuevo problema? *XVII Jornadas Argentinas de Mastozoología*, libro de resúmenes: p. 24.
- de Jong WW, Zweers A, Joysey KA, Gleaves JT, Boulter D (1985)** Protein sequence analysis applied to xenarthran and pholidote phylogeny. *In The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermilinguas*. Edited by G.G.Montgomery. Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp 65–76.
- Delsuc F, Catzeflis FM, Stanhope MJ, Douzery EJP (2001)** The evolution of armadillos, anteaters, and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil Eurotamandua. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 268: 1605-1615.

- Delsuc F, Scally M, Madsen O, Stanhope MJ, de Jong WW, Catzeflis FM, Springer MS, Douzery EJP (2002)** Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. *Mol Biol Evol*, 15: 1656-1671.
- Delsuc F, Stanhope MJ, Douzery EJP (2003)** Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): Contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol*, 28: 261-275.
- Delsuc F, Vizcaíno SF, Douzery EJP (2004)** Influence of Tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. *BMC Evolutionary Biology*, 4: 1-13.
- Deschamps CM, Tonni EP (1992)**. Los vertebrados del Pleistoceno tardío del arroyo Napostá Grande, provincia de Buenos Aires. Aspectos paleoambientales. *Ameghiniana* 29: 201–210.
- de Vivo M, Carmignotto AP (2004)**. Holocene vegetation change and the mammal faunas of the South America and Africa. *Journal of Biogeography* 31: 943–957.
- Donnelly P, Tavaré S (1986)**. The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*, 18: 1–19.
- Douzery E, Randi E (1997)** The Mitochondrial Control Region of Cervidae: Evolutionary Patterns and Phylogenetic Content. *Mol Biol Evol*, 14(11): 1154-1166.
- Dowsett HJ, Barron JA, Poore RZ, Thompson RSM, Cronin TM, Ishman SE, Willard DA (1999)**. Middle Pliocene Paleoenvironmental Reconstruction: PRISM2. US Geological Survey Open File Report 99-535.
- Ducroz JF, Stubbe M, Saveljev AP, Heidecke D, Samjaa R, Ulevicius A, Stubbe A, Durka W (2005)** Genetic variation and population structure of the Eurasian beaver *Castor fiber* in eastern Europe and Asia based on mtDNA sequences. *J Mammal*, 86: 1059–1067.
- Durka W, Babik W, Ducroz JF, Heidecke D, Rosell F, Samjaa R, Saveljev AP, Stubbe A, Ulevicius A, Stubbe M (2005)**. Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber*. *J Mol Ecol*, 14: 3843–3856.
- Ekdahl EJ, Fritz SC, Baker PA, Rigsby CA & Coley K (2008)**. Holocene multidecadal- to millennial-scale hydrologic variability on the South American Altiplano. *The Holocene*, 18 (6): 867-876.
- Engelmann GF (1985)** The phylogeny of the Xenarthra. In *The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas*. Montgomery GG (Ed), Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp 51-63.

- Espizúa L (2000b).** Variaciones glaciarias del Holoceno en el valle del Río Valenzuela, Mendoza. *XII Reunión de Campo del Cuaternario*. Comité Argentino para la Investigación del Cuaternario (CADINCUA), Resúmenes y Guía de Campo, p. 6.
- Excoffier L (2004).** Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lesson from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13: 853–864.
- Excoffier L, Langaney A (1989).** Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *American journal of human genetics*, 44(1):73-85.
- Felsenstein J (1971).** The rate of loss of multiple alleles in finite haploid populations. *Theor. Pop. Biol*, 2: 391-403.
- Fidalgo R (1983).** Algunas características de los sedimentos superficiales en la cuenca del Río Salado y en la Pampa ondulada. *Coloq. Int. Hidrología de Grandes Fianuras*, La Plata, pp. 1–19.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002).** Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. 559 pp.
- Fu XY (1997).** Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- García A, Zárate M, Paez MM (1999).** The Pleistocene/Holocene transition and human occupation in the Central Andes of Argentina: Agua de la Cueva locality. *Quaternary International* 53/54: 43–52.
- Gaudin TJ (1995).** The ear region of Edentates and the phylogeny of the Tardigrada (Mammalia, Xenarthra). *Journal of Vertebrate Paleontology* 15: 672–705.
- Gaudin TJ & Branham DG (1998).** The phylogeny of the Myrmecophagidae (Mammalia, Xenarthra, Vermilingua) and relationship of *Eurotamandua* to the Vermilingua. *Journal of Mammalian Evolution* 5(3): 237-265.
- Gaudin TJ (1999)** The morphology of xenarthrous vertebrae (Mammalia: Xenarthra). *Fieldiana Geol*, 41: 1-38.
- Gaudin TJ (2004).** Phylogenetic relationships among sloths (Mammalia, Xenarthra, Tardigrada): the craniodental evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 140: 255-305.
- Gil A, Zárate M, Nemea G (2005).** Mid-Holocene paleoenvironments and the archeological record of southern Mendoza, Argentina. *Quaternary International* 132: 81–94.
- Glaz D & Carlini AA (1999).** Estudio preliminar del Home Range y Área Máxima de actividad en *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia,

Dasypodidae). *XIV Jornadas Argentinas de Mastozoología*, Salta. Libro de resúmenes: 9.

González M (1994). Salinas del Bebedero Basin (República Argentina). In: *Global Geological Records of Lake Basins. World and Regional Geology, Vol. 4*. Gierlowski-Kordesch E, Kelts K (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 381–386.

Graham A (1992). Utilization of the isthmian land bridge during the Cenozoic: paleobotanical evidence for timing, and the selective influence of altitudes and climate. *Review of Paleobotany and Palynology* 72: 119–128.

Gray AJ (1986). Do invading species have definable genetic characteristics? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* b 314: 655-674.

Gregor DH jr. (1974). Comparative ecology and distribution of two species of armadillos, *Chaetophractus vellerosus* and *Dasypus novemcinctus*. Unpublished Ph.D. dissertation. University of Arizona, Tucson, Arizona

Gregor DH jr. (1975). Renal capabilities of an argentine desert armadillo. *J. Mammal*, 56: 626-632

Gregor DH jr. (1980). Preliminary study of movements and home range of the armadillo *Chaetophractus vellerosus*. *Journal of Mammalogy* 61: 334-335.

Gregor DH jr (1985) Ecology of the little hairy armadillo *Chaetophractus vellerosus*. in: *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*, Montgomery GG (ed). Smithsonian Institution Press, Washington and London : 397-405.

Griffiths RC (1980). Lines of descent in the diffusion approximation of neutral Wright-Fisher models. *Theor. Pop. Biol*, 17: 40-50.

Griffiths RC & Tavaré S (1997). Computational methods for the coalescent. *En: Progress in population genetics and human evolution*. Donnelly P & Tavaré S (eds.), Springer-Verlag, New York, pp 165-182.

Grill S (1995). Análisis palinológico de un perfil cuaternario en la cuenca del arroyo Napostá Grande (localidad: García del Río), provincia de Buenos Aires. *Actas IV Jornadas Geol. Geofis. Bonaerenses*, pp. 99–108.

Grill S, Quattrocchio ME (1996). Fluctuaciones eustáticas durante el Holoceno a partir del registro de paleomicroplancton, Arroyo Napostá Grande, Sur de la provincia de Buenos Aires. *Ameghiniana* 33 (4): 435–442.

Grimm EC, Lozano-García S, Behling H, Markgraf V (2001). Holocene vegetation and climate variability in the Americas. In: *Interhemispheric Climate Linkages*. Markgraf V. (Ed.), Academic Press, San Diego, pp. 325–363.

- Grosjean M, Núñez L, Cartajena I, Messerli B (1997).** Mid-Holocene climate and culture change in the Atacama Desert, Northern Chile. *Quaternary Research* 48: 239–246.
- Harding RM (1996).** New phylogenies: an introductory look at the coalescent. *En: New uses for new phylogenies*, Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, Nee S (eds.), pp 15-21.
- Harpending HC, Rogers AR (2000).** Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1: 361-385.
- Hey J, Machado CA (2003).** The study of structured populations: a difficult and divided science has new hope. *Nature Reviews Genetics* 4: 535-543.
- Huchon D, Delsuc F, Catzeflis FM, Douzery EJP (1999).** Armadillos exhibit less genetic polymorphism in North America than in South America: nuclear and mitochondrial data confirm a founder effect in *Dasyus novemcinctus* (Xenarthra) *Molecular Ecology*, 8 (10): 1743-1748.
- Hudson RR (1990).** Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol Biol.* 9: 1-44.
- Hutchinson CA, Newbold JE, Potter SS, Hall EM (1974).** Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 256: 536-538.
- Isla FI (1989).** Holocene sea level fluctuation in the southern hemisphere. *Quaternary Science Reviews* 8: 359–368.
- Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, Inumaru S, Kamtsu M, Mukoyama H (1994).** Polymorphic sequence in the D-Loop region of the equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*, 25: 215-221.
- Iriondo M, Garcia N (1993).** Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 101: 209–220.
- Jaksic FM, Iriarte JA, Jiménez JE & Martínez D (2002).** Invaders without frontiers : cross-border invasions of exotic mammals. *Biological Invasions* 4 : 157-173.
- Jenny B, Valero-Garcés B, Villa Martinez R, Urrutia R, Geyh M, Veit H (2003).** Early to mid-Holocene aridity in central Chile and the southern Westerlies: the Laguna Aculeo record (34° S). *Quaternary Research*, 58: 160–170.
- Jerardino A (1995).** Late Holocene Neoglacial episodes in southern South America and southern Africa: a comparison. *The Holocene*, 5 (3): 361-368.

- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR (1991).** A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*, 19 (2): 408.
- Jorge W, Orsi-Souza AT, Best R (1985).** The somatic chromosome of *Xenarthra* In *The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas*. Montgomery GG (Ed.). Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp 121-129.
- Jorge W, Meritt DA, Benirschke K (1977).** Chromosome studies in Edentata. *Cytobios*, 18: 157-172.
- Kalin-Arroyo MT, Squeo FA, Armesto JJ, Villagrán C (1988).** Effects of aridity on plant diversity in the northern Chilean Andes: results of a natural experiment. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 55–78.
- Kimura M (1968).** Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura M (1980).** A simple method for estimate evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16 : 111-120.
- Kimura M (1983).** The neutral theory of molecular evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Kimura M & Ohta T (1969).** The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics*, 61 : 763-771.
- Kingman JFC (1982a).** The coalescent. *Stoch. Proc. Applns*, 13: 235-248.
- Kleinert K, Strecker MR (2001).** Climate change in response to orographic barrier uplift: paleosol and stable isotope evidence from the late Neogene Santa María basin, northwestern Argentina. *Geological Society of America Bulletin* 113: 728–742.
- Korembliit G & Forte Lay JA (1996).** Características agrohidrológicas del norte de Tierra del Fuego. *Libro de Actas del VII Congreso Argentino de Meteorología, VII Congreso Latinoamericano e Ibérico de Meteorología*, Buenos Aires, Septiembre de 1996.
- Kriegs JO, Churakov G, Kiefmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J (2006).** Retroposed elements as archives for the evolutionary history of placental mammals. *PLoS Biol* 4(4), e91, 0537-0544.
- Kronberg B, Ramonell C, Latrubesse E (1993).** Edades C₁₄ de los estadios climáticos húmedos del Holoceno de San Luis, Argentina. *Resumos e Contribucoes do Simposio Internacional do Quaternário da Amazonia*, Manaus, p. 153.

- Lamy F, Hebbeln D, Wefer G (1999).** High resolution marine record of climatic change in mid-latitude Chile during the last 28,000 years based on terrigenous sediment parameters. *Quaternary Research* 51: 83–93.
- Lanteri AA & Confalonieri VA (2003).** Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos.. *En: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía.* Llorente Bousquets J & JJ Morrone (eds.). Pp. 185-193. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Larissa A, Pessole G, Reyes A, Sbisà E, Saccone C (2002).** Linage specificity of the evolutionary dynamics of the mt-DNA D-Loop region in rodents. *J Mol Evol*, 54: 145-155.
- Levinson G, Gutman GA (1987).** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 203-221.
- Lizarralde MS (1993)** Current status of the beaver (*Castor canadensis*) introduced in Tierra del Fuego (Argentina). *Ambio* 22: 351-358.
- Lizarralde MS & Escobar J (2000)** Mamíferos exóticos en la Tierra del Fuego. *Ciencia Hoy* 10 (56): 52-63.
- Lizarralde MS, Deferrari G, Álvarez S & Escobar J (2001).** diferenciación evolutiva en *ctenomys magellanicus*: variación morfológica y alozímica entre sus dos formas cromosómicas. *Interciencia* 26 (1): 13-17
- Lizarralde MS, Escobar J & Deferrari G (2004)** Invader species of Argentina: a review about beaver (*Castor canadensis*) population situation on Tierra del Fuego ecosystem. *Interciencia* 29, 7: 352-356.
- Lizarralde MS, Bolzán AD, Poljak S, Pigozzi MI, Bustos J, Merani MS (2005).** Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in four species of Armadillo (Dasypodidae) from Argentina: an approach to explaining karyotype evolution in the Xenarthra. *Chromosome Research*, 13: 777–784.
- Lowell T, Heusser C, Andersen B, Moreno P, Heusser L, Schluchter C, Marchant D, Denton G (1995).** Interhemispheric correlation of late Pleistocene glacial events. *Science* 269: 1541–1549.
- Lupo L (1998).** Estudio sobre la lluvia polínica actual y la evolución del paisaje a través de la vegetación durante el Holoceno en la cuenca del río Yavi. Borde Oriental de la Puna, Noroeste Argentino. Ph.D. Thesis, Fakultät für Geschichts und Geowissenschaften, Universität Bamberg, Bamberg, Germany.
- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DG, DeBry RW, Adkins R, Amrine AM, Stanhope MJ, De Jong WW, Springer MS (2001).** Parallel adaptive radiation in two major clades of placental mammals. *Nature*, 409: 610-614.

- Mancini MV (1998).** Vegetational changes during the Holocene in Extra-Andean Patagonia, Santa Cruz Province, Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 138: 207–219.
- Mancini MV (2002).** Vegetation and climate during the Holocene in Southwest Patagonia, Argentina. *Review of Palaeobotany and Palynology* 122, 101–115.
- Mancini MV, Paez MM, Prieto AR (2002).** Cambios paleoambientales durante los últimos 7.000 ¹⁴C años A.P. en el ecotono bosque-estepa, 47°–48° S, Santa Cruz, Argentina. *Ameghiniana* 39 (2): 151–162.
- Mancini MV, Paez MM, Prieto AR, Stutz S, Tonello M & Villanova I (2005).** Mid-Holocene climatic variability reconstruction from pollen records (32°–52° S, Argentina). *Quaternary International*, 132: 47–59.
- Markgraf V (1983).** Late and postglacial vegetational and paleoclimatic changes in subantarctic, temperate, and arid environments in Argentina. *Palynology* 7: 43–70.
- Markgraf V (1985).** Late Pleistocene faunal extinctions in southern Patagonia. *Science*, 228: 1110–1112.
- Markgraf V (1989).** Paleoclimates in central and south America since 18 000 B.P. based on pollen and lake-level records. *Quat. Sci. Rev.*, 8: 1–24.
- Markgraf V (2001).** The southern Westerlies since Full Glacial (LGM) times. Workshop on the Paleoclimatology of the Central Andes, January 11–16, 2001, Tucson, Arizona, PEPI.
- Markgraf V, Romero E, Villagrán C (1996).** History and paleoecology of South American Nothofagus forests. In: *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. Veblen TT, Hill RS (Eds.), Yale University Press, New Haven, CT, pp. 354–386.
- Marshall LG (1985).** Geochronology and land-mammal biochronology of the trans-American faunal interchange. In: *The Great American Biotic Interchange*. Stheli F, Webb SD (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 49–85.
- Marshall LG, Cifelli RL (1990).** Analysis of changing diversity patterns in Cenozoic Land Mammal Age faunas South America. *Palaeovertebrata* 19: 169–210.
- Marshall LG, Sempere T (1993).** Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic, and tectonic context. In: *Biological Relationships Between Africa and South America*. Goldblatt P (Ed.), Yale University Press, New Haven, CT, pp. 329–392.
- Martin PS (1984).** Prehistoric overkill: the global model. In: *Quaternary Extinctions: A Prehistoric Revolution*. Martin PS, Klein RG (Eds.), University of Arizona Press, Tucson, pp. 354–403.

- Martin L, Fournier M, Mourguiart P, Siffedine A, Turcq B, Absy M, Flexor JM (1993).** Southern oscillation signal in South American Palaeoclimatic data of the 7000 last years. *Quaternary Research* 39: 338–346.
- Massoia E & Chébez JC (1993).** Mamíferos silvestres del archipiélago fueguino. Ediciones L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina, 261 pp.
- Matocq MD, Patton JL, Da Silva MNF (2000).** Population genetic structure of two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution*, 54 (4): 1423-1432.
- Matson CW, Baker RJ (2001).** DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). *Mol Biol Evol*, 18: 1494–1501.
- Mc Nab BK (1979)** The influence of body size on the energetics and distribution of fossorial and burrowing mammals. *Ecology* 60: 1010-1021.
- Mc Nab BK (1980 b)** Energetics and the limits to a temperate distribution in armadillos. *Journal of Mammalogy* 61: 606-627.
- Mc Nab BK (1985)** Energetics, population biology and distribution of xenarthrans living and extinct. *en: The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*, Montgomery GG (Ed)., Smithsonian Institution Press, 1985.
- McKenna MC, Bell SK (1997).** Classification of Mammals above the Species Level. New York: Columbia University Press.
- Medel R & Jaksic FM (1988).** Ecología de los cánidos sudamericanos: una revisión. *Revista Chilena de Historia Natural* 61: 67-79.
- Michaux JR, Libois R, Filippucci MG (2005).** So close and so different: comparative phylogeography of two small mammals species, the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity*, 94: 52-63.
- Möller-Krull M, Delsuc F, Churakov G, Marker C, Superina M, Brosius J, Douzery EJP, Schmitz J (2007).** Retroposed Elements and Their Flanking Regions Resolve the Evolutionary History of Xenarthran Mammals (Armadillos, Anteaters, and Sloths). *Mol. Biol. Evol.* 24(11): 2573-2582.
- Moraes-Barros N, Silva JAB, Miyaki CY, Morgante JS (2006).** Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genetica*, 126: 189-198.
- Moritz CC (1994a).** Defining “evolutionary significant units” for conservation. *Trends Ecol. Evol*, 9: 373-375.

- Moritz CC (1994b)**. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.*, 3: 401-411.
- Mörner NA, Sylwan C (1989)**. Magnetostratigraphy of the Patagonian moraine sequence at Lago Buenos Aires. *Journal of South American Earth Sciences* 2: 385–389.
- Murphy, W. J., Eizirik, E., Johnson, W.E., Zhang, Y.P., Ryder, O.A., and O'Brien, S.J. (2001)**. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature London*, 409: 614-618.
- Nabel PE, Cione AL, Tonni EP (2000)**. Environmental changes in the Pampean area of Argentina at the Matuyama-Brunhes (Clr-Cln) Chrons boundary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 162: 403-412.
- Nei, M. (1987)**. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.
- Nei M, Li WH (1979)**. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Neigel JE, Avise JC (1993)**. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics* 135: 1209-1220.
- Nieto M, Hortal J, Martínez-Maza C, Morales J, Ortiz-Jaureguizar E, Peláez-Campomanes P, Pickford M, Prado JL, Rodríguez J, Senut B, Soria D, Varela S (2005)**. Historical determinants of mammal diversity in Africa: evolution of mammalian body mass distribution in Africa and South America during Neogene and Quaternary times. *In: African Biodiversity. Molecules, Organisms, Ecosystems*. Huber BA, Sinclair BJ, Lampe KH (Eds.), Springer, Netherlands, pp. 287–295.
- Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Margulies EH, Program NC, Rougemont J, Nyffeler B, Antonarakis SE. (2007)**. Early history of mammals is elucidated with the ENCODE multiple species sequencing data. *PLoS Genet.* 3, e2.
- Norell MA (1992)**. Taxic origin and temporal diversity: the effect of phylogeny. *In: Extinction and phylogeny*. Novacek MJ, Wheeler QD (Ed), Columbia University Press; New York, NY, pp. 88–118.
- Nowak RM (1991)** Order Xenarthra. en: *Walker's mammals of the world vol. 1*: 515-535 Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Oliveira E, Bergqvist L (1998)**. A new Paleocene armadillo (Mammalia, Dasypodoidea) from the Itaboraí Basin, Brazil. *Paleógeno de América del Sur y de la Península Antártica, Asociación Paleontológica Argentina, Publicación Especial* 5 (30): 35-40.

- Ortiz-Jaureguizar E (1986).** Evolución de las comunidades de mamíferos cenozoicos sudamericanos: un estudio basado en técnicas de análisis multivariado. *Actas del IV Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía*, vol. 4, Mendoza, pp. 191–207.
- Ortiz-Jaureguizar E (1998).** Paleoecología y evolución de la fauna de mamíferos de América del sur durante la “Edad de las Planicies Australes” (Mioceno Superior–Plioceno Superior). *Estudios Geológicos* 54: 161–169.
- Ortiz-Jaureguizar E & Cladera GA (2006).** Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*, 66: 498–532.
- Osentosky MF & Lamb T (1995).** Intraspecific phylogeography of the gopher tortoise, *Gopherus poliphemus*: RFLP analysis of amplified mtDNA segments. *Mol. Ecol*, 4: 709–718.
- Owen-Smith N (1997).** Pleistocene extinction: the pivotal role of megaherbivores. *Paleobiology* 13: 351–362.
- Pardiñas UFJ (1995).** Los roedores cricétidos. *En: Evolución Biológica y Climática de la Región Pampeana durante los Últimos Cinco Millones de Años. Un Ensayo de Correlación con el Mediterráneo Occidental.* Alberdi MT, Leone G, Tonni EP (Eds.), Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales, vol. 12, Madrid, pp. 229–256.
- Paez MM (1991).** Palinología de Campo Moncada 2 (Chubut): Interpretación paleoecológica para el Holoceno. Ph.D. Thesis. University of La Plata, Argentina 275 pp (unpublished).
- Parizzi MG, Salgado-Labouriau ML & Kohler HC (1998).** Genesis and environmental history of Lagoa Santa, southeastern Brazil. *The Holocene* 8: 311–321.
- Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P & Holland MM (1997).** A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics* 15: 363–367.
- Pascual R (1970).** Evolución de comunidades, cambios faunísticos e integraciones biocenóticas de los vertebrados cenozoicos de Argentina. *Actas del IV Congreso Latinoamericano de Zoología*, vol. 2, Caracas, pp. 991–1088.
- Pascual R, Bondesio P (1982).** Un roedor Cardiatheriinae (Hydrochoeridae) de la Edad Huayqueriense (Mioceno tardío) de La Pampa. Sumario de los ambientes terrestres en la Argentina durante el Mioceno. *Ameghiniana* 19: 19–36.
- Pascual R, Ortiz-Jaureguizar E (1990).** Evolving climates and mammal faunas in Cenozoic South America. *Journal of Human Evolution* 19: 23–60.

- Pascual R, Vucetich MG, Scillato-Yané GJ, Bond M (1985).** Main pathways of mammalian diversification in South America. In: *The Great American Biotic Interchange*. Stelhi F, Webb SD (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 219–247.
- Pascual R, Ortiz-Jaureguizar E, Prado JL (1996).** Land mammals: paradigm of Cenozoic South American geobiotic evolution. In: *Contribution of Southern South America to Vertebrate Paleontology*, Arratia G (Ed.), Müncher Geowissenschaftliche Abhandlungen (A), vol. 30, pp. 265–319.
- Pascual R, Carlini AA, Bond M, Goin FJ (2002).** Mamíferos cenozoicos. In: *Geología y Recursos Naturales de Santa Cruz*. Haller MJ (Ed.), Relatorio del XV Congreso Geológico Argentino. Asociación Geológica Argentina, Buenos Aires, pp. 533–544.
- Patterson B & Pascual R (1972).** The fossil mammal fauna of South America. In *Evolution, Mammals and Southern Continents*. Keast A, Erk FC & Glass BP, Albany: State University of New York Press, pp 247-309.
- Patterson, B, Segall, W, Turnbull, WD & Gaudin, TJ (1989).** The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia). Part I. Cingulates. *Fieldiana: Geology New Series*, 18: 1-46.
- Patterson, B, Segall W Turnbull, W.D., and Gaudin, T.J. (1992).** The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia). Part II. Sloths, anteaters, palaeonodonts, and a miscellany. *Fieldiana Geology New Series*, 24:1-79.
- Pisano E (1981).** Bosquejo fitogeográfico de fuego-patagonia. *Anales Instituto de la Patagonia*, Punta Arenas (Chile) 12: 159-171.
- Politis GG, Tonni EP & Fidalgo F (1983).** Cambios corológicos de algunos mamíferos en el área interserrana de la Provincia de Buenos Aires durante el Holoceno. *Ameghiniana* 20: 72-80.
- Politis GG, Prado JL, Beukens RP (1995).** The human impact in Pleistocene–Holocene extinction in South America: the Pampean case. In: *Ancient Peoples and Landscapes*. Johnson, E. (Ed.), Museum of Texas Tech University, Lubbock, pp. 187–205.
- Poljak S, Deferrari G, Bustos J, Lizarralde MS, Merani MS (2004).** Un método de muestreo para estudios moleculares en armadillos (fam. Dasypodidae). *Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad*, Escobar, octubre de 2004.
- Poljak S, Escobar J, Deferrari G, Lizarralde MS (2007).** A new introduced mammal in Tierra del Fuego: the “large hairy armadillo” *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae) in the Isla Grande island. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80: 285-294.

- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000)** GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487–488.
- Potts R (1996)**. Evolution and climate variability. *Science* 273: 922–923.
- Rabassa J, Coronato AM, Salemme M (2005)**. Cronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences*, 20: 81-103.
- Ramonell C, Iriondo M, Latrubesse E, Kromer R (1993)**. Los climas del Cuaternario superior en el centro-oeste de Argentina. Registro geológico de ocho estadios climáticos. *Resumos e Contribuições do Simposio Internacional do Quaternário da Amazonia*, Manaus, pp. 146–149.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002)**. Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (12): 2092-2100.
- Rand DM, Harrison RG (1989)**. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics*, 121: 551-569
- Ray N, Currat M & Excoffier L (2003)**. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol. Biol. Evol.* 20: 76–86.
- Redford KH (1985)** Food habits of armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). *En: The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas* Montgomery GG (Ed.) 429-437. Smithsonian Institution Press, Washington and London .
- Redford KH, Eisenberg J (1992)**. Mammals of the neotropics, 2: the southern cone. University of Chicago Press. Chicago, 430 pp.
- Redi CA, Zacharias H, Merani S (2005)**. Genome sizes in Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires, and Laurasiatheria. *J Hered*, 96: 485- 493.
- Reyes A, Nevo E, Saccone C (2003)**. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of subterranean mole rats, *Spalax erhenbergi* superspecies, in Israel. *Mol Biol Evol*, 20: 622–632.
- Roderick GK (1996)**. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography and their uses. *Annu. Rev. Entomol*, 41: 325-352.
- Roderick GK & Gillespie RG (1998)**. Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Mol. Ecol*, 7: 519-531.
- Rodriguez E, Barton M (1993)**. El Cuaternario de la llanura. In: *Geología y Recursos Naturales de Mendoza*, Ramos V (Ed.). Relatorio del XII Congreso

Geológico Argentino. II Congreso de Exploración de Hidrocarburos, Mendoza, Vol. 1, pp. 173–194.

Rogers AR, Harpending HC (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molec. Biol. Evol*, 9: 552-569.

Roig VG (1969) Termorregulación en *Euphractus sexcinctus* (Mammalia, Dasypodidae). *Physis*, 26: 27-32.

Roig VG (1970) Observaciones sobre la termorregulación en *Zaedyus pichiy*. *Acta Zoológica Lilloana (Argentina)* 28: 13-18.

Rose KD & Emry RJ (1993). Relationships of Xenarthra, Pholidota and fossil “Edentates”: the morphological evidence. In *Mammal Phylogeny: Placentals*. Slazay FS, Novacek MJ, & McKenna MC (Ed.), New York: Springer-Verlag, pp 5-12.

Roth L, Lorscheitter ML (1989). Palynology of a peat in Parque Nacional de Aparados da Serra, Rio Grande do Sul, Brazil. *International Symposium on Global Changes in South America during the Quaternary*. Special Publication 1. Sao Paulo, pp. 56–61.

Saccone C (1994). The evolution of mitochondrial DNA. *Curr Opin Genet Dev*, 4: 875-881.

Saccone C & Sbisà E (1994). The evolution of the mitochondrial genome. In *Principles of Medical Biology. Vol. 1B Bioethics*. Edited by Bittar, E.E. Greenwich: JAI Press, 39-72.

Saccone C, Attimonelli M, & Sbisà, E (1987). Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 26: 205-211.

Saccone C, Pesole G, & Sbisà E (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol*, 33: 83-91.

Salgado-Labouriau ML, Barberi M, Ferraz-Vicentini KR & Parizzi MG (1998). A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 99: 115–129.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez B, Prado JL, Alberdi MT (2004). Feeding ecology, dispersal, and extinction of South American Pleistocene gomphotheres (Gomphotheriidae, Proboscidea). *Paleobiology* 30: 146–163.

Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G & Saccone C (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new

conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.

Schaal BA & Olsen KM (2000). Gene genealogies and population variation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97: 7024-29.

Schäbitz F (1994). Holocene climatic variations in northern Patagonia, Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109: 287–294.

Schäbitz F (1999). Paläoökologische Untersuchungen an geschlossenen Hohlformen in den Trockengebieten Patagoniens. *Bamberger Geographische Schriften* 17, 239.

Schäbitz F, Liebricht H (1998). Landscape and climate development in the south-eastern part of the 'Arid Diagonal' during the last 13,000 years. *Bamberger Geographische Schriften* 15 (S): 371–388.

Scheel-Ybert R, Gouveia SEM, Pessenda LCR, Aravena R, Coutinho LM & Boulet R (2003). Holocene palaeoenvironmental evolution in the Sao Paulo State (Brazil), based on anthracology and soil $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *The Holocene* 13 (1): 73–81.

Schneider S, Excoffier L (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites. Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.

Scillato-Yané GJ (1980). Catálogo de los Dasypodidae fósiles (Mammalia, Edentata) de la República Argentina. *2º Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía y 1º Congreso Latinoamericano de Paleontología* (Buenos Aires, 1978), *Actas* 3: 7-36.

Scillato-Yané GJ (1982). Los Dasypodidae (Mammalia, Edentata) del Plioceno y Pleistoceno de Argentina. Ph.D. Dissertation. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata: 1-159. La Plata. Unpublished.

Scillato-Yané GJ, Carlini AA, Vizcaíno SF, Ortiz-Jaureguizar E (1995). "Xenarthra". *En: Evolución Biológica y climática de la Región Pampeana durante los últimos 5 millones de años. Un ensayo de correlación con el Mediterráneo Occidental*, Alberdi MT, Leone G & Tonni EP (Eds.). Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, pp 183-207.

Shackleton NJ, Backman J, Zimmerman H, Kent DV, Hall MA, Roberts DG, Schnitker D, Baldauf J, Despraines A, Homrighausen R, Huddleston P, Keene J, Kaltenback AJ, Krumsiek KA, Morton AC, Murray JW, Westberg-Smith J (1984). Oxygen isotope calibration of the onset of ice-rafting and history of glaciation in the North Atlantic region. *Nature* 307: 620-623.

- Shadel GS, Clayton DA (1997).** Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 66: 409-435.
- Slatkin M, Hudson RR (1991).** Pairwise comparisons of mitochondrial-DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555–562.
- Soibelzon E, Carlini AA, Tonni EP, Soibelzon LH (2006).** *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia: Dasypodidae) in the Ensenadan (Early - Middle Pleistocene) of the southeastern Pampean region (Argentina). Paleozoogeographical and paleoclimatic aspects. *Jb. Geol. Palaont. Mh.*, 12: 734-748.
- Soibelzon E, Daniele G, Negrete J, Carlini AA & Plischuk (2007).** Annual diet of the little hairy armadillo, *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia, Dasypodidae), in Buenos Aires province, Argentina. *J. Mammal* 88(5): 1319-1324.
- Southern SO, Southern PJ, Dizon AE (1988).** Molecular Characterization of a Cloned Dolphin Mitochondrial Genome. *J Mol Evol* 28: 32-42.
- Stevaux JC (2000).** Climatic events during the Late Pleistocene and Holocene in the upper Parana´ River: correlation with NE Argentina and South-Central Brazil. *Quaternary International* 72: 73–85.
- Stingl H, Garleff K (1978).** Gletscherschwankungen in den subtropisch-semiaride Hochanden Argentiens. *Zeitschrift für Geomorphologie* NF30: 115–131.
- Stingl H, Garleff K (1985).** Glacier variations and climate of the Late Quaternary in the subtropical and mid-latitude Andes of Argentina. *Zeitschrift für Gletscherkunde und Glazialgeologie* 21S: 225–228.
- Stuessy TF, Sang T, De Vore ML (1996).** Phylogeny and biogeography of the subfamily Barnadesioideae with implications for early evolution of the Compositae. In: *Compositae: Systematics*. Hind DJN, Beentje HJ (Eds.), *Proceedings of the International Compositae Conference*, vol. 1, pp. 463–490.
- Stutz S, Prieto AR (2001).** Historia de la vegetación de la laguna Mar Chiquita desde ca. 6,000 ¹⁴C años AP. In: *Reserva de biósfera Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas*. Iribarne O (Ed.), Editorial Martín, Mar del Plata, Argentina, pp. 67–73.
- Stutz S, Prieto AR, Isla FI (1999).** Cambios de la vegetación durante el Holoceno en el SE bonaerense: Análisis polínico del paleoestuario del Arroyo La Ballenera, Provincia de Buenos Aires. *Asociación Paleontológica Argentina. Publicación Especial* 6: 65-69.

- Sylvestre F, Servant M, Servant-Vildary S, Causse C, Fournier M, Ybert J (1999).** Lake-level chronology on the southern Bolivian Altiplano (18°–23° S) during Late-Glacial Time and the Early Holocene. *Quaternary Research* 51: 54–66.
- Taber FW (1944)** Contribution on the life history and ecology of the nine banded armadillo. *Journal of Mammalogy* 26: 211-226.
- Tajima F (1983).** Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.
- Tajima (1989a).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tajima (1989b).** The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Tajima F (1993).** Measurement of DNA polymorphism. *In Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular paleopopulation biology.* Takahata N & Clark AG (Eds). Tokyo: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates Inc. pp 37–59.
- Tamayo HM (1973)** Los armadillos de Chile. Situación de *Euphractus sexcinctus* (Linneo 1758), (Mammalia, Edentata, Dasypodidae). *Noticiario Mensual, Museo Nacional de Historia Natural de Chile* (Chile) 17 (3-6): 203-204.
- Tell G, Izaguirre I & Quintana RD (1997).** Flora y fauna patagónicas. Ediciones Caleuche 1997.
- Templeton AR (1998).** Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.*, 7: 381-397.
- Templeton AR (2004).** Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789–809.
- Templeton AR & Sing CF (1993).** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987).** A cladistic análisis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an análisis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343-351.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992)** A cladistic análisis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619–633.

- Templeton AR, Routman E & Phillips C (1995).** Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782
- Thomas O (1887)** On the Homologies and succession of the teeth in the Dasyuridae, with an attempt to trace the history of the evolution of mammalian teeth in general. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*: 443-462.
- Thompson JD, Higgins DG, & Gibson TJ (1994).** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680.
- Thompson L, Davis M, Mosley-Thompson E, Sowers T, Henderson K, Zagorodnov V, Lin P, Mikhailenco V, Campen R, Bolzan J, Cole-Dai J, Grancou B (1998).** A 25,000-year tropical climate history from Bolivian ice cores. *Science* 282: 1858-1864.
- Tonni EP, Fidalgo F (1978).** Consideraciones sobre los cambios climáticos durante el Pleistoceno tardío – Reciente en la Provincia de Buenos Aires. Aspectos ecológicos y zoogeográficos relacionados. *Ameghiniana* 15: 235-253.
- Tonni EP, Fidalgo F (1982).** Geología y paleontología de los sedimentos del Pleistoceno en el área de Punta Hermengo (Miramar, prov. de Buenos Aires, Rep. Argentina): aspectos paleoclimáticos. *Ameghiniana* 19: 79-108.
- Tonni EP, Cione AL (1995).** Los mamíferos como indicadores de cambios climáticos en el Cuaternario de la región pampeana de la Argentina. In: *Climas Cuaternarios en América del Sur*. Argollo J, Mourguiart P (Eds.), Orstrom, La Paz, pp. 319-326.
- Tonni EP, Cione AL, Figini AJ (1999).** Predominance of arid climates indicated by mammals in the pampas of Argentina during the Late Pleistocene and Holocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 147: 247-281.
- Tonni EP, Alberdi MT, Prado JL, Brago MS, Cione AL (1992).** Changes of mammal assemblages in the Pampean region (Argentina) and their relation with the Plio-Pleistocene boundary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 95: 179-194.
- Turcq B, Pressinotti M, Martin L (1997).** Paleohydrology and Paleoclimate of the past 33,000 years at the Tamandú River, central Brazil. *Quaternary Research* 47: 284-294.
- Vallerini J (1975)** Relevamiento expeditivo de recursos naturales de la zona cordillerana de Patagonia. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

(I.N.T.A), Estación Experimental Bariloche, pcia. de Río Negro (Argentina). Bariloche, informe técnico, 23 pp.

van Dijk, MAM, Paradis E, Catzeflis F, & Jong WW (1999). The virtues of gaps: Xenarthran (Edentate) Monophyly supported by a unique deletion in alphaA-Crystallin. *Syst Biol*, 48: 94-106.

van Geel B, Heusser CJ, Renssen H, Schuurmans CJE (2000). Climatic change in Chile at around 2700 BP and global evidence for solar forcing: a hypothesis. *The Holocene* 10, 659–664.

Veit H (1996). Holocene landscape and climate evolution of Central Andes. *Zentralblatt für Geologie und Palaeontologie 7/8*: 887–895.

Vila C, Amorin IR, & Leonard JA (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey Wolf *Canis lupus*. *Mol Ecol*, 8: 2089–2103.

Villagrán C, Varela J (1990). Palynological evidence for increased aridity on the central Chilean coast during the Holocene. *Quaternary Research* 34: 198–207.

Vitousek PM, D'antonio CM, Loope LL, Rejmánek M & Westbrooks R (1997). Introduced species: a significant component of human –caused global change. *New Zealand Journal of Ecology* 21: 1-16.

Walberg MW, Clayton DA (1981). Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-Loop regions of the mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 9: 5411-5421.

Wayne ML & Simonsen K (1998). Statistical tests of neutrality in the age of weak selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 236-240.

Webb SD (1978). A history of savanna vertebrates in the New World, Part II: South America and the Great Interchange. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9: 393–426.

Webb SD (1985). Late Cenozoic mammal dispersals between the Americas. *In: The Great American Biotic Interchange*. Stheli F, Webb SD (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 357–386.

Wetzel RM (1982) Systematics, distribution, ecology and conservation of south american edentates. en: *Mammalian biology in South America*, Mars MM & Genoways HH (Eds). 654 pp.

Wetzel RM (1985). Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. *In The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas*. Montgomery GG (Ed.) Washington DC, Smithsonian Institution Press, pp 23-46.

Whorley JR, Alvarez-Castañeda ST, Kenagy GJ (2004). Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology*, 13: 2709-2720.

Williamson M & Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology* (77) 6: 1661-1667.

Wilson DE & Reeder DM (1993). Mammal Species of the World, a taxonomic and geographic reference. Washington and London: Smithsonian Institution Press, Second edition, 1206 pp.

Yacobaccio H (1998). The evolution of South Andean hunter-gatherers. *International Union of Prehistoric and Protohistoric Sciences. Proceedings of the XIII Congress* Vol. 5, Abaco Edizioni, Forli, pp. 389-394.

Yrigoyen MR (1979). Cordillera principal. *Actas del II Simposio de Geología Regional Argentina*, vol. 1, Córdoba, pp. 651-694.

Zárate MA, Paez MM (2002). Los Paleoambientes del Pleistoceno-Holoceno en la cuenca del arroyo La Estacada, Mendoza. In: *IANIGLA, 30 años de Investigación Básica y Aplicada en Ciencias Ambientales*. Trombotto D, Villalba R (Eds.), Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y ciencias ambientales (IANIGLA), Mendoza, Argentina, pp. 117-121.

Zárate M, Flegenheimer N (1991). Geoarchaeology of the Cerro La China locality (Buenos Aires, Argentina): site 2 and site 3. *Geoarchaeology* 6: 273-294.

Zurita AE, Carlini AA, Scillato-Yané GJ, Tonni EP (2004). Mamíferos extintos del Cuaternario de la Provincia del Chaco (Argentina) y su relación con aquéllos del este de la región pampeana y de Chile. *Revista Geológica de Chile* 31(1): 65-87.

Network 4.5.0.2, Fluxus Technology Ltd. 2004-2008. [www.fluxus-engineering.com]

Chromas 2.3 Technelysium Pty. Ltd. 1998-2004 [<http://www.technelysium.com.au>]

Arlequín 3.01 (Laurent y Excoffier 1998-2006) [<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>]